

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 843681 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **843681**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.05.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.09.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.11.1984**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **21.05.1984 PCT/US1984/000755**
Internationell ansökan - International
application

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

23.05.1983 US 497,370

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Van't Riet, Bartholomeus, 3419 Noble Avenue, Richmond Virginia, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Wampler, Galen L., 6938 Chamberlayne Road Mechanicsville, Virginia, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Elford, Howard L., 3313 Gloucester Road, Richmond Virginia, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Van't Riet, Bartholomeus, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Wampler, Galen L., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Elford, Howard L., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

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

Polyhydroksibentsoehappojohdokset.

Polyhydroxibenzoesyraederivat.

Polyhydroksibentsoehappojohdokset. - Polyhydroxibenzoesyra-derivat.

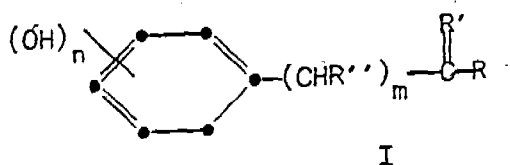
Monet erilaiset hydroksi-substituoidut bentsohydroksamiinihapot ovat jo tunnettuja --kts. Gale ja Hynes, J. Med. Chem., 11, 191 (1968), Gale, Hynes ja Smith, ibid, 13, 571 (1970), Van't Riet et al., US-patentti 4,263,322, Howle ja Gale, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 131, 697 (1969), Gale et al. Biochem. Pharm., 20, 2677 (1971).

Hydroksi-substituoitujen bentsamidien biologisia vaikutuksia sekä tällaisten yhdisteiden muita käyttökohteita on esitetty julkaisussa: Kreuchunas, US-patentti 2,849,480, Chemical Abstracts, 85, 94115w (1978), 74, 112752f (1971).

Elford'in, Wamp er'in ja Vant Riet'in ryhmän tulosten perusteella tiedetään, että hydroksibentsohydroksamiinihapot ovat ribonukleotidi-reduktaasin inhibiittejä --kts. Cancer Res., 22, 589 (1979), Abstracts, Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 18, 177 (1977), 19, 63 (1978), 20, 149 (1979), 22, 18 (1981), 23, 202 (1982), Va. J. Sci., 29, 81 (1978), artikkelit, J. Pharm. Sci., 69, 856 (1980), New Bardos ja Kalman, toim. sivut 227 (Elsevier Biomedical, New York, N.Y.), 856 (1982), Advances in Enzyme Regulation, 19, 151 (1981), Abstract, Med. Ped. Oncol., 10 102 (1982, Abstract, Proc. 13th Int. Cancer Cong. sivut 88 (1982), artikkelit, J. Med. Chem., 22, 589 (1979) ja Cancer Treat. Rep., 66, 1825 (1982).

Tietämämme mukaan polyhydroksi-substituoituja bentsamidoksiimeja, bentsamidiineja, bentsohydroksiamidoksiimeja ja bentsamidaatteja ei ole mainittu kemiallisessa kirjallisuudessa.

Tämän keksinnön kohteena ovat kaavan I mukaiset yhdisteet



jossa n on 2-5, m on 0 tai 1, R' on NOH tai NH , R on NH_2 tai NHOH, kun R' on NOH, R on NH_2 tai $O-C_{1-3}$ alkyyli, kun R' on NH , ja R'' on H tai OH; ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät happoadditiosuolat.

Suositteluja kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat ne, joissa ainakin kaksi fenyylirenkään hydroksyyleistä ovat visinaalisia. Vieläkin parempi yhdisteryhmä on se, jossa visinaaliset hydroksyyliit sijaitsevat fenyylirenkään C-3 ja C-4 asemissa.

Kaavan I mukaisia yhdisteitä kutsutaan hydroksi-substituoiduiksi bentsamidoksiimeiksi, kun m on 0, R' on NOH ja R on NH_2 , hydroksi-substituoiduiksi bentshydroksiamidoksiimeiksi, kun m on 0, R' on NOH ja R on NHOH, hydroksi-substituoiduiksi bentsamidaateiksi, kun m on 0, R' on NH ja R on $O-C_{1-3}$ alkyyli, ja hydroksi-substituoiduiksi bentsamidiineiksi, kun m on 0, R' on NH ja R on NH_2 .

Kun m on 1 ja R'' on OH, yhdisteitä kutsutaan vastaavasti hydroksi-substituoiduiksi manteliamidoksiimeiksi, manteli-hydroksiamidoksiimeiksi, manteliamidaateiksi ja manteliamidiineiksi. Näissä mantelihappojohdoksissa on asymmetriakeskus ja siten ne valmistetaan rasemaattina dl-seoksena. Tämä keksintö käsittää sekä rasemaatit että yksittäiset optiset isomeerikomponentit.

Kun m on 1 ja R'' on H, yhdisteitä kutsutaan vastaavasti hydroksi-substituoiduiksi fenyyliasetamidoksiimeiksi, fenyyliasetohydroksiamidoksiimeiksi, fenyyliasetamidaateiksi

ja fenyyliastamidiineiksi.

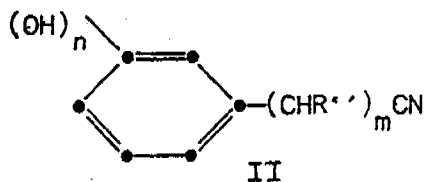
Tyypillisiä edellisen kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat:

2,3-dihydroksibentsohydroksiamidoksiimi
 3,4-dihydroksibentsohydroksiamidoksiimi
 metyyli 2,3,4-trihydroksibentsamidaatti
 isopropyli 3,5-dihydroksibentsamidaatti
 etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti
 etyyli 3,4-dihydroksibentsamidaatti
 3,4-dihydroksibentsamidoiksiimi
 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi
 2,3,5-trihydroksibentsamidoksiimi
 n-propyyli 2,4,5-trihydroksibentsamidaatti
 2,3-dihydroksibentsamidoksiimi
 etyyli 2,4-dihydroksibentsamidaatti
 etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti
 2,5-dihydroksibentsohydroksiamidoksiimi
 3,4,5-trihydroksibentsamidiini
 2,3-dihydroksibentsamidiini
 2,3,4-trihydroksibentsamidiini
 3,4-dihydroksibentsamidiini
 dl-2,4,5-trihydroksimanteliamidiini
 2,4,5-trihydroksibentsamidiini
 3,5-dihydroksibentsamidiini
 dl-3,4-dihydroksimanteliamidiini
 dl-3,4,5-trihydroksimanteliamidiini
 dl-2,3-dihydroksimanteliamidiini
 dl-2,3,4-trihydroksimantelihydroksiamidoksiimi
 dl-2,4,5-trihydroksimantelihydroksiamidoksiimi
 2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimi
 2,3,4-trihydroksibentsohydroksiamidoksiimi
 3,4,5-trihydroksibentsohydroksiamidoksiimi
 etyyli 2,3-dihydroksibentsamidaatti
 dl-3,4-dihydroksimanteliamidoksiimi
 dl-3,4,5-trihydroksimantelihydroksiamidoksiimi

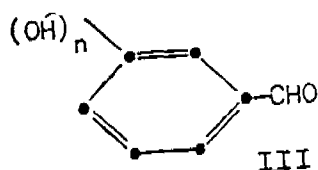
dl-3,5-dihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-3,4-dihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-2,4-dihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-2,3-dihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-3,5-dihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-2,3,4-trihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-3,4,5-trihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-2,4,5-trihydroksimantelihiydroksiamidoksiimi
 dl-metyyli 3,4-dihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-etyyli 3,5-dihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-n-propyyli 2,3-dihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-metyyli 2,3,4-trihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-etyyli 3,4,5-trihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-etyyli 2,3,5-trihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 dl-isopropyyli 2,4,5-trihydroksimantelihiydroksiamidaatti
 3,4-dihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 3,5-dihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,3-dihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,5-dihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,4-dihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,3,4-trihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 3,4,5-trihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,4,5-trihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 2,3,5-trihydroksifenyyliasetamidoksiimi
 etyyli 3,4-dihydroksifenyyliasetamidaatti
 metyyli 2,3-dihydroksifenyyliasetamidaatti
 n-propyyli 3,5-dihydroksifenyyliasetamidaatti
 isopropyyli 2,3,4-trihydroksifenyyliasetamidaatti
 metyyli 3,4,5-trihydroksifenyyliasetamidaatti
 metyyli 2,4,5-trihydroksifenyyliasetamidaatti
 metyyli 2,3,4,5-tetrahydroksifenyyliasetamidaatti
 etyyli 2,3,4,6-tetrahydroksifenyyliasetamidaatti
 metyyli 2,3,4,5,6-pentahydroksifenyyliasetamidaatti
 2,3,4,5-tetrahydroksifenyyliasetamidiini
 2,3,4,6-tetrahydroksibentsyyliasetamidiini
 2,3,5,6-tetrahydroksifenyyliasetamidiini

2,3,4,5,6-pentahydroksifenyyliasetamidiini
 2,3,4,5,6-pentahydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,3,5,6-tetrahydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,3,4,5-tetrahydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 etyyli 2,3,5-trihydroksifenyyliasetamidaatti
 2,3-dihydroksifenyyliasetamidiini
 3,4-dihydroksifenyyliasetamidiini
 3,5-dihydroksifenyyliasetamidiini
 2,4-dihydroksifenyyliasetamidiini
 2,5-dihydroksifenyyliasetamidiini
 2,3,4-trihydroksifenyyliasetamidiini
 3,4,5-trihydroksifenyyliasetamidiini
 2,4,5-trihydroksifenyyliasetamidiini
 2,3,5-trihydroksifenyyliasetamidiini
 3,4-dihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 3,5-dihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,3-dihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,3,4-trihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,3,5-trihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 2,4,5-trihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 3,4,5-trihydroksifenyyliasetohydroksiamidoksiimi
 ja vastaavat.

Edellisen kaavan I mukaiset bentsamidoksiimit ja fenyyli-
 asetamidoksiimit, joissa R' on NOH ja R on NH_2 , voidaan
 valmistaa saattamalla kaavan II mukainen nitrili



jossa m on 0 tai 1 ja R'' on H, reagoimaan hydroksyyliamiinin
 kanssa vesiliuoksessa. Kun R'' on OH ja m on 1, tämä nitrili
 voi olla pysymätön välituote, joka on muodostettu saattamalla
 kaavan III mukainen aldehydi



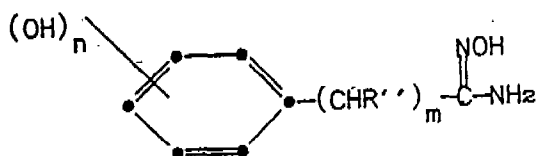
jossa n on 2-5, reagoimaan alkalimetallisyaniidin ja hydroksyyliamiinihydrokloridin seoksen kanssa vesiliuoksessa. Aluksi muodostuu mantelinitriiliä (syanohydriini), mutta tämä reagoi sen jälkeen heti hydroksyyliamiinin kanssa niin, että saadaan haluttu manteliamidoksiimi.

Amidaatit (yhdisteet I, josias R on $O-C_{1-3}$ alkyyli ja R' on NH) voidaan valmistaa saattamalla edellinen nitriili (II) reagoimaan alemman alkanolin (C_{1-3} alkyyli- OH) kanssa, johon on lisätty happoa, kuten HCl -kaasua. Reaktioväliaineen tulisi olla vedettömän ja jotain muuta Lewis-happoa kuin suolahappoa tulisi käyttää.

Edellisessä kahdessa synteesimenetelmässä hyödylliset nitriilit voidaan helposti saada alalla esitetyillä menetelmillä.

2,3,4-trihydroksibentsonitriili, mainitut kolme tetrahydroksibentsonitriiliä ja pentahydroksibentsonitriili ovat kuitenkin uusia, ja niiden synteesi on esitetty seuraavassa yksityiskohtaisesti.

Kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa R on $NHOH$ ja R' on NOH , voidaan valmistaa vastaavasta bentsamidoksiimista, fenyyliasetamidoksiimista tai manteliamidoksiimista



kun n , m ja R' tarkoittavat samaa kuin edellä, saattamalla tämä reagoimaan hydroksyyliamiini-hydrokloridin kanssa. Hydroksi-substituoidut bentsamidiinit, fenyyliasetamidiinit ja manteliamidiinit voidaan valmistaa vastaavasta amidaatista saattamalla reagoimaan etanolipitoisen ammoniakkin kanssa.

Seuraavat yksityiskohtaisemmat esimerkit havainnollistavat tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamista. Muut yhtä hyödylliset niiden valmistusmenetelmät ovat alan ammattimiehille ilmeisiä.

Esimerkki 1

3,4-dihydroksibentsamidoksiimin valmistaminen

30 g 3,4-dihydroksibentsonitriiliä liuotettiin 300 ml:aan vettä, joka sisälsi 25 g hydroksyyliamiinisulfaattia ja joka oli neutraloitu lisäämällä vesipitoista natriumhydroksidia pH-arvoon 8,0. Reaktioseosta sekoitettiin 18 tuntia noin 45°C:ssa. Edellisessä reaktiossa muodostunut 3,4-dihydroksibentsamidoksiimi saostui ja otettiin talteen suodattamalla. Suodatettu amidoksiimi suspendoitiin veteen ja vesisuspensio tehtiin happameksi 12N vesipitoisella suolahapolla noin pH-arvoon 2,0. Happamesta liuoksesta poistettiin väri hiilen avulla ja liuotin poistettiin haihduttamalla. Kiteyttämällä jäännös uudelleen saatiin 3,4-dihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridia, jonka sulamispiste oli noin 193°C (hajoaa).

Analyysi laskettu: C, 41,09; H, 4,43; N, 13,69

 Saatu C, 41,12; H, 4,47; N, 13,69

Titratu ekvivalenttipaino 206 (teoreettinen = 204,6);
saanto = 72 %

Esimerkki 2

3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimin valmistaminen

Noin 7,5 g 3,4,5-trihydroksibentsonitriiliä liuotettiin 200 ml:aan vettä, joka sisälsi 7 g hydroksyyliamiinisulfaattia ja joka oli ennen liuottamista neutraloitu vesipitoisella natriumhydroksidilla noin pH-arvoon 8,0. Liuoksessa oli mukana myös 2 g natriumsulfiittia. Reaktioseosta sekoitettiin 45 °C:ssa noin 18 tuntia, minkä jälkeen tässä reaktiossa muodostunut 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi otettiin talteen. Tuote muunnettiin hydrokloridisuolaksi ja hydrokloridisuola puhdistettiin esimerkin 1 menetelmällä. Näin valmistetun 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridin sulamispiste (hajoaa) oli noin 206 °C (sen jälkeen, kun oli kiteytetty uudelleen isopropanolin ja etyyliasetaatin liuotinseoksesta).

Analyysi: Laskettu: C, 38,11; H, 4,11; N, 12,72

Saatu: C, 38,16; H, 4,16; N, 12,66

Vesipitoisella natriumhydroksidilla titrattu ekvivalenttipaino = 220 (teoreettinen = 220,6); saanto = 80 %

Esimerkki 3

Etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatin valmistaminen

5 g 3,4,5-trihydroksibentsonitriiliä liuotettiin eetteriin. Lisättiin 2,2 ml etanolia. Sen jälkeen liuoksen läpi johdettiin vedetöntä kloorivetykaasua. Edellisessä reaktiossa muodostunut etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti-hydrokloridi saostui. Sakka kiteytettiin uudelleen isopropanolin ja eetterin liuotinseoksesta. Näin valmistettu ja puhdistettu etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti-hydrokloridi sulii noin 172 °C:ssa hajoten.

Analyysi: Laskettu: C, 46,26; H, 5,18; N, 5,99
 Saatu: C, 46,26; H, 5,22; N, 6,00

Natriumhydroksidilla titrattu ekvivalenttipaino = 115,5
 (teoreettinen = 116,8); saanto = 78 %

Etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti voidaan valmistaa neutraloimalla hydrokloridisuola, uuttamalla esteri eetteriin ja poistamalla eetteri haihduttaen.

Esimerkki 4

Etyyli 3,4-dihydroksibentsamidaatin valmistaminen

3,4-dihydroksibentsonitriili muunnettiin esimerkin 3 mukaisesti etyyli 3,4-dihydroksibentsamidaatti-hydrokloridiksi saattamalla tämä reagoimaan kloorivedyn läsnäollessa. Yhdiste sulii 170°C:ssa hajoten sen jälkeen, kun se oli kiteytetty uudelleen isopropanolin ja eetterin liuotinseoksesta; saanto = 65 %

Analyysi: Laskettu: C, 49,67; H, 5,56; N, 6,44
 Saatu: C, 49,91; H, 5,61; N, 6,45

Esimerkki 5

Gallamidiini valmistaminen

Noin 4,5 g etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti-hydrokloridia kuumennettiin 14N vesipitoisen ammoniumhydroksidin ylimäärän kanssa etanoliliuoksessa. Haihtuvat ainesosat poistettiin haihduttamalla ja jäännös, joka sisälsi edellisessä reaktiossa muodostunutta gallamidiinia, liuotettiin alkoholiin. Vapaa gallamidiiniemäs muunnettiin hydrokloridisuolaksi johtamalla alkoholiliuokseen kaasumaista kloorivetyä. Gallamidiini-hydrokloridin sulamispiste oli noin 169°C (hajoaa) sen jälkeen, kun oli kiteytetty uudelleen etanolin ja etyyliasetaatin liuotinseoksesta; saanto = 53 %.

Vesipitoisella natriumhydroksidilla titrattu ekvivalenttipaino
= 203 (teoreettinen 204,5)

Analyysi: Laskettu: C, 41,09; H, 4,43; N, 13,69;
Saatu: C, 40,80; H, 4,47; N, 14,30

Esimerkki 6

3,4-dihydroksibentsohydroksiamidoksiimin valmistaminen

5,5 g:sta 3,4-dihydroksibentsamidoksiimia (esimerkistä
1) valmistettiin liuos mahdollisimman pieneen metanolimäärään.
Lisättiin 3,5 g hydroksyyliamiinihydrokloridia. Reaktioseoksen
annettiin seistä noin 1 päivä noin 50°C:ssa. Haihtuvat
ainesosat poistettiin haihduttamalla. Jäännökseen lisättiin
etyyliasettaattia. Saatu sakka erotettiin suodattamalla
ja suodokseen johdettiin kloorivetykaasua. Näin valmistettu
3,4-dihydroksibentsohydroksiamidoksiimi-hydrokloridi erotettiin
suodattamalla. Yhdiste sulii noin 169°C:ssa hajoten.

Natriumhydroksidilla titrattu ekvivalenttipaino = 219 (teo-
reettinen = 220,5)

Analyysi: Laskettu: C, 38,11; H, 4,11; N, 12,70
Saatu: C, 38,28; H, 4,15; N, 12,61

Esimerkki 7

3,4-dihydroksimanteliamidoksiimin valmistaminen

7,8 g 3,4-dihydroksibentsaldehydiä lisättiin 100 ml:aan
-15°C:ssa pidettyyn vesiliuokseen, joka sisälsi 7,8 g
hydroksyyliamiini-hydrokloridia ja 5,5 g natriumsyanidia.
Reaktioseosta sekoitettiin yön yli noin 0°C:ssa ja sen
jälkeen suodatettiin. Saatiin 4 g edellisessä reaktiossa
muodostunutta 3,4-dihydroksimanteliamidoksiimi-monohydraattia,

sp. 151°C (hajoaa) (ensin poistuu kiteytymisvesi noin 120°C:ssa), saanto = 36 %

Analyysi: Laskettu: C, 44,44; H, 5,60; N, 12,96
 Saatu: C, 44,37; H, 5,65; N, 12,92

Esimerkki 8

2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimin valmistaminen

3,5 g 2,3,4-trihydroksibentsonitriiliä saatettiin esimerkin 2 mukaisesti reagoimaan 60 ml:ssa vettä 4 g:n kanssa hydroksyyliamiinisulfaattia ja 2 g kanssa natriumbisulfiittia pH-arvossa 8,0 (säädetty lisäämällä väkevää vesipitoista natriumhydroksia). Reaktioseos pidettiin ympäristön lämpötilassa noin 1 tunti ja sen jälkeen jäähdytettiin. 2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimi saostui ja sakka otettiin talteen suodattamalla. Suoduskakku liuotettiin laimeaan vesipitoiseen suolahappoon ja saatu liuos suodatettiin aktiivihiiilen läpi. Haihduttamalla haihtuvat ainesosat suodoksesta alipaineessa saatiin 2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimia hydrokloridisuolana, sp. 207°C (hajoaa) sen jälkeen, kun oli kiteytetty metanolin ja etyyliasetaatin liuotinseoksesta; saanto = 9 %.

Analyysi: Laskettu: C, 38,11; H, 4,11; N, 12,72
 Saatu: C, 37,34; H, 4,06; N, 12,43

Seuraavassa esimerkissä on havainnollistettu useimpien tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistamisessa hyödyllisten, lähtöaineina käytettyjen nitriilien valmistaminen, kun lähtöaineena käytetty amidi on saatavissa tai tunnettu.

Valmistusesimerkki I

Lähtöaineena käytettyjen nitriilien valmistaminen

Reaktioseosta, joka sisälsi 23,5 g gallamidia, 180 ml etyyliasetaatia ja 35 ml tionyylikloridia, refluksoitiin noin 18 tuntia. Haihtuvat ainesosat poistettiin haihduttamalla tyhjiössä ja saatu jäännös liuotettiin 215 ml:aan vettä. Tätä vesiliuosta kuumennettiin noin 90°C:ssa, kunnes kaasun kehittyminen lakkasi. Vesiliuos suodatettiin hiilen läpi ja vesi poistettiin suodoksesta haihduttamalla. Saatiin 18 g gallonitriiliä, sp. noin 219°C (hajoaa) (saanto 86 %). Muut lähtöaineina hyödylliset nitriilit voidaan valmistaa samalla tavoin.

Valmistusesimerkki II

2,3,4-trihydroksibentsonitriilin valmistaminen

18,5 g 2,3,4-trihydroksibentsamidia, 20 ml fosforioksikloridia ja 100 ml etyyliasetaatia refluksoitiin 2,5 tuntia. Haihtuvat ainesosat poistettiin tyhjiössä ja jäännös kaadettiin 150 ml:aan jään ja veden seosta. Saatu suspensio kuumennettiin 95°C:een ja sen jälkeen suodatettiin aktiivihiilen läpi. Suodos väkevöitiin noin 50 ml:ksi, jolloin saostui 2,3,4-trihydroksibentsonitriiliä, joka otettiin talteen suodattamalla. Näin valmistetun 2,3,4-trihydroksibentsonitriili-monohydraatin, joka ensin oli kiteytetty uudelleen metanolin ja bentseenin liuotinseoksesta, sulamispiste oli 172°C; saanto = 57 %

Analyysi: Laskettu: C, 49,71; H, 4,17; N, 8,28

Saatu: C, 49,70; H, 4,17; N, 8,27

Valmistusesimerkki III

2,3,4,5-tetrahydroksibentsonitriilin valmistaminen

Mayer'in et al. menetelmällä, Chem.- Ber., 89, 511 (1956), bromattiin 3,4,5-trimetoksisibentsoehappo etyyliasetaatiliuoksessa vettä lisäämättä ja käyttämällä vain 40 % tässä viitteessä mainitusta kloroformitilavuudesta. 23,5 g näin syntetisoitua 2-bromi-3,4,5-trimetoksisibentsoehappoa lisättiin liuokseen, joka oli valmistettu liuottamalla 1 g kupari(II)asetaatia ja 5 g natriumsulfiittia 110 ml:aan vettä, minkä jälkeen lisättiin 27 g natriumhydroksidia. Reaktioseosta, joka oli suspensio, kuumennettiin kiehua noin 6 tuntia. Koska sillä oli taipumus jähmettyä, nestemäisyyden säilyttämiseksi lisättiin vettä. 6 tunnin kuluttua suspensio kaadettiin seokseen, joka sisälsi jäätä ja 120 ml 12N vesipitoista suolahappoa. Tilavuus lisättiin noin 900 ml:ksi vedellä. Sen jälkeen tätä seosta kuumennettiin. Täydellinen liukeneminen tapahtui noin 95°C:ssa, jolloin lisättiin 700 g tioasetamidia ja kuumentamista jatkettiin, kunnes oli muodostunut mustaa kuparisulfidia. Seos suodatettiin hiilen läpi. 3,4,5-trimetoksisalisyylihappo-monohydraatti saostui suodoksesta. Vastaava metyyliesteri valmistettiin mainituksa viitteessä esitetyllä tavalla kuumentamalla 3,4,5-trimetoksisalisyylihappo-monohydraattia metanolissa, joka sisälsi 2 % rikkihappoa.

Edellä valmistettua metyyli 3,4,5-trimetoksisalisylaattia kuumennettiin 4 tuntia 14N vesipitoisessa ammoniumhydroksidissa. Haihtuvat ainekset poistettiin tyhjiössä ja saatu 3,4,5-trimetoksisalisyyliamidi-jäännös kiteytettiin uudelleen vedestä pH-arvossa 5,0. Yhdisteen sulamispiste oli noin 151°C; saanto = 70 % (13,4 g:sta 3,4,5-trimetoksisalisyylihappoa saatiin 9,3 g puhdasta 3,4,5-trimetoksisalisyyliamidia). 7,7 g 3,4,5-trimetoksisalisyyliamidia ja 8 ml fosforioksidikloridia kuumennettiin refluksoiden noin 1 tunti 100 ml:ssa etyyliasetaatia. Haihtuvat ainesosat poistettiin haihduttamalla tyhjiössä ja jäännös, joka sisälsi 3,4,5-trimetoksisalisyyliinitriiliä, liuotettiin veteen, johon oli lisätty hieman etanolia, kunnes liuos oli kirkas 95°C:ssa. Haihtuvat ainekset poistettiin uudelleen tyhjiössä

ja nestemäinen jäännös liuotettiin kuumaan bentseeniin. Jäännös kuivattiin ja liuos käytettiin seuraavassa demetolointivaiheessa enempää puhdistamatta.

Edellä saatu bentseeniliuos laimennettiin 100 ml:ksi bentseenillä ja lisättiin 20 g vedetöntä alumiinikloridia. Reaktioseosta kuumennettiin 2 tuntia refluksointilämpötilassa ja suspensio kaadettiin 12N suolahapon ja jään seokseen. Haihtuvat ainesosat poistettiin tästä seoksesta haihduttamalla ja edellisessä reaktiossa muodostunut 2,3,4,5-tetrahydroksibentsonitriili uutettiin etyyliasetaattiin. Etyyliasetaattiuute kuivattiin, etyyliasetaatti poistettiin ja saatu jäännös kiteytettiin uudelleen vedestä. Saatiin 3 g 2,3,4,5-tetrahydroksibentsonitriiliä, joka hajosi 219°C :ssa. Saanto = 36 % laskettuna lähtöaineena käytetystä 3,4,5-trimetoksisalisyyliamidista.

Analyysi: Laskettu: (1/4 moolia vettä):

C, 48,99; H, 3,02; N, 816

Saatu: C, 49,06; H, 3,23; N, 8,14

2,3,4,5-tetrahydroksibentsamidi valmistettiin hydrolysoimalla varovasti vastaava nitrili väkevässä suolahapossa 60°C :ssa. Amidi saostui vähitellen liuoksesta, joka sisälsi 1,5 g nitriliä 25 ml:ssa suolahappoa. Vedestä kiteyttämisen jälkeen tuote hajosi 290°C :ssa. Saanto = 23 %.

Analyysi: Laskettu: C, 45,41; H, 3,81; N, 7,56

Saatu: C, 44,83; H, 3,88; N, 7,27

Edellistä menettelyä voidaan soveltaa muiden tetrahydroksibentsonitriilien valmistamiseen, vaikkakin mahdollisesti tarvitaan isomeerin erotusmenetelmiä, kun lähtöaineena käytetyssä trimetoksibentsoehapossa on kaksi mahdollista monobromi-substituutiotuotetta. Siten voidaan 2,3,5,6-tetrahydroksibentsonitriili valmistaa 2,3,5-trimetoksi-

bentsoehaposta (epäpuhtautena 2,3,4,5-tetrahydroksibentsonitriiliä). Samoin voidaan 2,3,4,6-tetrahydroksibentsonitriili valmistaa 2,3,4-trimetoksisibentsoehaposta.

Valmistusesimerkki IV

Pentahydroksibentsonitriilin valmistaminen

11,3 g Dallacher'in menetelmällä, Ann., 665, 78-83 (1963), saatua pentametoksisibentsamidia liuotettiin 50 ml:aan etyyliasettaattia, johon oli lisätty 10 ml tionyylikloridia. Reaktio-seosta kuumennettiin refluksoiden noin 3 tuntia. Haihduttamalla haihtuvat ainesosat tyhjiössä saatiin jäännös, joka sisälsi pentametoksisibentsonitriiliä, metanoli/vedestä uudelleen-kiteyttämisen jälkeen sulamispiste 64°C ; saanto = 80 %

Analyysi: Laskettu: C, 56,92; H, 5,97; N, 5,53

Saatu: C, 56,92; H, 5,88; N, 5,49

4,3 g pentametoksisibentsonitriiliä, 12,5 g vedetöntä alumiinikloridia ja 125 ml tolueenia refluksoitiiin 3 tuntia, minkä jälkeen suspensio kaadettiin seokseen, joka sisälsi 50 ml 12N vesipitoista suolahappoa ja 200 g jäitä. Tolueenikerros erotettiin ja tuote otettiin suodattamalla talteen vesikerroksesta. Kiteyttämällä uudelleen etyyliasettaatin ja tolueenin liuotinseoksesta saatiin pentahydroksibentsonitriiliä, joka hajoaa 238°C :ssa ja tätä ennen hieman 220°C :ssa; saanto = 66 %

Analyysi: Laskettu (monohydraattina):

C, 41,80; H, 3,51; N, 6,96

Saatu: C, 42,20; H, 3,54; N, 6,94

Esimerkin 3 mukaisella menetelmällä voidaan vastaavasta nitriilistä valmistaa etyyli-tetrahydroksibentsamidaattia.

Edellisellä menetelmällä voidaan valmistaa myös pentahyd-

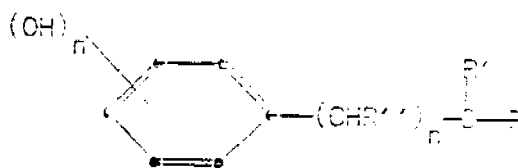
roksibentsamidaattia vastaavasta pentahydroksibentsonitriilistä saattamalla reagoimaan etanolin kanssa vedettömän suolahapon läsnäollessa. Yhdiste muunnetaan hydrokloridisuolaksi ja eristetään sellaisenaan esimerkin 3 mukaisella menetelmällä.

Edellisen kaavan I mukaiset yhdisteet kykenevät inhiboimaan ribonukleotidireduktaasi-entsyymiä, joka osallistuu ribonukleotidien pelkistävään muuntamiseen deoksiribonukleotideiksi. Tämä entsymaattinen reaktio on reaktionopeutta säättävä vaihe biosynteesitiessä, joka johtaa DNA:han ja solun replikoitumiseen. Yleisesti sanoen ribonukleotidireduktaasi-taso korreloi läheisesti solujen replikoitumiseen. Täten ei ole yllättävää, että tämän keksinnön mukaiset yhdisteet, jotka ovat tehokkaita ribonukleotidireduktaasin inhibiittejä, kykenevät myös pidentämään hiirten, joilla on siirrostettuja tuumoreita, elinaikaa, koska myös tuumorisolujen replikoituminen inhiboituu samalla tavoin. Erityisesti olemme havainneet, että edellisen kaavan I piiriin kuuluvan, tämän keksinnön mukaisen yhdisteen antaminen pidentää sellaisten hiirten elinaikaa, jotka on siirrostettu L1210 leukemialla eli tuumorilla, joka tavallisesti ei ole altis kemoterapialle. Yhdisteet ovat lisäksi osoittaneet olevansa aktiivisia P388 leukemiaa ja B16 melanoomaa vastaan.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden biologisten kokeiden tulokset on esitetty jäljempänä tulevassa taulukkosarjassa. Taulukossa I on annettu ribonukleotidireduktaasi-tiedot tyypillisille kaavan I mukaisille yhdisteille. Tässä taulukossa on pystyrivissä 1 annettu bentseenirenkaan substituoitio, pystyrivissä 2 $(\text{CHR}')_m$ -ryhmä, pystyrivissä 3 R' -ryhmä ja pystyrivissä 4 C-R

4 ID_{50} (se mikromoolikonsentraationa annettu inhibiitioannos, joka inhiboi ribonukleotidireduktaasia 50 %) mikromoolina.

Taulukko 1



$(OH)_n$	$(CHR')_m$	R' " $C-R$	ID_{50} μM
3,4	sidos	NOH " $C-NH_2 \cdot HCl$	8
3,4	sidos	NH " $C-OEt \cdot HCl$	12
3,4	sidos	NH " $C-NH_2 \cdot HCl$	20
3,4	sidos	NOH " $C-NHOH \cdot HCl$	40
3,4,5	sidos	NOH " $C-NH_2 \cdot HCl$	5
3,4,5	sidos	NH " $C-OEt \cdot HCl$	15
3,4,5	sidos	NH " $C-NH_2 \cdot HCl$	25
3,4	CHOH	NOH " $C-NH_2 \cdot H_2O$	10
3,4,5	sidos	NOH " $C-NHOH \cdot HCl$	25
2,3,4	sidos	NOH " $C-NH_2 \cdot HCl$	7
2,3	sidos	NOH " $C-NH_2 \cdot HCl$	18

Tässä taulukossa 1 annetussa ID_{50} -arvojen määrittystavassa ribonukleotidireduktaasi puhdistetaan osittain HeLa-soluista tai Ehrlich'in askiittisoluista samanlaisella menetelmällä kuin mitä Elford et al. J. Biol. Chem., 245, 5228 (1970), ovat esittäneet. Entsyymien aktiivisuus määritettiin hieman modifioidulla määrittymenetelmällä, jonka alkuaan oli kehittänyt Reichard et al. ibid., 236, 1150 (1969). Tämä menetelmä mittaa CDP:n muuntumisen dCDP:ksi. Määritysseos (0,34 ml) sisältää 3 uCi 3H /CDP (ominaisuusaktiivisuus 14-19 Ci/mikromooli), 3,3 mikromoolia ATP, 5,9 mikromoolia magnesiumkloridia, 8,8 mikromoolia Hepes'in puskuria, pH = 7,5, 15 mikromoolia ditiotreitolia ja entsyymiproteiinia 0,4 - 1,3 mg. Inkubointi kesti 40 minuuttia $30^{\circ}C$:ssa. Tuote erotetaan substraatista ioninvaihtokromatograafisesti käyttämällä Dowex 50 (H^{+}) hartsia. Inhibiittit liuotettiin veteen ja veden ja enintään 1-prosenttisen etanolin tai 2-prosenttisen dimetyylisulfoksidin seokseen, joista kumpikaan ei inhiboinut entsyymiä näissä konsentraatioissa. Jokainen inhibiitti testattiin vähintään kolmessa konsentraatiossa ja aktiiviset yhdisteet määritettiin uudelleen ainakin yhden kerran. ID_{50} -arvot (mikromooleissa) arvioitiin kunkin yhdisteen kaikkia tuloksia esittävistä käyristä.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden testaus L-1210 lymfoidileukemiaa vastaan suoritettiin seuraavasti: L-1210 leukemia ylläpidettiin viikottain viemällä 10^5 L-1210 solua intraperitoneaalisesti DBA/2-hiiriin. $B6D_{2F_1}$ naarashiirille, joiden paino oli noin 20 g, annettiin 0,1 ml (10^5 solua) laimennettua askiittinestettä ip. Lääkkeet annettiin ip 24 tuntia tuumorin siirrostaamisen jälkeen ja ruiskeiden antamista jatkettiin päivittäin yhteensä 8 päivän ajan. Hiirten vertailuryhmälle annettiin vain injektio-mediumia. Seuraavassa taulukossa 2 on annettu eräiden tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden tuumorinvastainen aktiivisuus L-1210 leukemiaa vastaan. Taulukon pystyrivissä 1 on annettu yhdisteen nimi, pystyrivissä 2 annos mg/kg:na ja pystyrivissä 3 elinajan prosentuaalinen kasvu vertailuihin nähden jokaisella annosmäärällä.

Taulukko 2

TUUMORIN VASTAINEN AKTIIVISUUS L1210 LEUKEMIASSA

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Amos, mg/kg</u>	<u>Linajan lisäys, %</u>
3,4-dihydroksibentsamidoksiimi - HCl	157	132,0
	200	43,5
	238	46,9
	300	73,9
3,4,5-dihydroksibentsamidoksiimi - HCl	59	90,0
	132	54,5
	196	toksinen
	220	63,6
	275	30,6
2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimi - HCl	100	38,9
	200	36,1
	218	67,7
	300	toksinen
Etyyli 3,4-dihydroksibentsamidaatti - HCl	218	toksinen
	327	toksinen
	435	toksinen
Etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti - HCl	300	42,3
	450	58,4
3,4-dihydroksibentsamidiini - HCl	52	26,8
	100	58,3
	104	34,1
	200	41,7
	300	47,2
	400	47,8
	603	83,0

Taulukko 2 (jatk.)

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Amos, mg/kg</u>	<u>Elinaajan lisäys, %</u>
3,4,5-trihydroksibentsamidiini - HCl	200 300	4,35 10,2
3,4-dihydroksibensohydroksiamidoksiimi - HCl	155 200 300	39,0 47,8 41,3
3,4,5-trihydroksibentsohydroksiamidoksiimi - HCl	100 200 300	47,2 55,6 63,9
3,4-dihydroksibentsohydroksinanteli- amidoksiimi - H ₂ O	435 606	45,2 45,2
2,3-dihydroksibentsamidoksiimi - HCl	300	toksinen

Toisessa koesarjassa testattiin 3,4-dihydroksibentsamidoksiimia ja 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimia erilaisia siirrostettuja tuumoreita vastaan hiirillä seuraavan menetelmän mukaisesti:

L-1210 lymfoidi-leukemia-kokeessa 20 g CDF₁ tai BDF₁ hiiret injisoitiin ip 10⁵ leukemiasolulla. Lääke annettiin yhden päivän kuluttua tuumorin siirrostaamisesta ja lääkkeen antamista jatkettiin vielä 8 päivää. Käsiteltyjen eläinten keskimääräistä elinaikaa verrattiin vertailuryhmän vastaavaan arvoon. Taulukossa 3 on esitetty tämän kokeen tulokset mainitulla kahdella yhdisteellä. Taulukon pystyrivissä 1 on annettu yhdisteen nimi, pystyrivissä 2 annostusmäärät ja pystyrivissä 3 käsiteltyjen eläinten prosentuaalinen elinaika vertailuun nähden. (Ts. luku 175 tarkoittaa 75 % elinajan pitenemistä).

Taulukko 3

Aktiivisuus vs L-1210 Leukemiassa

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Annos mg/kg</u>	<u>t/c%</u>
3,4-dihydroksibentsamidoksiimi.HCl	400	toksinen, 200* 202
	300	113
	200	175, 128, 155, 186
	100	128, 132, 141, 133
	50	137, 117, 132, 146
	25	130
3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi.HCl	200	212, 182
	100	152, 137
	50	138, 137
	25	136, 121

* t/c%-arvot yli 130 ovat merkitseviä

Lääkkeillä käsiteltiin myös melanoottista B₁₆ melanoomaa. Tämän tuumorin vastainen testausmenetelmä on seuraava:

0,5 ml tuumorihomogenaattia, joka oli valmistettu homogenisoimalla 1 g tuumoria 10 ml:n kanssa kylmää (balanced) liuosta, siirrostetaan ip 10 B₆C₃F₁ hiiren ryhmiin. Lääkettä annetaan päivittäin yhteensä 9 päivän ajan lähtien yhden päivän kuluttua tuumorin siirrostamisesta. Tulokset on ilmoitettu käsitellyn ryhmän keskimääräisenä elinaikana prosentteina vertailuryhmään (T/C) nähden. Seuraavassa taulukossa 4 on annettu tämän kokeen tulokset.

Taulukko 4

Aktiivisuus vs B₁₆ melanoomassa

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Annos mg/kg</u>	<u>I/C%</u>
3,4-dihydroksibentsamidoksiimi.HCl	400	117
	200	134
	100	129
	50	127
	25	119
Etyyligallamidaatti	800	toksinen
	400	124, 156, 137
	200	121, 125, 122
	100	121, 109, 107
	50	109, 104
	25	105

* I/C%-arvot yli 120 ovat merkitseviä.

Yksi tämän keksinnön mukainen yhdiste testattiin myös kiinteällä paksusuolen tuumorilla (colon 38). Tuumori siirrostettiin subkutaanisti ja lääke injisoitiin intraponeaalisesti kaksi kertaa päivässä päivänä kaksi (seitsemän tunnin välein) ja kaksi kertaa päivänä yhdeksän. Tuumorin halkaisijasta arvioitu keskimääräinen tuumorin paino mittaa tuumorin inhibiitiota. Tämä mitattiin päivänä 20. Käsitellyn ryhmän keskimääräinen tuumorin paino vertailuun nähden on T/C%. Seuraavassa taulukossa 5 on annettu tämän kokeen tulokset.

Taulukko 5

Aktiivisuus vs Colon 38

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Annos mg/kg</u>	<u>I/C%</u>
3,4-dihydroksibentsamidoksiimi.HCl	800	87

Pienemmät annokset olivat tehottomia.

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet olivat myös jonkin verran aktiivisia P388 leukemiaa vastaan. Käytettiin seuraavaa menetelmää:

CDF₁ hiiret injisoitiin 10^6 solulla. Lääke annettiin ensimmäisenä päivänä siirrostimisen jälkeen ja antamista jatkettiin päivittäin viisi hoitokertaa. Käsitellyn ryhmän keskimääräinen elinaika verrattuna käsittelemättömään vertailuryhmään on $T/C \times 100 = T/C\%$. Seuraavassa taulukossa 6 on annettu näiden määritysten tulokset.

Taulukko 6

Aktiivisuus vs P388 Leukemia

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Annos mg/kg</u>	<u>I/C%*</u>
3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi-HCl	400	toksinen
	300	163
	200	155, 155, 177
	100	150, 154, 138, 148
	50	142, 138, 141
Etyyyligallamidaatti	400	149, 160
	200	139, 123
	100	129, 128
	50	114
	25	112
	12,5	104

* I/C%-arvoja yli 130 pidetään merkitsevinä.

Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden antineoplastisen aktiivisuuden uskotaan osittain johtuvan niiden kyvystä siepata vapaita radikaaleja. Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet ovat lisäksi syövältä suojaavia aineita ja tämä kyky myös voi olla osoitus niiden vapaita radikaaleja sieppaavasta ominaisuudesta. Vapaita radikaaleja sieppaavat aineet voivat olla myös hyödyllisiä sellaisten nisäkkäiden detoksifioinnissa, joissa vapaiden radikaalien ylimäärä on toksisuuden syy tai sen seuraus. Vapaita radikaaleja sieppaavien aineiden muita mahdollisia käyttötapoja ovat protaglandiinin transformaation inhibointi, leukotrieenin interkonversio ja lipogeneesi, toimiminen tulehdusmodulaattoreina ja elintarvikkeiden lisäaineina tai säilytysaineina, jotka estävät lipidien hapettumista. Tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden vapaita radikaaleja sieppaava kyky määritettiin mittaamalla stabiilin vapaan radikaalin, difenyylipikryylihydratsyylin, tuhoutuminen testattavan yhdisteen läsnäollessa Venker'in ja Herzmann'in raporttoimalla tavalla, Naturwiss, 47, 133-134 (1960). Gilford-spektrofotometrillä mitattiin vapaan radikaalin eli difenyylipikryylihydratsyylin 100 μ m liuoksen 518 nM absorbanssi asetonissa. Testattavaa yhdistettä lisättiin 25 μ m loppukonsentraatiossa ja seurattiin 518 nM absorption pienenemismennopeutta. Seuraavassa taulukossa 7 on annettu tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden vapaita radikaaleja sieppaavat kyvyt ilmoitettuna optisen tiheyden pienenemisen alkunopeutena yksikköinä/min.

Taulukko 7

KYKY SIEPATA VAPAITA RADIKAALEJA

<u>Yhdiste</u>	Alku- Δ -yksikköä/min.* (518 nm)
3,4-dihydroksimanteliamidoksiimi	0,383
3,4-dihydroksibentsamidoksiimi.HCl	0,718
3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi.HCl	0,929
Etyyli 3,4,5-trihydroksibentsamidaatti.HCl	3,730
Etyyli 3,4-dihydroksibentsamidaatti.HCl	0,706
3,4-dihydroksibentsamidiini.HCl	1,721
3,4,5-trihydroksibentsohydroksiamidoksiimi.HCl	0,882
3,4,5-trihydroksibentsamidiini.HCl	4,912

* Alkuabsorbanssin yhden optisen tiheysyksikön suuruinen pieneneminen /minuutti, 518 nm, kun yhdistettä lisättiin 2,5 μ m.

Tämän keksinnön mukaisen yhdisteen vapaita radikaaleja sieppaava kyky mitattiin lisäksi käyttämällä synnytettyä vapaata tyrosiiniradikaalia. Todisteet viittaavat siihen, että vapaata tyrosiiniradikaalia muodostuu nisäkkäiden ribonukleotidireduktaasi-entsyymin osana ribonukleotidien muuntuessa deoksiribonukleotideiksi --kts. L. Åkerblom, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2159-2163 (1981). Menetelmä, jolla vapaa tyrosiiniradikaali synnytettiin ja hävitettiin tämän keksinnön mukaisella yhdisteellä, toteutettiin Brunel Yliopistossa (Oxbridge, Englanti) suoritetuissa pulssiradiolyysi-kokeissa. Näissä kokeissa käytettiin lineaarista Brunel 4 MeV kiihdytintä, 1,5 cm optista kyvettä ja 200 ns pulssia, jonka tuottama annos oli noin 1 krad mitattuna tiosyanaattiannostuksen avulla. Ennen käyttöä kaikki liuokset huuhdeltiin typellä käyttämällä tekniikkaa, jossa ilma poistettiin ruiskun avulla. Yksityiskohtainen kuvaus menetelmistä on esitetty R.L. Wilson'in artikkelissa,

Chemistry and Industry, 183-193 (1977).

Tyrosiiniradikaalin synnyttämiseksi käytettiin natriumatsidia pulssiradiolyysillä synnytetyn vapaan elektronin ja tyrosiinin välillä. Kyvyn, jolla nämä yhdisteet sieppaavat vapaan tyrosiiniradikaalin, referenssinä käytettiin hydroksiureaa, koska hydroksiurean aiheuttama ribonukleotidi-reduktaasin inhibiition katsotaan johtuvan sen kyvystä siepata nisäkkään aktiivisen ribonukleotidireduktaasin vapaa radikaali. --Kts. Åkerblom et al (loc.cit.). Kts. myös I.K. Larsen et al., Eur. J. Biochem, 125, 75-81 (1982). Hydroksiurealle määritettiin nopeusvakioksi $1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ja 3,4-dihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridille $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ts. 3,4-dihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridi oli 100+ kertaa nopeampi vapaan tyrosiiniradikaalin sieppari kuin hydroksiurea.

Uusilla nitrileillä ja amideilla, joita käytetään tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden synteessin lähtöaineina (kaava I, jossa n on 4 tai 5), on ribonukleotidi-reduktaasi-aktiivisuutta ja myös ne ovat aktiivisia vapaita radikaaleja sieppaavia aineita, vaikkakin ne ovat pääasiallisesti hyödyllisiä välituotteina.

Seuraavassa taulukossa 8 on annettu näiden uusien nitriliin tuumorien vastaiset tiedot vs L-1210 ja P-388 leukemiaa vastaan.

Taulukko 8
Leukemian vastainen aktiivisuus

L1210

<u>Yhdisteen nimi</u>	<u>Annos mg/kg</u>	<u>Elinajan lisäys</u>
3,4-dihydroksibentsonitriili	47,6	4,7
	95,2	15,6
	196	toksinen
2,3,4-trihydroksibentsonitriili	50	11,0
	100	26,0
	155	12,1
	259	toksinen
	327	toksinen
3,4,5-trihydroksibentsonitriili	118	34,0
	157	28,0
2,3,4,5-tetrahydroksibentsonitriili	163	48,4
	230	toksinen
Pentahydroksibentsonitriili	34,3	14,2
	51,5	0
	77,2	toksinen
	116,0	toksinen

P-388

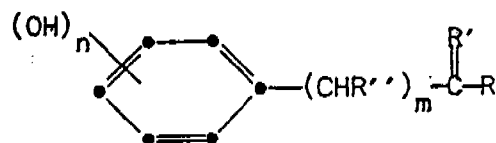
3,4,5-trihydroksibentsonitriili	400	126
	200	126, 139
	100	119, 139
	50	115, 120

39

Tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä annetaan parenteraalisesti neoplastisesta taudista kärsiville nisäkkäille, parhaiten käyttämällä lääkkeen vesiliukoista suolaa. Parhaana antamistienä pidetään lääkesuolan isotonisen suolaliuoksen injisointia intravenöösisti.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ribonukleotidireduktaasin inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että nisäkkäälle, jolla on tuumori ja suhteellisen korkea ribonukleotidireduktaasi-taso, annetaan ribonukleotidireduktaasia inhiboimaan kykenevä määrä seuraavan kaavan mukaista yhdistettä



jossa n on 2-5, m on 0 tai 1, R' on NOH tai NH, R on NH₂ tai NHOH, kun R' on NOH; R on NH₂ tai O-C₁₋₃ alkyylili, kun R' on NH; ja R'' on H tai OH, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää happoadditiosuolaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan 3,4-dihydroksibentsamidoksiimia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimia.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että annetaan etyylligallamidaattia.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kaksi fenyyliirenkään OH-ryhmistä on visuaalisia.

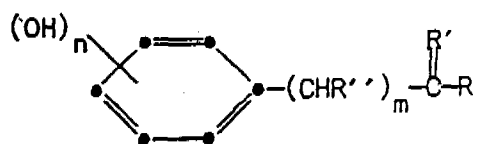
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että n on 2 tai 3 ja R on NHOH.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että m on 0.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R on NOH.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että annetaan 3,4-dihydroksibentsamidiinia.

10. Yhdiste, jonka kaava on



jossa n on 2-5, m on 0 tai 1, R' on NH tai NOH, R on NH₂ tai NOH; kun R' on NOH; R on NH₂ tai O-C₁₋₃ alkyyli; kun R' on NH; R'' on H tai OH, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä happoadditiosuola.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4-dihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridi.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi-hydrokloridi.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on etyyli-gallamidaatti.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 2,3,4-trihydroksibentsamidoksiimi.

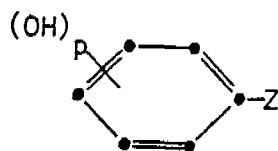
15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4,5-trihydroksibentsamidoksiimi.

16. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4-dihydroksibentsamidiini.

17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4-dihydroksibentsohydroksi-amidoksiimi.
18. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että yhdiste on 3,4,5-trihydroksibentsohydroksi-amidoksiimi.
19. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että n on 3 ja kolme hydroksyyliä ovat 2-, 3- ja 4-asemissa.
20. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että n on 2 ja hydroksyyliä ovat 2- ja 3-asemissa.
21. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen yhdisteen hydrokloridisuola.
22. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että hydroksyyleistä kaksi on visinaalisia.
23. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että n on 2 ja kaksi hydroksyyliä ovat 3- ja 4-asemissa.
24. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että n on 3 ja kolme hydroksyyliä ovat 3-, 4- ja 5-asemissa.
25. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että n on 2 tai 3, kaksi hydroksyyliä on visinaalisia ja m on 0.
26. Menetelmä vapaiden radikaalien sieppaamiseksi in vivo, tunnettu siitä, että hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle, jolla on tautitila, johon liittyy ylimääräistä

vapaiden radikaalien muodostumista, annetaan tehokas annos patenttivaatimuksen 10 mukaista yhdistettä.

27. Yhdiste, jonka kaava on



jossa p on 4 tai 5 ja Z on CN tai CONH₂.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että yhdiste on 2,3,4,5-tetrahydroksibentsonit-
riili.

29. Patenttivaatimuksen 27 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että yhdiste on pentahydroksibentsonitriili.

30. Patenttivaatimuksen 27 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että yhdiste on 2,3,4,5-tetrahydroksibentsamidi.

31. Menetelmä leukemian hoitamiseksi nisäkkäillä, t u n -
n e t t u siitä, että hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle,
joka kärsii leukemiasta, annetaan leukemian vastainen annos
patenttivaatimuksen 10 mukaista yhdistettä.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että annetaan 3,4-dihydroksibentsamidoksiimia.

33. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että annetaan 3,4,5-trihydroksi-
bentsamidoksiimia.

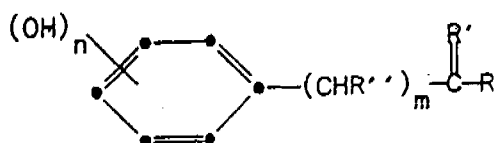
34. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että annetaan 3,4-dihydroksibentsamidiinia.

35. Parenteraaliseen antamiseen tarkoitettu farmaseuttinen formulaatio yksikköannostusmuodossa, joka sisältää patenttivaatimuksen 10 mukaista yhdistettä ja yhtä tai useampaa farmaseuttisesti hyväksyttävää apuainetta.

36. Menetelmä leukemian hoitamiseksi nisäkkäillä, t u n - n e t t u siitä, että hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle, joka kärsii leukemiasta, annetaan leukamian vastainen annos patenttivaatimuksen 27 mukaista yhdistettä.

Patentkrav

1. Förfarande för inhibering av ribonukleotidreduktas, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett däggdjur, som har en tumör med en relativt hög ribonukleotidreduktasnivå, ges en tillräckligt stor mängd av en förening med följande formel, för inhibering av ribonukleotidreduktas,



i vilken formel n är 2-5, m är 0 eller 1, R' är NOH eller NH, R är NH₂ eller NHOH, då R' är NOH; R är NH₂ eller O-C₁₋₃alkyl, då R' är NH:, och R är H eller OH, eller dess farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalt.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4-dihydroxibensamidoxim.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4,5-trihydroxibensamidoxim.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges etylgallamidat.

5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att två av OH-grupperna i fenylringen är vicinala.

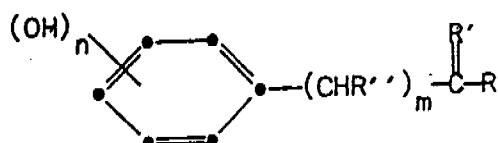
6. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 2 eller 3 och R är NHOH.

7. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att m är 0.

8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att R är NHOH.

9. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4-dihydroxibensamidin.

10. En förening med formeln



där n är 2-5, m är 0 eller 1, R' är NH eller NOH, R är NH₂ eller NHOH, då R' är NOH; R är NH₂ eller O-C₁₋₃alkyl, då R' är NH; R'' är H eller OH, eller dess farmaceutiskt godtagbara syraadditionssalt.

11. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4-dihydroxibensamidoximhydroklorid.

12. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4,5-trihydroxibensamidoximhydroklorid.

13. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är etylgallamidat.

14. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 2,3,4-trihydroxibensamidoxim.

15. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4,5-trihydroxibensamidoxim.

16. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4-dihydroxibensamidin.

17. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4-dihydroxibenshydroxiamidoxim.

18. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att föreningen är 3,4,5-trihydroxibensohydroxiamidoxim.
19. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 3 och de tre hydroxylerna är i 2-, 3- och 4-ställning.
20. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 2 och hydroxylerna är i 2- och 3-ställning.
21. Ett hydrokloridsalt av en förening enligt patentkrav 10.
22. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att två av hydroxylerna är vicinala.
23. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 2 och de två hydroxylerna är i 3- och 4-ställning.
24. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 3 och de tre hydroxylerna är i 3-, 4- och 5-ställning.
25. En förening enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att n är 2 eller 3, två hydroxyler är vicinala och m är 0.
26. Ett förfarande för isolering av fria radikaler in vivo, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett däggdjur, som har ett sjukdomstillstånd av överskottsbildning av fria radikaler och som behöver behandling, ges en effektiv dos av en förening enligt patentkrav 10.
27. En förening med formeln

där p är 4 eller 5 och Z är CN eller CONH_2 .

28. En förening enligt patentkrav 27, k ä n n e t e c k n a d därav, att föreningen är 2,3,4,5-tetrahydroxibensnitril.

29. En förening enligt patentkrav 27, k ä n n e t e c k n a d därav, att föreningen är pentahydroxibensnitril.

30. En förening enligt patentkrav 27, k ä n n e t e c k n a d därav, att föreningen är 2,3,4,5-tetrahydroxibensamid.

31. Ett förfarande för skötsel av leukemi hos däggdjur, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett däggdjur, som lider av leukemi och som behöver behandling, ges en antileukemidos av en förening enligt patentkrav 10.

32. Ett förfarande enligt patentkrav 31, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4-dihydroxibensamidoxim.

33. Ett förfarande enligt patentkrav 31, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4,5-trihydroxibensamidoxim.

34. Ett förfarande enligt patentkrav 31, k ä n n e t e c k n a t därav, att ges 3,4-dihydroxibensamidin.

35. En farmaceutisk formulering i enhetsdosform för att ges parenteralt, innehållande en förening enligt patentkrav 10 tillsammans med ett eller flera farmaceutiskt godtagbara hjälpämnen.

36. Ett förfarande för skötsel av leukemi hos däggdjur, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett däggdjur, som lider av leukemi och som behöver behandling, ges en antileukemidos av en förening enligt patentkrav 27.