



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 289 521 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 C 317/32 C 07 D 333/10
C 07 D 207/09 C 07 D 213/36
C 07 D 487/08 A 61 K 31/10
C 07 D 241/04 A 61 K 31/155
C 07 D 401/04

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 07 C / 328 703 8	(22)	18.05.89	(44)	02.05.91
(31)	07/195,930	(32)	19.05.88	(33)	US

(71)	siehe (73)
(72)	Lin, Yang I; Shang-Wang, Bosco; Ruzalla-Mallon, Veronica M.; Bitha, Panayota; Fields, Thomas L., US
(73)	AMERICAN CYANAMID COMPANY, 1937 West Main Street, Stamford, Conn. 06904-0060, US
(74)	vormals Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, O - 1130 Berlin, DE

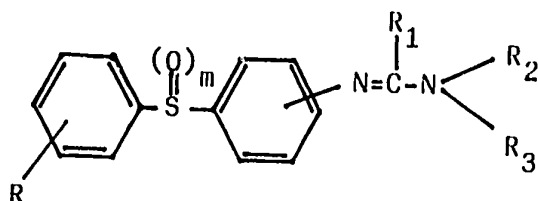
(54) **Verfahren zur Herstellung von Modulatoren des Immunreaktionssystems**

(55) Verfahren; Herstellung; Modulatoren; Immunreaktionssystem; Säugetiere; Diphenylsulfone; Diphenylsulfide; Diphenylsulfoxide

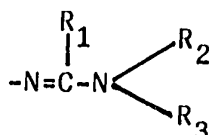
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Modulatoren des Immunreaktionssystems, insbesondere zur Herstellung neuartiger Diphenylsulfone, Diphenylsulfide und Diphenylsulfoxide. Die Verbindungen sind aktiv bei der Behandlung des Immunreaktionssystems von Säugetieren.

Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Modulatoren des Immunreaktionssystems mit der Formel:

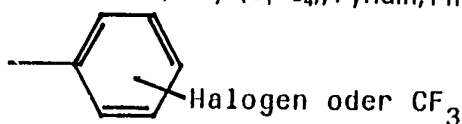


worin R gleich Wasserstoff, Halogen, eine Aminogruppe oder eine Komponente ist mit der Formel:



m gleich 0, 1 oder 2 ist;

R₁ gleich Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₄), Pyridin, Phenyl,

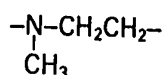


oder Thienyl ist; unter der Voraussetzung, daß, wenn R₁ Wasserstoff ist, R₂ und R₃ nicht beide Wasserstoff oder ein niederes Alkyl sind oder R₂ und R₃ zusammen mit dem assoziierten Stickstoff nicht gleich Pyrrolidin, Piperidin oder Morpholin sind, und wenn R₁ gleich Phenyl ist, R₂ und R₃ nicht beide Wasserstoff sein können;

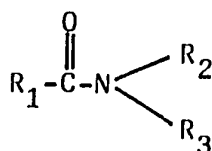
R₂ gleich Wasserstoff oder Alkyl (C₁-C₄) ist;

R₃ gleich Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₄), Phenyl oder N,N-dimethylanilin ist;

R₁ und R₂ zusammen gleich -(CH₂)_n- sind, wobei n eine ganze Zahl zwischen 2 und 4 ist, oder R₁ und R₂ zusammen eine Komponente bilden mit der Formel:



wobei R₃ gleich CH₃ ist; R₂ und R₃ zusammen mit dem assoziierten Stickstoff gleich Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin, Thiomorpholin, 4-Methylpiperazin, 3-Azabicyclo[3.2.2]nonyl, 2-Pyridylpiperazin oder 4-Fluorophenylpiperazin sind und deren pharmazeutisch akzeptable Salze, dadurch gekennzeichnet, daß ein Amid mit der Formel:

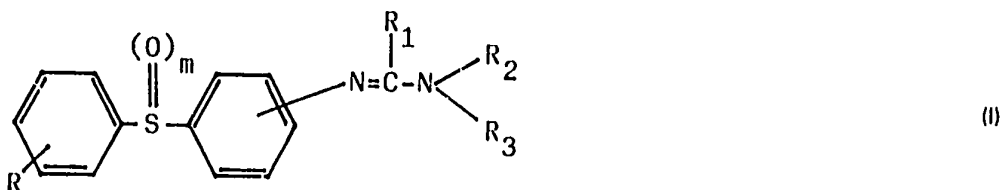


worin R₁, R₂ und R₃ wie oben definiert sind, bei etwa 0°C-10°C mit Phosphoroxychlorid in Azetonitril behandelt wird und anschließend eine hemimolare Menge an 4-Aminophenylsulfon oder eine äquimolare Menge an 4-(4-Halophenylsulfonyl)anilin zugesetzt und das resultierende Reaktionsgemisch gerührt werden, gefolgt von der Abtrennung des gewünschten Produktes aus dem Reaktionsgemisch.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

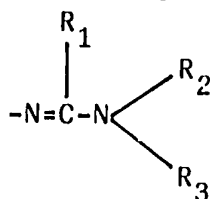
Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Modulatoren des Immunreaktionssystems, insbesondere von neuartigen Diphenylsulfiden, Diphenylsulfoxiden und Diphenylsulfonen, die durch folgende Strukturformel dargestellt werden können:



worin m gleich 0, 1 oder 2 ist;

R gleich Wasserstoff, Halogen, eine Aminogruppe oder eine Komponente ist mit der Formel:



worin R₁ gleich Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₄), Pyridin, Phenyl,

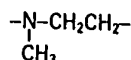


oder Thienyl ist, unter der Voraussetzung, daß, wenn R₁ Wasserstoff ist, R₂ und R₃ nicht Wasserstoff oder ein niederes Alkyl sein können oder R₂ und R₃ zusammen mit dem assoziierten Stickstoff nicht Pyrrolidin, Piperidin oder Morpholin sein können, und wenn R₁ gleich Phenyl ist, R₂ und R₃ nicht Wasserstoff sein können;

R₂ gleich Wasserstoff oder Alkyl (C₁-C₄) ist;

R₃ gleich Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₄), Phenyl oder N,N-Dimethylanilin ist;

R₁ und R₂ zusammen gleich -(CH₂)_n sein können, wobei n eine ganze Zahl zwischen 2 und 4 ist, oder R₁ und R₂ zusammen eine Komponente bilden können mit der Formel:



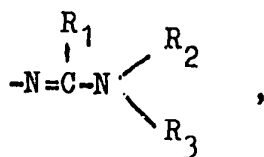
wobei R₃ gleich Methyl ist;

R₂ und R₃ zusammen mit dem assoziierten Stickstoff Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin, Thiomorpholin, 4-Methylpiperazin, 3-Azabicyclo[2.2.2]nonyl, 2-Pyridylpiperazin oder 4-Fluorophenylpiperazin sein können und deren pharmazeutisch akzeptable Salze.

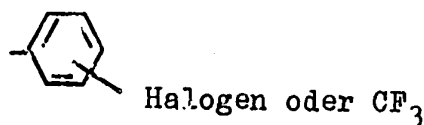
Die neuartigen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können als hellgelbe bis farblose, kristalline Stoffe mit charakteristischen Schmelzpunkten und Absorptionsspektren gewonnen werden.

Die organischen Basen dieser Erfindung bilden nichttoxische Säurezusatzsalze mit einer Reihe von pharmakologisch akzeptablen, organischen und anorganischen, salzbildenden Reagentien. So werden Säurezusatzsalze, die durch Mischung der freien organischen Base mit einem oder zwei Äquivalenten einer Säure, vorteilhaft in einem neutralen Lösungsmittel, gebildet werden, mit solchen Säuren wie Schwefel-, Phosphor-, Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Sulfamin-, Zitronen-, Milch-, Weinstein-, Essig-, Benzoe-, Glukon-, Ascorbinsäure und ähnlichen hergestellt. Zum Zwecke dieser Erfindung sind die freien Basen ihren nichttoxischen Säurezusatzsalzen äquivalent.

Die neuartigen Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind als Modulatoren des Immunreaktionssystems von Säugetieren aktiv, wie nachstehend anhand von Tierversuchen demonstriert wird. Demzufolge betrifft die Erfindung eine Methode zur Modulation des Immunreaktionssystems von warmblütigen Tieren durch den Einsatz von Verbindungen mit der Formel (I), worin m gleich 0, 1 oder 2 ist; R gleich Wasserstoff, Halogen, eine Aminogruppe oder eine Komponente ist mit der Formel:

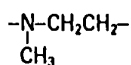


R₁ gleich Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₄), Pyridin, Phenyl,



oder Thienyl ist;

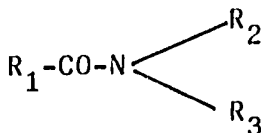
R_2 gleich Wasserstoff oder Alkyl (C_1-C_4) ist;
 R_3 gleich Wasserstoff, Alkyl (C_1-C_4), Phenyl oder *N,N*-dimethylanilin ist;
 R_1 und R_2 zusammen gleich $-(CH_2)_n-$ sein können, wobei n eine ganze Zahl zwischen 2 und 4 ist, oder R_1 und R_2 zusammen eine Komponente bilden mit der Formel:



worin R_3 gleich Methyl ist;
 oder R_2 und R_3 zusammen mit dem assoziierten Stickstoff gleich Pyrrolidin, Piperidin, Morpholin, Thiomorpholin, 4-Methylpiperazin, 3-Azabicyclo[3.2.2]nonyl, 2-Pyridylpiperazin oder 4-Fluorophenylpiperazin ist; mit pharmazeutischen Zusammensetzungen von Substanzen, welche diese Verbindungen enthalten, und mit chemischen Methoden zu ihrer Herstellung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die US-PS 3073851 beschreibt die Herstellung von Formamidinen primärer Amine bei Reaktion eines nichtaliphatischen primären Amins mit Formamid oder einem niederen Alkylformamid in Anwesenheit von einem Arylsulfonylhalogenid oder Thionylhalogenid. Aber es wird nicht offenbart deren Herstellung bei Anwesenheit von Verbindungen der Formel



worin R_1 etwas anderes als Wasserstoff bedeutet.

Die DE-OS 3343815 offenbart die Herstellung von Bisamidindiphenyl-Verbindungen mit Phosphoroxychlorid und einer substituierten Amidinverbindung, aber sie beschreibt nicht die Herstellung von Diphenylsulfid, -sulfonen und -sulfoxiden gemäß der vorliegenden Erfindung.

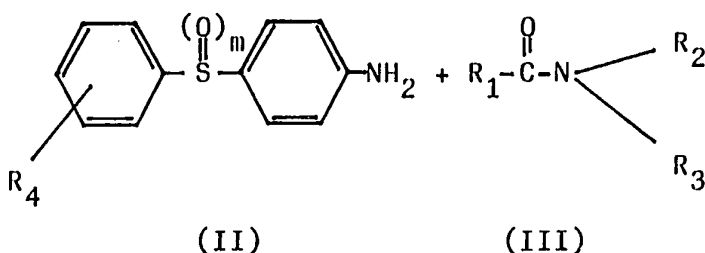
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, dazu beizutragen, neue Verbindungen, insbesondere für eine wirksame Behandlung von Immunschwäche bereitzustellen und damit zugleich ein neues therapeutisches Herangehen zur Behandlung von Krebs zu unterstützen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein rationelles Verfahren auf der Basis substituierter Amide für die Herstellung neuartiger Verbindungen für die Modulation des Immunreaktionssystems zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die neuartigen Verbindungen leicht nach folgendem Reaktionsschema hergestellt werden können:



wobei R_4 gleich Wasserstoff, Halogen oder eine Aminogruppe ist, und R_1 , R_2 , R_3 und m wie oben definiert sind.

Nach dem vorstehenden Reaktionsschema wird ein in geeigneter Weise substituiertes Amid (III) zwischen 0°C und etwa 10°C in trockenem Azetonitril mit Phosphoroxychlorid behandelt und dann eine Stunde oder länger gerührt, bis die Temperatur auf Zimmertemperatur ansteigt. Dann wird dem Reaktionsgemisch eine hemimolare Menge an 4-Aminophenylsulfon (4',4'-Sulfonyldianilin) (II) oder eine äquimolare Menge an 4'-(4-Halophenylsulfonyl)anilin (II) zugesetzt und zunächst einige Stunden weiter bei Zimmertemperatur und anschließend 2 bis 16 Stunden bei 60°C gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch in Wasser gegossen und basisch gestellt, und das ausgefällte Produkt wird durch Filtern aufgefangen und rekristallisiert.

Die Anwendung von Immunomodulatoren und chemotherapeutischen Adjuvantien stellt eine neue therapeutische Methode zur Behandlung von Immunschwächen und Krebs dar und basiert auf der Konzeption, daß in oder an den meisten Tumorzellen distinktive Antigene (embryonale oder Transplantations-Antigene) sind, welche diese von normalen Wirtszellen unterscheiden.

Eine Mehrzahl von Tumورimmunologen vertritt die Ansicht, daß sich ständig potentiell maligne Zellen herausbilden, diese auf Grund ihrer „Fremdheit“ normalerweise aber durch ein kompetentes humorales oder zelluläres Immunsystem ausgeschaltet werden. Gelegentlich aber „entweichen“ Tumorzellen dieser Überwachung durch das Immunsystem und reproduzieren sich weiter, und es entsteht Krebs. Der Grund für das Versagen des normalerweise effizienten Immunüberwachungsmechanismus ist noch nicht vollständig klar, es wird jedoch angenommen, daß das Immunsystem mit zunehmendem Alter weniger effektiv wird. Es wird auch bei bestimmten genetischen Immunschwächekrankheiten, bei verschiedenen bakteriellen, Pilz- oder Vireninfektionen und bei Patienten unterdrückt, die einer Immunsystemunterdrückungstherapie unterzogen werden. Das Wachstum des Neoplasmas selbst wie auch die verschiedenen therapeutischen Modalitäten zur Behandlung der Krankheit, z. B. zytotoxische Chemotherapie und Bestrahlung, führen zu einer noch stärkeren Depression der Wirtsresistenz und zu einer erhöhten Anfälligkeit sowohl gegenüber exogenen als auch endogenen Infektionen, und sie sind vielleicht verantwortlich für den Wiederbeginn des Tumorzustands und von Metastasen, die oft auf die behandlungsinduzierte Tumorremission folgen. Dieses Verhältnis zwischen dem Immunsystem und dem Tumorzustand wurde durch experimentelle Untersuchungen und klinische Beobachtungen unterstützt. Law, L. W., *Nature*, **205**, 672–673 (1965) beobachtete einen ausgeprägten Anstieg an auftretenden Polyoma-Tumoren bei thymektomisierten, immunkompromittierten Mäusen. Bei klinischen Beobachtungen stellten Gatti, R. A., und Good, R. A., *Cancer Genetics*, Lynch, H. T., (Hsg.) Charles Thomas, Springfield, IL (1976), fest, daß Patienten mit Immunschwäche eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber neoplastischen Erkrankungen aufweisen, und sie äußerten die Vermutung, daß es einen Zusammenhang zwischen Immundefunktion und Malignanz gäbe. Auch Eilber, F. R., und Morton, D. J., *Cancer*, **25**, 362–367 (1970), berichteten, daß Krebspatienten, die nicht in der Lage waren, eine Hypersensitivitätsreaktion des verzögerten Typs auf Hauttest-Antigene zu entwickeln, im allgemeinen eine schlechte Prognose hatten. Diese Beobachtungen implizieren, daß Tumorentstehung und progressives Wachstum von malignen Zellen durch das Immunnetz des Wirts möglicherweise über T-Zellen, Makrophagen oder natürliche Killer-Zellen überwacht und gesteuert werden. Andererseits wurde die Überwachungshypothese im Ergebnis des anscheinend unbegrenzten Wachstums von bestimmten Tumoren bei Tieren in Frage gestellt, Schwartz, R. S., *New. Engl. J. Med.*, **293**, 181–184 (1975). Es ist nicht vollständig klar, warum Tumorzellen der Überwachung entweichen können, es wurden jedoch verschiedene Möglichkeiten postuliert, einschließlich der folgenden: (a) Versagen, die Tumor-Antigene zu erkennen; (b) Unfähigkeit, angemessene Immunreaktionen auszulösen, um Tumore zu zerstören, und (c) Induzierung der Immunodepression durch onkogene Agentien, Blockierungsfaktoren und/oder Suppressorzellen. Die Fähigkeit, diese Beschränkungen über die Modulation des Immunverteidigungssystems zu überwinden, wird nicht nur für die Prophylaxe, sondern auch für die Therapie von Krebs wichtig.

Wenn die Unterdrückung des Immunsystems zum Wachstum von Malignomen führen kann, kann die Regulierung jedes Gesichtspunktes der Immunreaktion dem Wirt helfen, die restlichen Krebszellen auszuschließen. Es ist daher wünschenswert, chemische Agentien (d. h., Immunomodulatoren) zu finden, die in der Lage sind, die Immunverteidigungsmechanismen des Wirts wiederherzustellen und zu stimulieren, um die Schwächen zu überwinden, auf welche die Anfälligkeit gegenüber der Krankheit und das Versagen, den Krebs vollständig zu beseitigen, zurückzuführen sind. Derartige immunmodulierende Agentien wären wahrscheinlich nicht in der Lage, das Wachstum eines großen Tumors aufzuhalten, ihr klinischer Nutzen würde sich vielmehr aus ihrer Kapazität ergeben, die normalen Immunüberwachungsmechanismen bei Patienten zu verstärken, deren Tumorblastung durch chirurgische, radiotherapeutische oder chemotherapeutische Methoden verringert wurde. Obwohl eine große Zahl von Agentien, einschließlich biologischer und chemischer Substanzen, auf ihre potentielle immunverstärkende Aktivität gegenüber Tumoren untersucht wurde, wurden nur wenige für eine kritische Bewertung in klinischen Versuchen herangezogen (Oldham, R. K., *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 789–796 [1983]). Ob diese Mittel therapeutisch nützlich werden, muß noch bestimmt werden.

Trotzdem haben experimentelle Tierversuche das Antitumorpotential einer Reihe von Immunoregulantien aufgezeigt, einschließlich lebender Organismen des *Bacillus Calmett-Guerin* (BCG), Lamm, K. L., u. a., *Immunotherapy of Human Cancer* (Immunotherapie von Krebs beim Menschen), Terry and Rosenberg (Hsg.), 315–322, NY (1982), *Corynebacterium parvum*, (C. parvum), Bast, R. C., u. a., *Cancer Res.*, **42**, 1395–1401 (1982), Thymosin, Dillman, R. O., u. a., *J. Biol. Resp. Modif.*, **1**, 35–41 (1982), Interferon, Louie, A., u. a., *Blood*, **58**, 717–718 (1981), monoklonaler Antikörper, Ritz, J., und Schlossmann, S. F., *Blood*, **59**, 1–11 (1982), Interleukinen, Lotze, M. T. u. a., *J. Biol. Resp. Modif.*, **3**, 475–482 (1984), Polynukleotiden und der anthelminthischen Droge, Levamisol.

Es wurde gezeigt, daß diese Substanzen die Zellularimmunität stimulieren und eine Tumorrepression bewirken. Es wurde über gewisse Erfolge bei ersten klinischen Versuchen mit BCG gegen malignes Melanom und akute Leukämie und mit Levamisol gegen Lungenkrebs und Brustkrebs berichtet. Obwohl die durch diese Agentien hervorgerufenen Antitumorwirkungen vielversprechend sind, wurden bisher keine signifikanten therapeutischen Vorteile erzielt. Da es sich hierbei um ein neues therapeutisches Herangehen handelt, müssen neue Medikamente und Behandlungsmethoden sorgfältig klinisch erprobt werden, um ihr volles Potential erkennen zu können.

Die moderne Forschung ist auf die Entdeckung eines Medikamentes gerichtet, das den bekannten Immunomodulatoren wie Levamisol ähnlich, aber stärker ist und die vollständige Beseitigung von Tumorzellen bewirkt, wenn es in Verbindung mit therapeutischen Standardmaßnahmen angewendet wird. Stimulatoren der Wirtsresistenz können in Tiermodellen entdeckt werden, die tatsächlich sowohl Immunostimulatoren als auch Antikrebs-Agentien entdecken können. Bei einem experimentellen Tiermodell werden Mäuse in einen Zustand versetzt, der die bei Krebspatienten übliche Immunodepression simuliert. Dazu werden die Mäuse mit einem Leukämievirus infiziert, der sowohl Leukämie als auch krankheitsbezogene Immunodepression hervorruft. Wirksame Medikamente werden dann an der Fähigkeit erkannt, die Antikörperreaktion bei den experimentellen Mäusen wiederherzustellen oder zu verstärken oder die Weiterentwicklung des Tumors zu unterbinden.

Solche Agentien, welche das Immunsystem modulieren könnten, wären nicht nur bei der Hemmung der Tumorentstehung von Nutzen, sondern wären auch außerordentlich nützlich als Adjuvantien bei der chemotherapeutischen oder strahlungstherapeutischen Behandlung von Krebs und anderen verwandten Krankheiten. Eine wesentliche Nebenwirkung dieser chemotherapeutischen oder Strahlungstherapie ist die Myelosuppression, welche dann die Dosis des eingesetzten Medikaments und/oder die Häufigkeit der Behandlung beschränkt. Todesfälle durch chemo- oder bestrahlungsassoziierte Myelosuppression sind im allgemeinen auf Hämorrhagie oder Sepsis zurückzuführen. Die Todesfälle durch Hämorrhagie sind

das Ergebnis von Thrombozytopenie, einer drastischen Verringerung der Anzahl der Blutplättchen. Todesfälle durch Sepsis sind das Ergebnis von Neutropenie, einem starken Abfall an Neutrophilen, den Zellen, die eine wesentliche Rolle bei der Erholung nach bakteriellen Infektionen spielen. Todesfälle durch Sepsis treten selbst dann auf, wenn die Patienten mit Antibiotika behandelt wurden.

Es ist jedoch bekannt, daß bei vielen Krebserkrankungen das Ergebnis besser sein könnte, wenn man eine aggressivere therapeutische Methode anwenden könnte, entweder durch Erhöhung der Dosis oder der Häufigkeit der Chemo- oder Radiotherapie. So kann eine Methode zum Schutz des Knochenmarks vor zytotoxischen Agentien oder zur Beschleunigung der Wiederherstellung von Knochenmarkszellen nach einer solchen Behandlung eine aggressivere Therapie ermöglichen. Ein solches Verfahren zur Überwindung der hämatologischen Toxizität in Verbindung mit Krebstherapien ist die autologe Knochenmarktransplantation, um die Wiederherstellung der hämatopoietischen Zellen zu beschleunigen. In jüngster Zeit wurden verschiedene Faktoren identifiziert, welche als Stimulatoren des hämatopoietischen Zellwachstums bekannt sind. Diese koloniestimulierenden Faktoren (CSFs) wirken auf eine Reihe von Knochenmark-Progenitorzellen, um deren Differenzierung in reife, aktive Zellpopulationen zu beschleunigen. Verschiedene dieser Faktoren wurden kloniert und werden gegenwärtig bei Versuchen an Krebspatienten erprobt, die einer Reihe von chemotherapeutischen Behandlungsfolgen unterzogen worden sind. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Agentien, insbesondere G-CSF (granulozyt-koloniestimulierender Faktor) und GM-CSF (granulozyt-makrophag-koloniestimulierender Faktor), einen anhaltenden Anstieg in den Neutrophil-Zählungen stimulieren und damit die Periode der Neutropenie nach Verabreichung eines zytotoxischen Agens verkürzen könnten. Eine Senkung der Anzahl der Neutropenietage kann sich als vorteilhaft nicht nur in Begriffen der Krankenhauskosten (durch Verringerung der Notwendigkeit einer stationären Behandlung) erweisen, sondern letztlich auch darin, daß Morbidität und Mortalität in Verbindung mit der Krebstherapie gemindert werden.

Die Behandlung der chemotherapieassoziierten Myelosuppression mit rekombinanten koloniebildenden Faktoren hat jedoch einige Nachteile. Zum einen geht aus Untersuchungen die Toxizität in Verbindung mit der GM-CSF-Therapie selbst hervor. Zweitens haben die rekombinanten Produkte, da sie ihrer Natur nach Proteinprodukte sind, bei der intravenösen Verabreichung eine verhältnismäßig kurze Halbwertszeit. Es besteht also die Notwendigkeit einer kontinuierlichen intravenösen Infusion, um therapeutisch aktive Werte aufrechtzuerhalten. Drittens verweisen die gegenwärtigen Untersuchungen auf die Notwendigkeit, eine Kombinationstherapie mit verschiedenen Zytokinen durchzuführen, um bei der Wiederherstellung der Knochenmarkszellen eine maximale Reaktion zu erreichen. Verbindungen, wie sie in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, haben verschiedene Vorteile gegenüber rekombinanten koloniestimulierenden Faktoren (CSFs). Der Hauptvorteil liegt in der oralen Effektivität dieser Immunomodulatoren, wodurch die Notwendigkeit einer kontinuierlichen intravenösen Infusion und eines längeren Krankenhausaufenthaltes entfällt. Zweitens sind die Kosten für die Herstellung einer synthetischen Verbindung weit geringer als die für ein rekombinantes Protein, was sich in niedrigeren Kosten für den Patienten ausdrückt. Drittens sind die oral aktiven, synthetischen Verbindungen, wie sie hier beschrieben werden, im Vergleich zu den rekombinanten Proteinen, die nach der intravenösen Verabreichung leicht abgebaut werden, sehr stabil. So ergibt eine einzelne orale Dosis der synthetischen Verbindungen therapeutische Wirkungen, die mit denen einer kontinuierlichen, vierzehntägigen Infusion mit rekombinanten CSFs vergleichbar sind.

Und schließlich liegt ein zusätzlicher Vorteil der synthetischen Verbindungen gegenüber den koloniestimulierenden Faktoren in der mehrfachen Zytokininduzierung durch die synthetischen Verbindungen, insbesondere von IL-1 und IL-2. So kann man durch eine einzige orale Dosis mit den synthetischen Verbindungen erreichen, was mit mehreren Zytokinen bei wiederholten Dosen erreicht wird.

Aus den gezeigten Ergebnissen läßt sich ableiten, daß diese Verbindungen eine Alternative zu den koloniestimulierenden Faktoren sein können, um eine aggressivere Therapie mit zytotoxischen Medikamenten zu ermöglichen, deren die Dosis beschränkende Toxizität eine schwere Myelosuppression ist. Wirksame Medikamente in dieser Reihe erkennt man an der Fähigkeit, die Wiederherstellung von knochenmarkkoloniebildenden Zellen nach einer 5-FU-Therapie zu beschleunigen und eine koloniebildende Aktivität im Serum von Mäusen zu stimulieren, was die Züchtung von normalen Knochenmarkszellen in Kultur ermöglicht. Die Radioschutzeigenschaften werden anhand der Fähigkeit gemessen, die Anzahl der koloniebildenden Zellen in der Milz von behandelten Mäusen zu vergrößern (endogene CFU-S). Die Fähigkeit, die Produktion von IL-1 zu verstärken, einem Zytokin, das synergistisch mit den CSFs wirkt, wird durch die Fähigkeit der obenaufschwimmenden Makrophagschichten von behandelten Mäusen gemessen, das Wachstum von IL-1-abhängigen Zellen in Kultur zu fördern. Ebenso wird die Fähigkeit der Verbindungen, die Produktion von IL-2 zu verstärken, einem Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Immunregulation spielt, anhand der Fähigkeit von obenaufschwimmenden Schichten von Con-A-stimulierten Splenozyten gemessen, das Wachstum von CTLL-2-IL-2-abhängigen Zellstämmen zu stimulieren.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wurde gezeigt, daß die oral aktiven Verbindungen dieser Erfindung in der Lage sind, die Reaktivität bestimmter Immunzellenpopulationen, die das Wachstum eines Tumors beeinflussen können, zu modifizieren. Der Beweis für diese Wirkung der Versuchsverbindungen auf Immunzellenpopulationen wurde bei Makrophagen erbracht, die seit langem als Immunzellen bekannt sind, welche für die Entwicklung und Ausbreitung von Neoplasmen wichtig sind, Macknass, G. B., *The Macrophage in Neoplasia* (Das Makrophag bei Neoplasie), M. A. Fink (Hsg.), 3-13, Academic Press, NY (1976). Die Versuchsverbindungen waren offensichtlich in der Lage, diese Zellen *in vivo* zu aktivieren, um das Wachstum von Tumorzellen in Kulturen zu unterbinden. Diese „aktivierten“ Makrophage waren in Peritonealexsudaten von behandelten Mäusen am Tag 4 nach der Verabreichung einer einzigen oralen Dosis der Testverbindung nachweisbar (Tabelle I). Makrophagen und Lymphozyten von behandelten Mäusen setzen in Kultur weit mehr IL-1- und IL-2-ähnliche Faktoren frei als Kontrollpräparate (Tabellen II und III). Seren von behandelten Mäusen enthielten auch mehr koloniestimulierende Faktoren als die von normalen Mäusen (Tabelle V). Mit den Versuchsverbindungen behandelte Mäuse sprechen auch besser auf Fremdanigene wie rote Blutzellen von Schafen (SRBC) an, wie durch die Fähigkeit nachgewiesen wurde, höhere Werte an Antikörper auf dieses Fremdprotein zu produzieren (Tabelle IV). Aus diesen Experimenten läßt sich ableiten, daß Verbindungen dieser Erfindung die Fähigkeit des Wirts, auf Fremdproteine, wie sie auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden, zu reagieren, vergrößern können.

Die Versuchsverbindungen beschleunigen auch die Wiederherstellung von Knochenmarkzellen nach der Chemotherapie auf etwa die gleiche Weise wie rekombinante koloniestimulierende Faktoren (Abbildungen 1–4). Sie stellen auch einen Schutz bei der Radiotherapie dar, wie in der endogenen CFU-S-Probe nachgewiesen wurde (Tabelle VI). Die Aktivität der Verbindungen der Erfindung als Immunomodulatoren wurde durch eine Reihe von Verfahren demonstriert, die unten beschrieben werden.

Materialien und Methoden

Tiere, Tumore und Reagentien

Mäuse der Stämme C57BL/6 (B16, H-2^b), DBA/2 (D2, H-2^d), Balb/c (H-2^d), BDF1 (H-2^d) und CD2F1 (H-2^d) wurden von den Cumberland View Farms, Clinton, TN, bezogen. Mäuse des Stammes C3H/HeJ (C3H, H-2^k) wurden von den Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, bezogen. Alle verwendeten Tiere waren 6 bis 10 Wochen alt. Mastozytom P815 wurde im syngeneischen Wirt erhalten. Die entsprechenden Tumorzellen wurden als Ziele in Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendet. Ein interleukin-2-abhängiger Zellstamm (IL-2-abhängiger Zellstamm) mit der Bezeichnung CTLL-2 wurde bei Vorhandensein von Ratten-IL-2 in Kultur gehalten. Die Hanksche ausgewogene Salzlösung (HBSS), Medium RPMI 1640, Pferdeserum, Kalbsfötusserum (FCS), L-Glutamin, Penizillin, Streptomycin, gepufferte Dulbecco-Phosphat-Salzlösung (D-PSB) und N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) wurden von der Grand Island Biological Company, Grand Island, NY, bezogen. Gentamicin wurde von der Upjohn Co., Kalamazoo, MI, bezogen; Thioglykolat-Medium und Lipopolysaccharid (LPS, E. coll 0128:B 12) waren von den DIFCO Laboratories, Detroit, MI, erhältlich. ⁵¹Cr-Natriumchromat (⁵¹Cr, spezifische Aktivität = 300 bis 500 Ci/g) und Methyl-³H-thymidin (³HTdR, spezifische Aktivität = 20 Ci/mMol) wurden von den New England Nuclear, Boston, MA, bezogen.

I. Aktivierung von tumoriziden Makrophagen

Präparierung von Mäusmakrophagen

Mäusen wurde intraperitoneal (IP) 1 ml Thioglykolat-Medium injiziert, und 4–5 Tage später wurden die Zellen des Peritonealexsudats (PE-Zellen) durch Waschen der Peritonealhohlräume mit HBSS, die 10 Einheiten/ml Heparin enthielt, geerntet. PE-Zellen wurden dreimal mit HBSS gewaschen und in Medium RPMI 1640 zur Suspension gebracht, welches 10% FCS, 100 Einheiten/ml Penizillin, 100 µg/ml Gentamicin, 2 mM L-Glutamin und 10 mM HEPES enthielt. Die Zellen wurden in Flachbodenschalen von Kulturplatten mit 96 Vertiefungen oder Schalen (Costar, Cambridge, MA) dispergiert und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nichthaftende PE-Zellen wurden durch wiederholtes und kräftiges Waschen mit HBSS entfernt, und die Mehrzahl der verbleibenden haftenden Zellen (>95%) ähnelte morphologisch Makrophagen und wies Mac-1-Oberflächen-Antigene auf, was durch ein Fluoreszenzfärbefahren nachgewiesen wurde. Diese Zellen waren auch funktionell aktiv bei der Aufnahme von Latexteilchen.

Untersuchung auf makrophag-medierte Tumorzytostase

Tumorzellen P815 von D2-Mäusen wurden zweimal mit HBSS gewaschen und in 10% FCS-Komplettmedium zur Suspension gebracht. Kulturschalen, die B6-Makrophagen enthielten, wurden 5 × 10³ P815-Zellen zugesetzt, und das E:T-Verhältnis wurde anhand der Anzahl der anfänglich in jede Schale gegebenen PE-Zellen bestimmt. Wenn nichts anderes angegeben wird, wurden die Kulturplatten 2 Tage inkubiert. Die Zielzellen in jeder Schale wurden in den letzten 4 Stunden einer Impulsbehandlung mit 0,5 Ci ³HTdR unterzogen und mit einem Zellenerntegerät geerntet. Die Menge des in die Zielzellen einbezogenen ³HTdR wurde in einem Flüssigszintillationszähler bestimmt. Der cpm-Mittelwert wurde aus Triplikatkulturen ermittelt, wobei die Ergebnisse als prozentuale Zytostase dargestellt wurden, berechnet nach der Formel: % Zytostase = (A – B)/A × 100, wobei A = cpm-Wert der Kulturen, die normale Kontrollmakrophagen enthalten, und B = cpm-Wert von Kulturen, die experimentelle Makrophagen von Mäusen enthalten, die mit der Verbindung behandelt wurden.

Tabelle I Aktivierung von tumoriziden Makrophagen

Verbindung	% Aktivierung, Test-Nr.					
	1*	2**	3**	4**	5**	6**
N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-diethylbutyramidin]	59,5	39,9	44,2	39,3	58,1	55,8
N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-dimethylpropionamidin]	58,5	15,8	0	25,1	NT	NT
2,2'-(Sulfonylbis(p-phenylenitrilo))bis-[1-methyl-pyrrolidin]	13,4	21,5	10,0	29,4	NT	NT
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid-monohydrochlorid	NT	NT	NT	NT	58,5	NT
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid	NT	NT	NT	NT	NT	52,6
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]-phenyl]N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid	NT	NT	NT	NT	NT	34,8
N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis[N,N-diethylazetamid]	59,0	61,8	0	16,5	NT	NT
N',N'''-(sulfonyldi-1,4-phenylen)bis-[N,N-dimethylazetamidin]	43,4	42,6	9,2	14,7	NT	NT

NT = Nicht getestet

* = In vitro-Aktivierung

** = In vivo-Aktivierung

II. Produktion von IL-1

IL-1-Probe

Gruppen von Mäusen C57 B 1/6 wurden oral mit dem Immunmodulator mit Dosen von 25, 100 oder 200 mg/kg behandelt. Vier Tage später wurden Peritonealexsudatzellen (PEC) aufgenommen und 1×10^5 Zellen in RPMI-1640-Medium plattiert, das 5% Kalbsfötalserum (FCS) enthielt. Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die nichthaftenden Zellen ausgewaschen und mit anhaftenden Zellen 24 Stunden lang in RPMI-Medium mit 5% FCS und mit oder ohne Lipopolysaccharid (10 µg/ml) behandelt. Am folgenden Tag wurden die obenaufschwimmenden Schichten abgenommen und auf Thymozyten oder auf dem D10-IL-1-abhängigen Zellstamm auf IL-1 untersucht. Die Kulturen wurden entweder 3 Tage (Thymozyten) oder einen Tag (D-10) inkubiert und dann einer Impulsbehandlung mit ^3H -TdR unter Verwendung von 0,5 µCi/Vertiefung unterzogen. Die Zellen wurden geerntet, und unter Verwendung eines Beckman-Szintillationszählers wurde die Anzahl der Zählen je Minute (CPM) bestimmt.

Tabelle II: Ergebnisse der IL-1-Probe

Verbindung	-fache Zunahme gegenüber Normal				
	Bsp. Nr. 1	Bsp. Nr. 2	Bsp. Nr. 3	Durchschnitt	Bewertung
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenyl)bis-[N,N-diethylethanimidamid]	1,4	2,5	2,6	2,1	*+
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenyl)bis-[N,N-diethylbutyramidin]	1,6	2,5	5,3	3,1	+++
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenyl)bis-N,N-dimethylpropionamidin	3,1	2,5	10,6	5,4	+++
2,2'-(Sulfonylbis(p-phenylnitrilo))bis[1-methylpyrrolidin]	1,2	0,0	9,3	3,5	+++
3-[1-[(4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl)imino]ethyl]-3-azabicyklo-[3.2.2]nonan	2,8	1,0	0,0	1,2	+
3,3'-(Sulfonylbis(4,1-phenylnitriloethylidyn))bis-3-azabicyklo-[3.2.2]-nonan	N.D.	2,5	—	1,25	+
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid	N.D.	2,3	—	0,0	—
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid-monohydrochlorid	1,4	1,9	0,0	1,1	+
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid	1,8	2,5	0,0	1,43	+
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid	0,0	2,3	0,0	0,76	±

* = Erhöhter Pegel von IL-1-artiger Aktivität beim Fehlen von LPS

N. D. = Nicht ausgeführt

— = Negativ

± = Weniger als einfache Steigerung gegenüber Normal

+

++ = Zwischen zwei- und dreifacher Steigerung gegenüber Normal

+++ = Mehr als dreifache Steigerung gegenüber Normal

III. Produktion von IL-2

Präparation von Mäuselymphozyten

Von Mäusen wurde die Milz entfernt, und es wurden Einzelzellensuspensionen durch Auseinandernehmen der Milz und Spülen durch Siebe aus rostfreiem Stahl, Maschengröße Nr. 40 und Nr. 80 hergestellt. Erythrozyten wurden durch eine dreiminütige Einwirkung einer 0,83%igen Tris-Ammoniumchloridlösung zersetzt. Die Zellen wurden dreimal mit HBSS gewaschen und abschließend in komplettem RPMI-1640-Kulturmedium zur Suspension gebracht, das aus 5% FCS, 2 mM L-Glutamin, 5×10^{-5} M 2-Merkaptoethanol, 10 mM HEPES, 100 Einheiten/ml Penizillin und 100 mg/ml Streptomycin bestand. Die Zellen wurden in einem Hämozytometer gezählt, und die Lebensfähigkeit der Testzellen war immer größer als 98%, beurteilt nach der Trypan-Blaufarbstoff-Exklusion.

Herstellung von verschiedenen löslichen Faktoren und deren Untersuchung

IL-2 wurde durch Stimulierung von 10^7 B6-Splenozyten mit 1 mg Con A in einem 1 ml-Medium hergestellt. Nach 2 Tagen wurden die obenaufschwimmenden Schichten geerntet, und das restliche Con A wurde durch Absorption auf Sephadex G-50 oder durch α -Methylmannosid-Inaktivierung entfernt. Die IL-2-Aktivität wurde in der oben beschriebenen Thymozyt-Proliferations-Probe getestet. Außerdem wurden Kulturen von Lymphoblasten, die durch eine dreitägige Con A-Stimulierung hergestellt worden waren, oder IL-2-abhängige CTLL-2-Zellen mit Testproben versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Proliferation dieser Indikatorzellen anhand der ^3H TdR-Einbeziehung gemessen.

Erhöhung und Wiederherstellung der Produktion des IL-2-ähnlichen Faktors bei normalen Mäusen

Lymphozyten, die aus normalen Mäusen oder Mäusen hergestellt worden waren, die mit 100 mg/kg der Testverbindung behandelt worden waren, wurden 2 Tage lang mit Con A stimuliert. Die obenaufschwimmenden Schichten der Kultur wurden geerntet und auf mutmaßliche IL-2-Aktivität in 3 Proliferationsuntersuchungen unter Verwendung von Thymozyten, Lamphoblasten und CTLL-2-Zellen als Indikatoren getestet. Obwohl die obenaufschwimmenden Schichten von normalen Lymphozyten das Wachstum von allen Indikatorzellen unterstützten, produzierten Lymphozyten von behandelten Tieren offensichtlich mehr IL-2, wie aus dem höheren Maß an Zellwachstum bei allen drei Testsystemen deutlich wird.

Tabelle III Produktion von IL-2

Verbindung	CPM, Test-Nr.				Bewertung
	1	2	3	4	
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-diethylbutyramidin]	10 979	NT	NT	NT	+
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-dimethylpropionamidin]	NT	15 952	46 617	129 910	++
2,2'-(Sulfonylbis-(p-phenylenitrilo))-bis[1-methylpyrrolidin]	NT	17 010	NT	NT	+++
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid	4 230	NT	NT	NT	+
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid	19 945	NT	NT	NT	++
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen) bis N,N-diethylazetamidin	NT	17 051	NT	NT	+++
Kontrolle	3 152	1 920	23 878	90 570	

NT = Nicht getestet

Kontrolle = Unbehandelte, normale Mäuse

++ = 1- bis 3fache Steigerung gegenüber den normalen Kontrollen

+++ = 4- bis 7fache Steigerung gegenüber den normalen Kontrollen

+++ = 8- bis 10fache Steigerung gegenüber den normalen Kontrollen

IV. Anti-SRBC-Antikörper-Untersuchung

Am Tage 0 wurden oral Verbindungen in Dosen von 200 oder 600 mg/kg verabreicht. Am Tag +4 wurden intraperitoneal (IP) 0,1 ml einer 10%igen Suspension von roten Blutzellen (RBC) von Schafen gegeben. Zehn Tage später wurden Splenozyten von diesen Mäusen gewonnen und entweder 4×10^6 oder 2×10^6 Splenozyten in 50 ml mit 50 ml einer 15%igen Suspension von SRBC gemischt, die Meerschweinchen-Komplement enthielten (Verdünnung 1:4). Auf eine Objektträgerkultur wurden 100 ml dieses Gemischs gegeben und bei 37°C 30 bis 45 Minuten lang inkubiert. Die Anzahl der antikörperbildenden Zellen wurde durch Zählen der Anzahl der sichtbaren gebildeten „Plaques“ bestimmt.

Tabelle IV Produktion von Anti-SRBC-Antikörpern

Verbindung	PFC/10 ⁷ Splenozyten, Test-Nr.			Bewertung
	1	2		
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen) bis N,N-diethylbutyramidin	NT	1 765		+++
N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis[N,N-dimethylpropionamidin]	NT	726		NS
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid	1 933	NT		++
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid	2 138	NT		++
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid	1 167	NT		NS
Kontrolle	1 260	830		-

NT = Nicht getestet

NS = Nicht signifikant

++ = 1,5fache Steigerung gegenüber normalen Kontrollen

+++ = 2,0fache Steigerung gegenüber normalen Kontrollen

Kontrolle = Unbehandelte, normale Mäuse

V. Produktion des koloniestimulierenden Faktors

Herstellung von Knochenmarkzellen von Mäusen

Oberschenkelknochen von Mäusen wurden entfernt und die Markzellen durch Absaugen mit einer Nadel Größe 23 aufgefangen und in 5 ml Kulturmedium RPMI 1640 gegeben. Aliquote wurden mit einer 2%igen Essigsäurelösung verdünnt, die 0,2% Kristall-Violett enthielten, und die Anzahl der kernbildenden Zellen je Oberschenkel wurde durch direkte Zählung in einem Hämozytometer bestimmt.

Wirkung auf die CSF-Induzierung bei Mäusen

Mäuseseren wurden auf den koloniestimulierenden Faktor (CSF) in Kulturen von normalen Knochenmarkzellen untersucht. CSF wurde in einem System getestet, in welchem 5×10^4 normale Knochenmarkzellen mit 10% Testproben in jeder Schale von Kulturplatten mit 96 Schalen drei Tage lang inkubiert wurden. Das Wachstum dieser Zellen wurde durch 3HTdR-Einbeziehung bestimmt.

Tabelle V Ergebnisse der CSF-Proliferationsprobe

Verbindung	%uale Steigerung gegenüber normalem Serum						Bewertung
	Experiment Nr.						
	1	2	3	4	5	Mittel	
N-[4[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]azetamid*	35,1	N. D.	50,0	22,0	42,5	37,5	+
N'-N'''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-N,N-diethylethanimidamid	23,1	104,0	0,0	4,8	11,5	28,6	±
N'-N'''-(sulfonyldi-p-phenylen)bis-N,N-diethylbutyramidin	14,4	122,0	211,0	22,4	112,5	96,0	+++
N',N'''-(sulfonyldi-p-phenylen)bis-N,N-dimethylpropionamidin	0,0	164,0	150,0	66,0	75,0	91,0	+++
2,2'-(Sulfonylbis(p-phenylenitrilo)bis-[1-methylpyrrolidin])	25,6	210,0	116,0	96,0	71,0	103,0	+++
3-[1-[(4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]-phenyl]imino)-ethyl]-3-azabizyklo-[3.2.2]nonan	96,0	N. D.	0,0	N. D.	48,0	48,0	+
3,3'-(Sulfonylbis(4,1-phenylenitrilo-ethylidyn))-bis-3-azabizyklo[3.2.2]-nonan	115,0	151,0	55,0	52,0	85,0	92,0	+++
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid	33,3	142,0	N. D.	42,0	N. D.	72,0	++
N'-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid-monohydrochlorid	108,0	130,0	N. D.	29,0	N. D.	89,0	++
N. D. = Nichtausgeführt							

N. D. = Nicht ausgeführt

- = Negativ

± = Weniger als 30 % Zunahme gegenüber Normal

+ = 30 bis 50 % Zunahme gegenüber Normal

++ = 50 bis 90 % Zunahme gegenüber Normal

+++ = Mehr als 90 % Zunahme gegenüber Normal

* = Diese Verbindung wird in US-PS 4 532 349 offengelegt

VI. Endogene CFU-S-Probe auf Bestrahlungsschutz

Gruppen von Balb/c-Mäusen erhielten eine orale Dosis des Immunmodulators von 25, 100 oder 200 mg/kg am Tag - 1, bezogen auf eine Ganzkörper-Gammabestrahlung von 600 rad. Zwei Wochen nach der Bestrahlung wurden die Mäuse geschlachtet und die Milz entfernt und in Bouin-Fixativ vor dem Zählen der Kolonien fixiert. Diese Werte werden als Anzahl der Kolonien/Milz ausgedrückt.

Tabelle VI Endogene CFU-S-Probe auf Bestrahlungsschutz

	Anzahl der Kolonien/Milz
600 Rad-Kontrolle	35
600 Rad + N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis[N,N-dimethylpropionamidin]	
400 mg/kg	35
200 mg/kg	73
100 mg/kg	46
25 mg/kg	52

VII. CFU-S-Untersuchung zur Messung der Beschleunigung der Myeloidzellenwiederherstellung nach 5-FU-Therapie

Gruppen von Mäusen C3H/HeJ wurden IP mit 5-Fluorourazil (5-FU) (150 mg/kg) behandelt. Vier Tage später wurde ihnen eine orale Dosis des Immunmodulators zu 25, 100 oder 200 mg/kg verabreicht. Drei Tage später wurden die Mäuse geschlachtet, und die Knochenmarkzellen wurden durch Absaugen mit einer Nadel Größe 23 aufgefangen und in 5 ml Kulturmedium RPMI 1640 gegeben. Aliquote wurden mit einer 0,2%igen Essigsäurelösung in PBS verdünnt, die 0,2% Kristall-Violett enthielt. Die Anzahl der kernbildenden Zellen je Oberschenkelknochen wurde durch direkte Zählung in einem Hämozytometer bestimmt. Die Zellen wurden in Agarose plattiert, die ein mit einer exogenen Quelle von CSF (50 Einheiten/Platte von GM-CSF) ergänztes Medium enthielt. Nach 7 Tagen in Kultur wurde die Anzahl der Kolonien gezählt, die aus 50 oder mehr Zellen bestanden, und die Werte wurden als CFU-C je 100 000 Zellen ausgedrückt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 1 bis 4 gezeigt.

Legende für die Abb. 1:

- G1. = Normal
- G2. = 5-Fluorourazil
- G3. = 5-Fluorourazil + Kontrolle, N-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]azetamid (offengelegt in US-PS 4532349) mit 100mg/kg
- G4. = 5-Fluorourazil + N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-diethylbutyramidin] mit 100 mg/kg
- G5. = 5-Fluorourazil + N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-dimethylpropionamidin] mit 200mg/kg
- G6. = 5-Fluorourazil + 2,2'-(Sulfonylbis(p-phenylen)nitriolo)bis[1-methylpyrrolidin] mit 200mg/kg

Legende für die Abb. 2:

- G1 = Normal
- G2 = 5-Fluorourazil
- G3 = 5-Fluorourazil + Kontrolle, N-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]azetamid (US-PS 4532349) mit 100mg/kg
- G4 = 5-Fluorourazil + N,N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis-[N,N-diethylazetamid] mit 25mg/kg

Legende für die Abb. 3:

- G1 = Normal
- G2 = 5-Fluorourazil
- G3 = 5-Fluorourazil + Kontrolle, N-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]azetamid (US-PS 4532349) mit 100mg/kg
- G4 = 5-Fluorourazil + 3-[1-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-sulfonyl]imino]ethyl]-3-azabicyklo[3.2.2]nonan mit 200mg/kg
- G5 = 5-Fluorourazil + 3,3'-(Sulfonylbis(4,1-phenylen)nitrioloethylidyn)bis-3-azabicyklo[3.2.2]nonan mit 100mg/kg

Legende für die Abb. 4:

- G1 = Normal
- G2 = 5-Fluorourazil
- G3 = 5-Fluorourazil + Kontrolle, N-[4-[(4-Fluorophenyl)-sulfonyl]phenyl]azetamid (US-PS 4532349) mit 100mg/kg
- G4 = 5-Fluorourazil + N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid mit 6,2 mg/kg
- G5 = 5-Fluorourazil + N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid mit 25mg/kg
- G6 = 5-Fluorourazil + N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]N,N-dimethylpropanimidamid bei 200 mg/kg
- G7 = 5-Fluorourazil + N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl]N,N-dimethylpropanimidamid-monohydrochlorid mit 200mg/kg

Die Erfindungsverbindungen sind als Immunmodulatoren (d. h., sie modulieren die Immunreaktion) wirksam, wenn sie in Mengen zwischen etwa 5mg und etwa 400mg/kg Körpergewicht täglich verabreicht werden. Eine optimale Dosierung zur Erzielung optimaler Ergebnisse läge zwischen etwa 25mg und etwa 500mg/kg Körpergewicht täglich. Diese Dosierung kann so abgestimmt werden, daß eine optimale therapeutische Reaktion erzielt wird. Beispielsweise können täglich mehrere einzelne Dosen verabreicht werden, oder die Dosis kann proportional entsprechend den Erfordernissen der therapeutischen Situation reduziert werden. Ein praktischer Vorteil dieser Erfindung besteht darin, daß die aktiven Verbindungen auf jede herkömmliche Weise verabreicht werden können, beispielsweise auf oralem oder bukkalem Wege.

Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können oral verabreicht werden, beispielsweise mit einem trägen Verdünnungsmittel oder mit einem assimilierbaren, eßbaren Trägermittel, oder sie können in Hart- oder Weichgelatine kapseln eingeschlossen werden, oder sie können zu Tabletten gepreßt werden. Für die orale therapeutische Verabreichung können die aktiven Verbindungen in Exzipienten einbezogen und in Form von Tabletten, Pillen, Kapseln, Elixieren, Suspensionen, Sirup, Oblaten und ähnlichen verabreicht werden. Diese Zusammensetzungen und Präparate sollten wenigstens 0,5% der aktiven Verbindung enthalten. Der Prozentsatz der Zusammensetzungen und Präparate kann natürlich variiert werden und kann vorteilhaft zwischen etwa 2% und etwa 60% des Gewichts der Dosierungseinheit betragen. Die Menge des aktiven Bestandteils in diesen therapeutisch nutzbaren Zusammensetzungen wird so gewählt, daß eine geeignete Dosierung erreicht wird. Bevorzugte Zusammensetzungen oder Präparate nach der vorliegenden Erfindung werden so hergestellt, daß eine orale Dosierungseinheitsform zwischen etwa 50 und etwa 500mg der aktiven Verbindung enthält.

Die Tabletten, Pastillen, Pillen, Kapseln und ähnliches können außerdem folgendes enthalten: Ein Bindemittel wie Tragantgummi, Akaziengummi, Getreidestärke oder Gelatine; Exzipienten wie Dikalziumphosphat; ein Zersetzungsmittel wie Getreidestärke, Kartoffelstärke, Alginsäure und ähnliche; ein Schmiermittel wie Magnesiumstearat; und es kann ein Süßungsmittel wie Sukrose, Laktose oder Saccharin oder ein Geschmacksstoff wie Pfefferminz oder Kirschgeschmack zugesetzt werden. Wenn die Dosierungseinheitsform eine Kapsel ist, kann sie neben Stoffen des oben genannten Typs einen flüssigen Träger wie ein fettes Öl enthalten. Verschiedene andere Stoffe können als Überzüge vorhanden sein oder anderweitig die physikalische Form der Dosierungseinheit modifizieren. Beispielsweise können Tabletten, Pastillen oder Kapseln mit Schellack, Zucker oder beidem überzogen werden. Ein Sirup oder Elixier kann die aktive Verbindung, Sukrose als Süßungsmittel, Methyl und Propylparabene als Konservierungsmittel, einen Farbstoff und einen Geschmacksstoff wie Kirsch- oder Orangeschmack enthalten. Natürlich sollte jedes für die Herstellung einer Dosierungseinheitsform verwendete Material pharmazeutisch rein und in den eingesetzten Mengen im wesentlichen nichttoxisch sein.

Die Erfindung wird ausführlicher in Verbindung mit den folgenden, nicht als Einschränkung zu betrachtenden Beispielen beschrieben.

Ausführungsbeispiele**Beispiel 1**

N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenyl)bis[N,N-diethylbutyramidin]

Einer Lösung von 21,4 g N,N-Diethylbutyramid in 100 ml trockenem Azetonitril wurden bei einer Temperatur von 5°C bis 10°C 18,4 g Phosphoroxychlorid zugesetzt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang bei Zimmertemperatur gerührt, dann wurden 12,4 g 4,4'-Diaminodiphenylsulfon zugesetzt. Es wurde weitere 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend 2 Stunden bei 60°C gerührt, danach wurde das Reaktionsgemisch in 1 l Eiswasser gegossen und mit 5 N Natriumhydroxid basisch gestellt. Der feste Stoff wurde aufgenommen, mit Wasser gewaschen und aus Chloroform/Hexan rekristallisiert, was 24,2 g des gewünschten Produktes in Form von farblosen Kristallen ergab, Schmelzpunkt 136°C–138°C.

Beispiel 2

N',N'''-(Sulfonyldi-p-phenyl)bis[N,N-dimethylpropionamidin]

Einer Lösung von 15,2 g N,N-Dimethylpropionamid in 100 ml trockenem Azetonitril wurden bei einer Temperatur von 5°C bis 10°C 18,4 g Phosphoroxychlorid zugesetzt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang bei Zimmertemperatur gerührt, dann wurden 12,4 g 4,4'-Diaminodiphenylsulfon zugesetzt und die Reaktion so weitergeführt, wie das im Beispiel 1 beschrieben wurde, was 16,0 g des gewünschten Produktes in Form von farblosen Kristallen ergab, Schmelzpunkt 227°C bis 229°C.

Beispiel 3

2,2'-(Sulfonylbis(p-phenylnitrile))bis[1-methylpyrrolidin]

Einer Lösung von 14,9 g N-Methylpyrrolidin in 100 ml trockenem Azetonitril wurden bei einer Temperatur von 5°C–10°C 18,4 g Phosphoroxychlorid zugesetzt. Dieses Gemisch wurde bei Zimmertemperatur eine Stunde lang gerührt, dann wurden 12,4 g 4,4'-Diaminodiphenylsulfon zugesetzt und die Reaktion so weitergeführt, wie das im Beispiel 1 beschrieben wurde, was 11,4 g des gewünschten Produktes in Form von farblosen Kristallen ergab, Schmelzpunkt 180°C–183°C.

Beispiel 4

N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid

Ein Gemisch, das aus 38,4 g 4-Fluorothiophenol, 47,1 g p-Chloronitrobenzen, 39 g Natriumkarbonat, 120 ml Wasser und 150 ml Ethanol bestand, wurde 19 Stunden lang bei 100°C gerührt und dann in 500 ml Wasser gegossen. Der feste Stoff wurde aufgenommen, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol rekristallisiert, was 66,4 g 4-Fluoro-4'-nitrodiphenylsulfid ergab. Eine Portion von 30 g dieser Verbindung wurde einem Gemisch aus 200 ml Eisessig und 50 ml 30%igem Wasserstoffperoxid zugesetzt und eine Stunde lang bei 100°C gerührt. Das Gemisch wurde gekühlt, es wurden 15 ml Wasser zugesetzt, und dieses Gemisch wurde über Nacht gekühlt. Die Kristalle wurden aufgenommen, was 32,7 g 4-Fluoro-4'-nitrodiphenylsulfon ergab. Ein Gemisch aus 10,0 g dieses Sulfons, 200 ml p-Dioxan und 3 ml Raney-Nickel-Katalysator in Wasser wurde in einem Parrschen Apparat hydriert, bis die Wasserstoffaufnahme endete. Der Katalysator wurde durch Filtern entfernt. Das Filtrat wurde *in vacuo* konzentriert, und der Rückstand wurde aus 200 ml Ethanol kristallisiert, was 7,8 g an

4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]anilin in Form von farblosen Kristallen ergab, Schmelzpunkt 206°C–208°C.

Einer Lösung von 7,07 g N,N-Dimethylpropionamid in 90 ml trockenem Azetonitril wurden bei 0°C bis 5°C tropfenweise 7,67 g (4,58 ml) Phosphoroxychlorid zugesetzt. Nach einem einstündigen Rühren bei Zimmertemperatur wurden 17,05 g 4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]anilin zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde 4 Stunden bei Zimmertemperatur, anschließend 2 Stunden bei 60°C gerührt, in 1 l Eiswasser gegossen und mit 5 N Natriumhydroxid basisch gestellt. Der Niederschlag wurde aufgefangen, mit Wasser gewaschen und getrocknet, was 13,13 g des gewünschten Produktes in Form eines farblosen festen Stoffs ergab, Schmelzpunkt 88°C–90°C.

Beispiel 5

N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid-monohydrochlorid

Eine Portion von 6,64 g N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylpropanimidamid in 250 ml Ether wurde durch Celit gefiltert. Das Filtrat wurde mit 4 ml 6 N Chlorwasserstoffsäure in Isopropanol unter Rühren und Kühlen über 48 Stunden behandelt. Der resultierende feste Stoff wurde aufgenommen, mit Ether gewaschen und getrocknet. Eine Portion von 3 g dieses festen Stoffs wurde aus 25 ml Isopropanol kristallisiert, was 2,3 g des gewünschten Produktes in Form von farblosen Körnern ergab, Schmelzpunkt 164°C–167°C.

Beispiel 6

N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid

Ein Gemisch aus 2,51 g 4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]anilin und 11 ml Dimethylazetal von N,N-dimethylazetamid wurde bei 100°C eine Stunde lang gerührt und dann *in vacuo* verdampft. Der Rückstand wurde in einer kleinen Menge Toluol aufgelöst und gekühlt. Der Niederschlag wurde aufgenommen und ergab 1,16 g des gewünschten Produktes, Schmelzpunkt 115°C–116°C.

Beispiel 7

N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid-monohydrochlorid

Eine Portion von 7,0 g N'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]-N,N-dimethylethanimidamid wurde in einem Gemisch aus Isopropanol und Ether aufgelöst. Es wurde eine Portion von 8 ml 6 N Chlorwasserstoffsäure in Isopropanol zugesetzt. Der resultierende Niederschlag wurde aufgefangen, in einer Mindestmenge Isopropanol aufgelöst und in ein großes Volumen Ether gegossen. Der resultierende weiße Niederschlag wurde aufgenommen und ergab 6,0 g des gewünschten Produkts.

Beispiel 8

3-[1'-[4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]phenyl]imino]ethyl]-3-azabicyclo[3.2.2]nonan

Eine Portion von 5,02 g 3-Azetyl-3-azabicyclo[3.2.2]nonan wurde in 40 ml trockenem Azetonitril aufgelöst und auf 5°C gekühlt. Dann wurde eine Portion von 3,6 g (2,24 ml) Phosphoroxychlorid zugesetzt und das Gemisch eine Stunde lang bei Zimmertemperatur gerührt. Es wurde eine Portion von 5,02 g 4-[(4-Fluorophenyl)sulfonyl]anilin zugesetzt, das Gemisch wurde 2 Stunden lang auf 60°C erhitzt und dann in 400 ml Eis/Wasser gegossen. Der pH-Wert wurde mit 5 N Natriumhydroxid auf 9,0 abgestimmt. Der Niederschlag wurde aufgefangen, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der feste Stoff wurde in 150 ml Hexan aufgeschlämmt, erhitzt und 120 ml Chloroform zugesetzt. Das Gemisch wurde gefiltert, der feste Stoff beiseite getan und das Filtrat über Nacht gekühlt, was einen zweiten festen Stoff ergab. Die festen Stoffe wurden kombiniert, in Chloroform aufgelöst, es wurde Hexan zugesetzt und das Gemisch gekühlt. Der resultierende feste Stoff wurde mit Hexan gewaschen und getrocknet, was 5,86 g des gewünschten Produktes ergab.

Beispiel 9

3,3'-(Sulfonylbis(4,1-phenylenitriloethylidyn))-bis-3-azabicyclo[3.2.2]nonan

Eine Portion von 3,0 g 3-Azetyl-3-azabicyclo[3.2.2]nonan wurde in 20 ml Azetonitril aufgelöst. Das Gemisch wurde in einem Eisbad gekühlt, und es wurden 3,68 g (2,2 ml) Phosphoroxychlorid zugesetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde lang bei Zimmertemperatur gerührt, es wurden 1,98 g 4,4'-Diaminodiphenylsulfon zugesetzt, und das Gemisch wurde 4 Stunden bei Zimmertemperatur und anschließend 2 Stunden bei 60°C gerührt. Das Gemisch wurde in 200 ml Eis/Wasser gegossen, der pH-Wert mit 5 N Natriumhydroxid auf 10,0 abgestimmt und das Gemisch über Nacht gekühlt. Der pH-Wert wurde erneut auf 10,0 abgestimmt, und der feste Stoff wurde aufgenommen, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Dieser feste Stoff wurde aus Methylcellosolve rekristallisiert, dann in Wasser aufgeschlämmt, auf einen pH-Wert von 12 basisch gestellt und das Produkt aufgefangen, was 134 mg ergab.

Beispiel 10

N',N''-(Sulfonyldi-1,4-phenylen)bis[N,N-dimethylmethanimidamid]

Ein Gemisch aus 5,0 g 4-Aminophenylsulfon und 25 ml N,N-Dimethylformamidmethylazetal wurde bei Rücklauftemperatur 16 Stunden lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* getrocknet und aus 50 ml Azetonitril rekristallisiert, was 3,4 g des gewünschten Produktes ergab, Schmelzpunkt 147°C bis 148°C.

Beispiel 11

N',N''-(Thiodi-1,4-phenylen)bis[N,N-dimethylmethanimidamid]-dihydrochlorid

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 10 unter Einsatz von N,N-Dimethylformamidmethylazetal und 4-Aminophenylsulfid hergestellt, was 5,6 g der gewünschten Verbindung ergab, Schmelzpunkt 290°C–293°C.

Beispiel 12

N',N''-(Sulfonyldi-1,4-phenylen)bis[N,N-dimethylethanimidamid]

Ein Gemisch aus 10,0 g 4-Aminophenylsulfon und 50 ml N,N-Dimethylazetamidmethylazetal wurde unter Rücklauftemperatur 16 Stunden lang gerührt. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* getrocknet und aus Azetonitril rekristallisiert, was 3,7 g des Produktes ergab, Schmelzpunkt 234°C–236°C.

Beispiel 13

N,N-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis-ethanimidinsäure-diethylester

Ein Gemisch aus 4-Aminophenylsulfon, einem Überschuß an Triethylorthoformat und einer Spur p-Toluensulfonsäure wurde bei Rücklauftemperatur 16 Stunden lang erhitzt. Das überschüssige Triethylorthoformat wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Beispiel 14

1,1'-(Sulfonylbis(p-phenylenitrilomethylidyn))bis[4-methylpiperazin]-hydrochlorid (1:x)

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 12 unter Verwendung des Produktes aus Beispiel 13 und 1-Methylpiperazin hergestellt und ergab 5,4 g eines gelbbraunen Pulvers, Schmelzpunkt 200°C–206°C.

Beispiel 15

N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis[N-(p-dimethylaminophenyl)-methanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 12 unter Verwendung des Produktes aus Beispiel 13 und N,N-Dimethyl-1,4-phenyldiamin hergestellt und ergab 1,1 g eines gelbgrünen Pulvers, Schmelzpunkt 210°C–215°C.

Beispiel 16

1,1'-Sulfonylbis(p-phenylenitrilomethylidyn)-bis[4-(2-pyridyl)piperazin]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 12 unter Verwendung des Produktes aus Beispiel 13 und 1-(2-Pyridyl)piperazin hergestellt und ergab 6,9 g des Produktes, Schmelzpunkt 206°C–208°C.

Beispiel 17

N',N''-(Sulfonyldi-p-phenylen)bis[N,N-diethylethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylazetamid hergestellt und ergab 14,7 g des Produktes, Schmelzpunkt 222°C–224°C.

Beispiel 18

N',N'''-(Sulfonylbis(6-fluoro-3,1-phenylen))bis[N,N-dimethylmethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 12 unter Verwendung von 3-Amino-4-fluorophenylsulfon und N,N-Dimethylformamiddimethylazetat hergestellt und ergab 8,0g des Produktes in Form eines Öls.

Beispiel 19

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-diethylbenzenkarboximidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylbenzamid hergestellt und ergab 12,1 g des Produktes, Schmelzpunkt 167°C–169°C.

Beispiel 20

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-diethylpropanimidamid]-dihydrochlorid

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylpropionamid hergestellt und ergab 45,0g eines Produktes in Form farbloser Kristalle, Schmelzpunkt 174°C–176°C. Das Hydrochloridsalz, das mit Dichloromethan und Wasserstoffchloridgas hergestellt wurde, war ein farbloses Glas.

Beispiel 21

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-dimethylpentanimidamid]-dihydrochlorid

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N,N-Dimethylvaleramid hergestellt. Das grauweiße Pulver wurde in Dichloromethan aufgelöst, durch die Lösung wurde Wasserstoffchloridgas geblubbert, und das Dihydrochlorid wurde als ein farbloses Glas ausgefällt.

Beispiel 22

4,4'-Sulfonylbis[N-(1,3-dimethyl-2-imidazolidinyliden)benzenamin]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und 1,3-Dimethylimidazolidinon hergestellt und ergab 6,0g von farblosen Kristallen, Schmelzpunkt 91°C–92°C.

Beispiel 23

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N-Methyl-N-phenylethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N-Methylazetanilin hergestellt und ergab 8,3g farblose Kristalle, Schmelzpunkt 92°C–93°C.

Beispiel 24

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N-dimethylethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Dimethylazetamid hergestellt und ergab 1,2g eines braunen Pulvers.

Beispiel 25

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-diethyl-4-(trifluoromethyl)benzenkarboximidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N',N-Diethyl-4-(trifluoromethyl)bromid hergestellt und ergab 0,845g des Produktes, Schmelzpunkt 196°C–198°C.

Beispiel 26

N,N-Diethyl-3-thiophenkarboxamid

Einer bei 0°C mit Stickstoff gespülten Lösung von 7,5g Thiophen-3-karbonsäure, 6,44 ml N-Methylmorpholin und 150 ml Tetrahydrofuran wurden 7,3ml Trimethylazetylchlorid zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 0°C eine Stunde lang gerührt, gefolgt vom Zusatz von 6,04ml Diethylamin in 40ml Tetrahydrofuran. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden lang bei Zimmertemperatur gerührt, in vacuo konzentriert und in Dichloromethan aufgelöst. Die organische Schicht wurde mit 10% NaOH, 10% HCl, Wasser und einer gesättigten Lösung von Sole gewaschen. Die Dichloromethanlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, in vacuo konzentriert und durch Kolonnenchromatografie gereinigt, was 6,59g eines gelben Öls ergab.

Beispiel 27

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-diethyl-3-thiophenkarboximidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von N,N-Diethyl-3-thiophenkarboxamid und 4-Aminophenylsulfon hergestellt und ergab 7,1g des Produktes, Schmelzpunkt 135°C–140°C.

Beispiel 28

1,1'-[Sulfonylbis(4,1-phenylen)nitriolo(phenylmethylidyn)]]-4-methylpiperazin

Die Titelverbindung wurde unter Anwendung des Verfahrens von Beispiel 1 und unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und 1-Benzoyl-4-methylpiperazin hergestellt und ergab 3,0g des Produktes, Schmelzpunkt 210°C–212°C.

Beispiel 29

1,1'-[Sulfonylbis(4,1-phenylen)nitriolo(4-fluorophenyl)-methylidyn)]]bis(4-(4-fluorophenyl))

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und 1-(4-Fluorobenzoyl)-4-(4-fluorophenyl)piperazin hergestellt und ergab 2,1g des Produktes, Schmelzpunkt 249°C–251°C.

Beispiel 30

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N-diethylethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylazetamid hergestellt und ergab 2,0g eines blaßbraunen Pulvers.

Beispiel 31

N'-N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N-ethylethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N-Ethylazetamid hergestellt und ergab 1,0g eines blaßgelben Glases.

Beispiel 32

N',N'''-(Sulfonyldi-4,1-phenylen)bis[N,N-diethyl-3-pyridinkarboximidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 4-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylnikotinamid hergestellt und ergab 12,4g eines grauweißen Pulvers.

Beispiel 33

N,N-Diethyl-4-fluoro-N'-(4-[(4-fluorophenyl)sulfonyl]-phenyl)benzenkarboximidamid

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von N,N-Diethyl-4-(fluoro)benzamid und p-(p-Fluorophenylsulfonyl)anilin hergestellt und ergab 3,0g des Produktes, Schmelzpunkt 149°C–151°C.

Beispiel 34

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N-dimethylmethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Dimethylazetamid hergestellt und ergab 5,2g des Produktes.

Beispiel 35

N',N'''-(sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N-diethylpropanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylpropionamid hergestellt und ergab das Produkt in Form eines braunen, halbfesten Stoffes.

Beispiel 36

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N-methylpropanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N-Methylpropionamid hergestellt und ergab das Produkt in Form eines braunen Gummis.

Beispiel 37

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N-diethylmethanimidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylformamid hergestellt und ergab 7,2g eines braunen Öls.

Beispiel 38

N',N'''-(Sulfonyldi-3,1-phenylen)bis[N,N'-diethyl-3-pyridinkarboximidamid]

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 3-Aminophenylsulfon und N,N-Diethylnikotinamid hergestellt und ergab 11,2g eines braunen, halbfesten Stoffes.

Beispiel 39

1-[[[3-[(2-Aminophenyl)sulfonyl]phenyl]imino]zyklopropylmethyl]piperidin

Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 2,3'-Sulfonyldianilin und Zyklopropylkarboxylpiperid hergestellt und ergab das Produkt in Form eines gelben Gummis.

Beispiel 40

N-(1-Butyl-2-pyrrolidinyliden)-2-[4-[(1-butyl-2-pyrrolidinyliden)amino]phenyl]sulfonyl]benzenamin

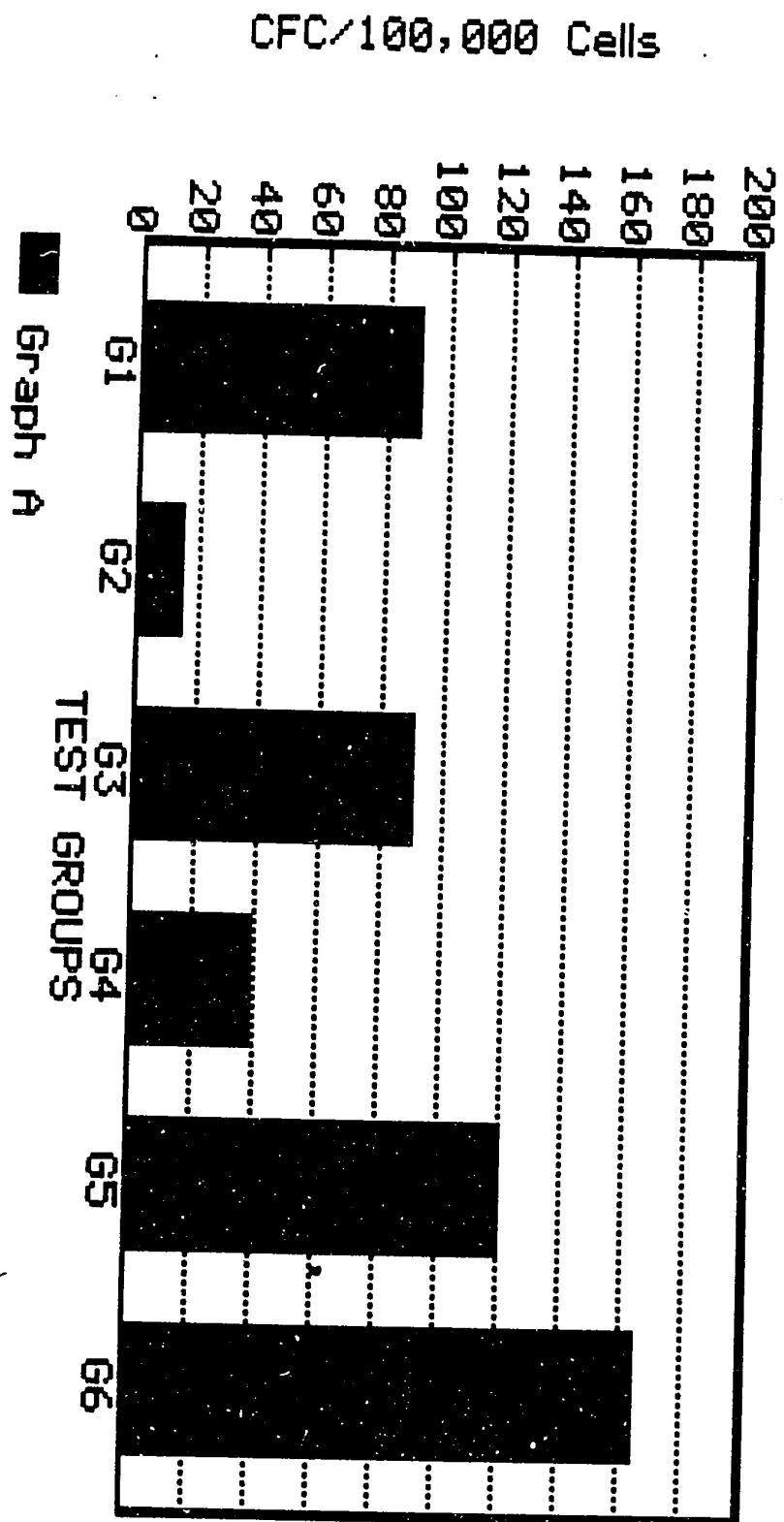
Die Titelverbindung wurde nach dem Verfahren von Beispiel 1 unter Verwendung von 2,4'-Sulfonyldianilin und N-n-Butyl-2-pyrrolidon hergestellt und ergab 0,80g des Produkts als pinkfarbenedes Öl.

Beispiel 41

N'-[2-[3-[[[(Dimethylamino)methylen]amino]phenyl]sulfonyl]-phenyl]-N,N-dimethylmethanimidamid

Ein- π mit Stickstoff gespülten Lösung von 137,4mg (145 μ l) N,N-Dimethylformamid in 1 ml trockenem Azetonitril wurden 230mg (140 μ l) Phosphoroxchlorid zugesetzt. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur 1,5 Stunden lang gerührt, es wurden 248,3mg 2,3'-Sulfonyldianilin zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden lang bei 45°C gerührt. Die Reaktion wurde mit Eiswasser verdünnt, mit 5N Natriumhydroxid basisch gemacht und das gewünschte Produkt aufgefangen, Schmelzpunkt 124°C–126°C.

289521



289521

CFC/100,000 Cells

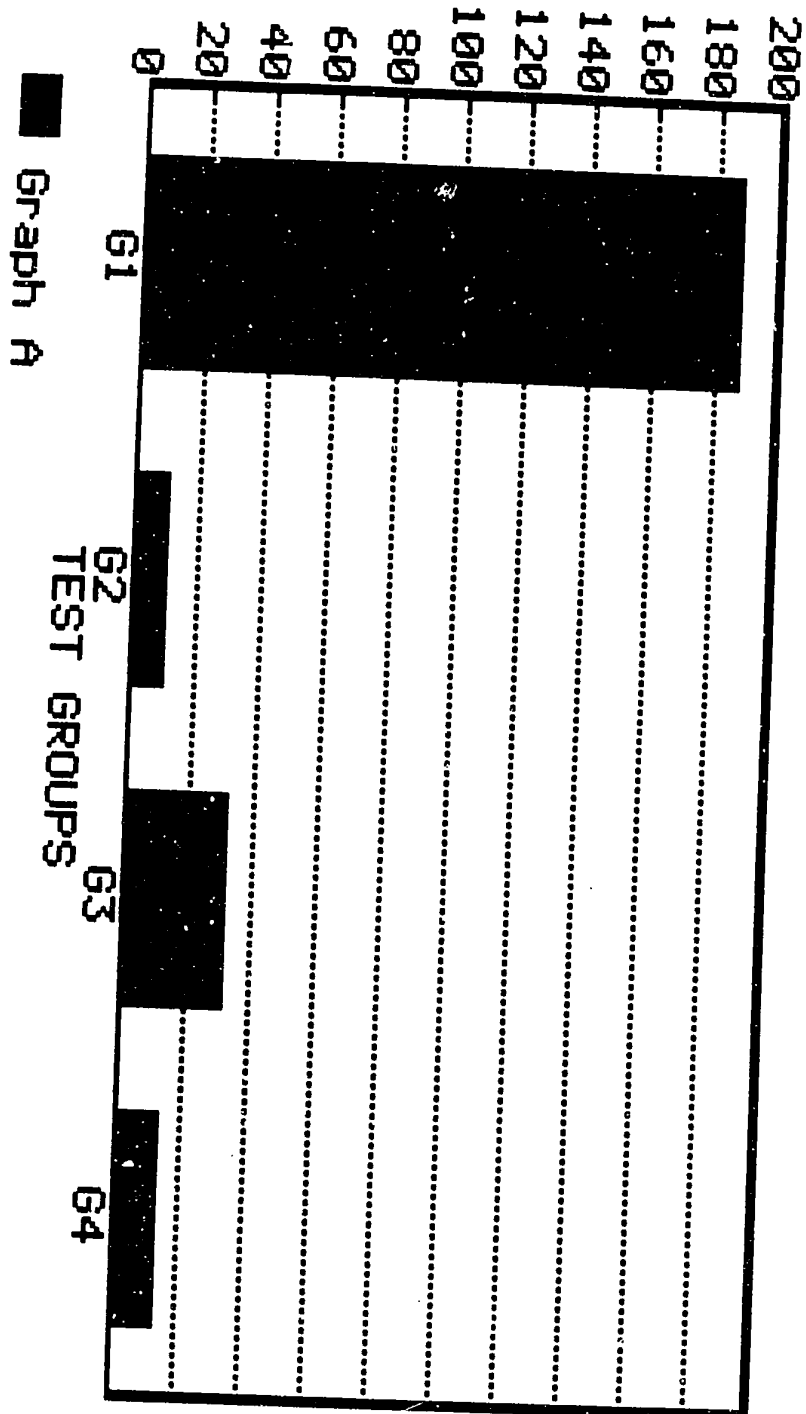


Figure 2

289521

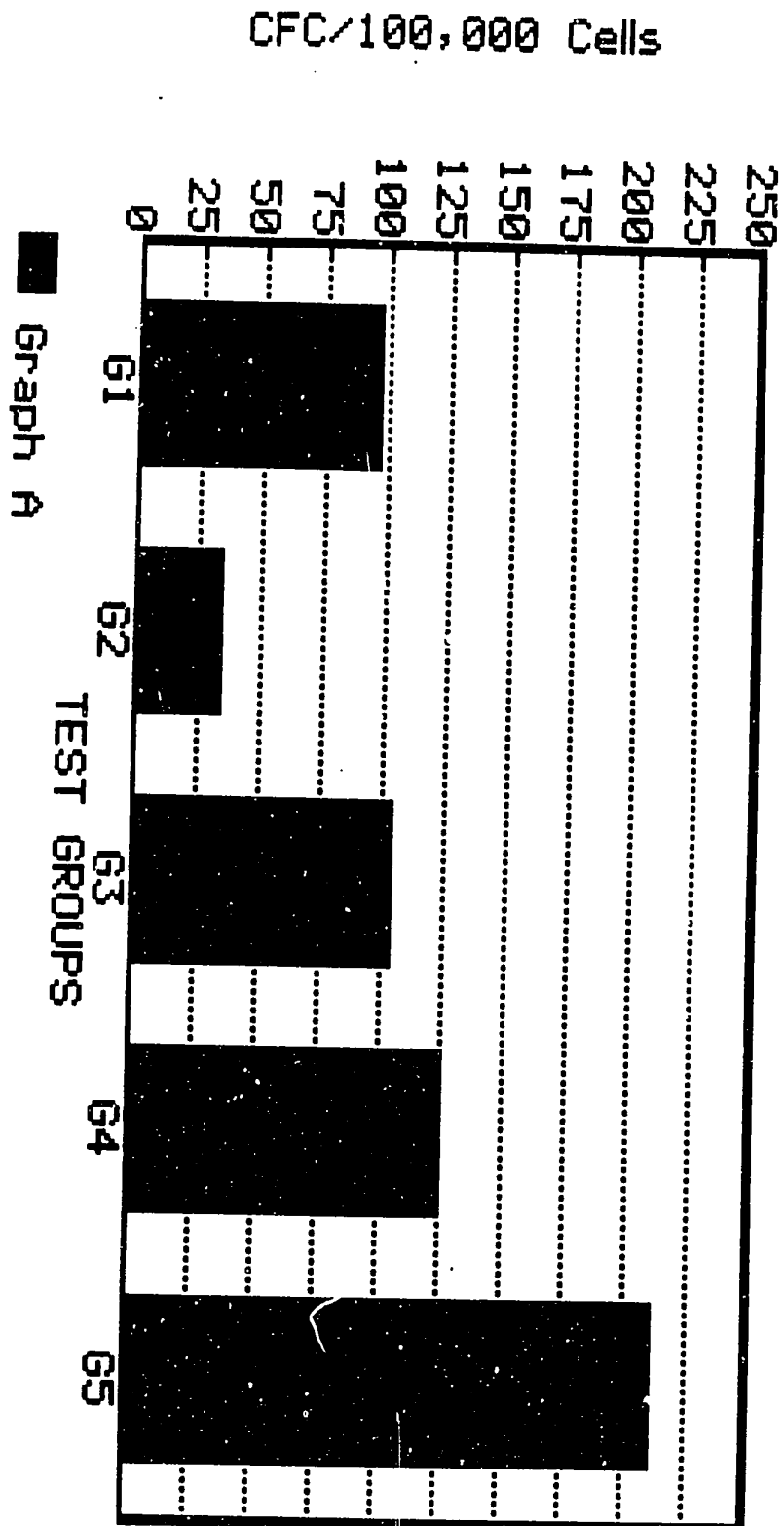


Figure 3

289521

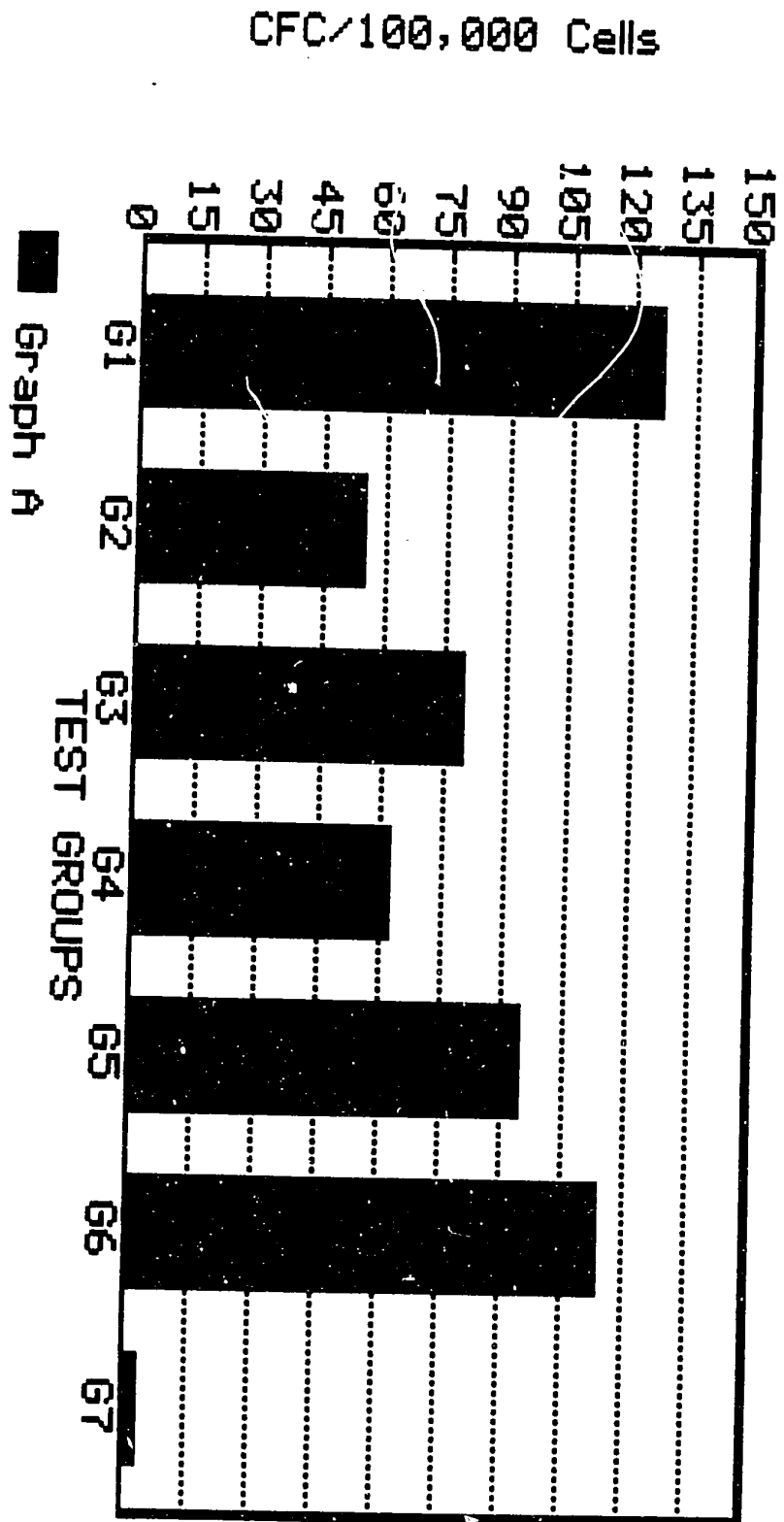


Figure 4