



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsenC (45) Patentti myönnetty - Patent beviljats
(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 07C 335/38

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	854790
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	03.12.85
(24) Alkupäivä - Löpdag	02.04.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	03.12.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.90
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	HU85/00022
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
03.04.84 HU 1324/84	19.03.85 HU 1324/84

(71) Hakija - Sökande

1. Peremartoni Vegyipari Vállalat, Peremartongyártelep, Hungary, (HU)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Vértesi, Csaba, 22, Lakatos u., Budapest, Hungary, (HU)
 2. Molnár, Attila, 6/B, Városkuti u., Budapest, Hungary, (HU)
 3. Guczoghy, Lajos, 79, Vécsey u., Budapest, Hungary, (HU)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Ky

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

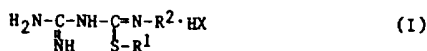
Menetelmä terapeutisesti käyttökelpoisten isotiuronium-suolojen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara isotiuronium-salter

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 3960949 (C 07 C 129/16),
Int. J. Rad. Biol. vol. 10 (4) p. 343-352

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämän keksinnön mukaisesti saadaan aikaan yleisen kaavan

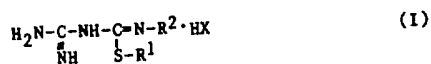


mukaisia isotiuronium-suoloja (jossa kaavassa
 R^1 on C_1 -6-alkyyli, C_2 -6-alkenyli, C_2 -6-alkynyli,
 C_3 -6-sykloalkyyli, aralkyyli tai aryyli, jolloin mainitut
 ryhmät on valinnanvaraisesti substituoitu yhdellä tai
 useammalla hydroksilla, merkaptolla ja/tai halogeenilla,
 R^2 merkitsee vetyä, C_1 -6-alkyyliä, C_2 -6-alkenyliä, C_2 -6-
 alkynyliä tai C_3 -6-sykloalkyyliä,
 X merkitsee orgaanista tai epäorgaanista anionia.
 Keksinnön mukaiset yhdisteet ja suolat voidaan valmistaa
 saattamalla yleisen kaavan II



mukainen yhdiste reagoimaan sellaisen alkylointiaineen kans-
 sa, joka pystyy liittämään R^1 -ryhmän.
 Yleisen kaavan I mukaisilla yhdisteillä on antituumori- ja
 immunostimulanttinen vaikutus ja niitä voidaan käyttää tera-
 piassa.

Medelst denna uppfinning ernås isotiuronium-salter med den allmänna formeln



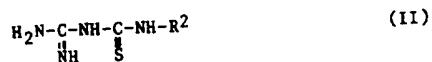
(vari

R^1 är C_1 -6-alkyl, C_2 -6-alkenyl, C_2 -6-alkynyl, C_3 -6-cykloalkyl, aralkyl eller aryl, varvid nämnda grupper är valbart substituerade med en hydroxi, merkapt och/eller halogen eller flera dylika,

R^2 betyder väte, C_1 -6-alkyl, C_2 -6-alkenyl, C_2 -6-alkynyl eller C_3 -6-cykloalkyl,

X representerar en organisk eller oorganisk anjon.

Föreningarna enligt uppfinningen kan framställas genom omsättning av en förening med formeln II



med ett alkyleringsmedel, som förmår införa en R^1 -grupp. Föreningarna med den allmänna formeln I uppvisar antitumör- och immunostimulerande verkan och är nyttiga vid terapi.

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten isotiuronium-suolojen valmistamiseksi

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten isotiuronium-suolojen valmistamiseksi. Mainitut isotiuronium-suolat ovat uusia yhdisteitä. Näillä yhdisteillä on käyttökelpoinen antituumori-, antiparasiittinen ja immunostimulanttinen vaikutus ja niitä voidaan käyttää ihmisten ja eläinten terapiassa.

Yleisen kaavan I



mukaiset yhdisteet, joissa R^1 merkitsee metyyliä, etyyliä tai bentsyyliä ja R^2 merkitsee vetyä, ovat tunnettuja (FR-patenttijulkaisu 788,429 ja DOS 2,426,683). Näissä julkaisuissa nämä yhdisteet on kuitenkin mainittu vain väli tuotteina ja julkaisuissa ei puhuta mitään niiden biologisesta aktiivisuudesta eikä näiden yhdisteiden käytöstä terapiassa.

Simons ja Davis (Int. J. Rad. Biol., Vol. 10, nro 4, 343 - 352) ovat tutkineet edellä mainituista patenttijulkaisuista tunnetun S-etyylliguanyylitioureaan vetybromidisuolan biologista aktiivisuutta. He päätyivät kuitenkin siihen tulokseen, että se ei ole merkittävä, "not significant".

US-patenttijulkaisusta 3,960,949 tunnetaan edelleen sellaisen kaavan I mukaisen yhdisteen käyttö 1,2-biguanidien valmistuksen lähtöaineena, jossa R^1 merkitsee metyyliä ja R^2 merkitsee etyyliä. Tässäkään julkaisussa ei kuitenkaan mainita mitään tämän yhdisteen terapeuttisista ominaisuuksista.

Tämän keksinnön mukaisesti saadaan siten aikaan terapeuttisesti käyttökelpoisia uusia yleisen kaavan I



mukaisia yhdisteitä (jossa kaavassa

R^1 on C_{1-6} -alkyyli, C_{2-6} -alkenyyl, C_{2-6} -alkynyyl
tai bentsyyli, jolloin mainitut alkyyli-ryhmät on valin-
nanvaraisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hyd-
roksilla, merkaptolla ja/tai halogeenilla,

R^2 merkitsee vetyä, C_{1-6} -alkyyliä, C_{2-6} -alkenyylä tai
 C_{3-6} -sykloalkyyliä ja

X merkitsee halogeeni-ionia,

edellyttäen, että jos R^2 merkitsee vetyä, R^1 on muu kuin
metyyli, etyyli tai bentsyyli ja mikäli R^2 on etyyli, R^1
on muu kuin metyyli).

Käsite " C_{1-6} -alkyyli" merkitsee suoraketjuisia tai haarautu-
neita tyydyttyneitä alifaattisia hiilivetyryhmiä (esim. me-
tyyli, etyyli, n -propyyli, isopropyyli, n -butyyli, isobutyy-
li jne.) Käsite " C_{2-6} -alkenyyl" tarkoittaa suoraketjuisia
tai haarauneita olefiinisiä tyydyttymättömiä ryhmiä (esim.
vinyyli, allyyli, metallyyli jne.). Käsite " C_{2-6} -alkynyyl"
merkitsee suoraketjuisia tai haarautuneita alifaattisia ryh-
miä, joissa on vähintään yksi kolmoissidos (esim. propargyy-
li jne.). Käsite " C_{3-6} -sykloalkyyli" merkitsee syklisiä tyy-
dyttyneitä alifaattisia hiilivetyryhmiä (esim. syklobutyyli,
syklopentyyli, sykloheksyyli jne.). Käsite "halogeeni" mer-
kitsee fluori-, kloori-, bromi- ja jodiatomeja.

Esimerkkeinä mainituista substituoiduista alkyyli-ryhmistä
voidaan mainita seuraavat ryhmät: 2-kloorietyyli, 3-bromi-
propyyli, 2-hydroksietyyli, 3-kloori-2-hydroksipropyyli jne.

Yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden eräänä edullisena
ryhmänä ovat ne johdannaiset, joissa R^1 on allyyli.

Eräänä toisena yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden edulli-
sena ryhmänä ovat ne johdannaiset, joissa R^1 on 2-halogeeni-
etyyli.

R^2 merkitsee sopivimmin vetyä, metyyliä, etyyliä, n -propyy-
liä, isopropyyliä, n -butyyliä, allyliä tai sykloheksyyliä.

X merkitsee sopivimmin etenkin kloridia, bromidia tai jodia.

Etenkin etusijalla olevia yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden edustajia ovat seuraavien johdannaisten farmaseuttisesti sopivat suolat:

N-aminoiminometyyli-S-propyyli-isotiuronium-suolat,
 N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-suolat,
 N-aminoiminometyyli-S-(2-kloorietyyli)-isotiuronium-suolat,
 N-aminoiminometyyli-S-(1-kloori-2-hydroksipropyyli)-isotiuronium-suolat,
 N-aminoiminometyyli-S-(3-klooripropyyli)-isotiuronium-suolat ja
 N-aminoiminometyyli-S-(2-hydroksietyyli)-isotiuronium-suolat.

Edelleen etusijalla olevia yleisen kaavan I mukaisia yhdisteitä ovat N-aminoiminometyyli-N'-alkyyli-S-allyyli-isotiuronium-suolat, etenkin vastaavat N'-metyyli-, N'-etyyli-, N'-n-propyyli- ja N'-isopropyyli-yhdisteet.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti saadaan aikaan menetelmä yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jonka menetelmän mukaan

yleisen kaavan II



mukainen yhdiste (jossa kaavassa R^2 merkitsee samaa kuin yllä) tai sen sopiva suola saatetaan reagoimaan alkylointiaineen kanssa, joka pystyy liittämään R^1 -ryhmän, mieluummin yleisen kaavan R^1-Y mukaisen alkylointiaineen kanssa (jossa kaavassa R^1 merkitsee samaa kuin yllä ja Y merkitsee poistuvaa ryhmää, mieluummin halogeenia) ja tarvittaessa muunnetaan näin saatu tuote suolaksi saattamalla se reagoimaan yleisen kaavan HX mukaisen hapon kanssa (jossa kaavassa X merkitsee halogeeni-onia).

Mainitusssa reaktiossa muodostuu isotiuronium-suoloja. Reaktiota seuraa yleensä N-alkyloitujen sivutuotteiden muodostuminen.

Menetelmän erään edullisen toteutusmuodon mukaisesti yleisen kaavan II mukaisia lähtöaineita ei käytetä vapaassa emäsmuodossa, vaan sopivan suolan, etenkin karbonaatin muodossa. Näin N-alkyloitujen johdannaisten muodostuminen estyy, mikä luultavasti johtuu siitä seikasta, että kehittynyt hiilidioksidi vähentää vahvasti emäksisen väliaineen pH-arvoa.

Alkylointiaineena voidaan käyttää mieluummin vastaavia alkyylihalideja tai dialkyylisulfaatteja, mutta yhtä hyvin voidaan käyttää muita alkylointiaineita.

Reaktantteja voidaan käyttää ekvimolaarisina määrinä tai alkylointiainetta voidaan lisätä ylimääränä. Reaktioväliaineena voidaan käyttää inerttejä orgaanisia liuottimia, sopivimmin alkoholia, alifaattista ketonia, alifaattista nitriliä tai eetteriä.

Reaktio voidaan suorittaa atmosfäärissä paineessa ja 20...80°C:n lämpötilassa.

Menetelmän erään edullisen toteutusmuodon mukaisesti yleisen kaavan II mukaiset lähtöaineet ja alkylointiaine saatetaan reagoimaan 1:1...1:1,8 moolisuhteessa vedettömässä etanolissa, asetonitrilissä, dimetyyliformamidissa, asetonissa tai eetterissä 20...30°C:n lämpötilassa.

Yleisen kaavan II mukaiset lähtöaineet ovat tunnettuja tai ne voidaan valmistaa sinänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti. Niinpä N-aminoiminometyyli-tiourea voidaan valmistaa helposti saattamalla disyaanidiamidi reagoimaan vety-sulfidin kanssa (Houben-Weyl VIII., 214). Yleisen kaavan II mukaiset N-aminoiminometyyli-N'-alkyylitiourea-johdannaiset voidaan valmistaa saattamalla guanidiiniemäs reagoimaan vastaavan alkyyli-isotiosyanaatin kanssa (US-patenttijulkaisu 4,009,163).

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}=\text{C}=\text{NH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{S}-\text{R}^1 \end{array} \quad (\text{IV})$$
$$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{C}\equiv\text{N} \quad (\text{III})$$

On tunnettua, että gutimiinia, joka on rakenteellisesti läheinen yleisen kaavan I mukaisille yhdisteille, on kokeiltu antihypoksiaalisena aineena [C.A. 66, 452,929 (1972); Pathol. Phys. Exp. Ther. 10, (6)] ja farmakologisissa ja kliinisissä testeissä aineena, joka saa aikaan mikroveren-

kiertohäiriöitä (Gematol. Transfusiol. (1984), 29 (1), 49-52).

On todettu, että yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet pystyvät palauttamaan organismin vähentyneen luonnollisen immuunijärjestelmän normaaliin arvoon tai lisäämään sitä yli normaalin tason.

Näin eläinten ja ihmisten organismilla on immuunijärjestelmä (esim. tuumoria eliminoiva järjestelmä). Kun mainitun järjestelmän aktiivisuus on vähentynyt tai se lakkaa toimimasta, erilaisia tauteja ja tuumoreita ilmee. Yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet aktivoivat luonnollisia immuunijärjestelmiä ja siten niitä voidaan käyttää kaikissa tapauksissa, joissa on toivottavaa lisätä immuunijärjestelmän vähentynyttä aktiivisuutta ja nostaa edelleen sen normaalia aktiivisuutta.

Yleisen kaavan I mukaisilla yhdisteillä on muita käyttökelpoisia biologisia vaikutuksia, esim. ne parantavat mikrokierokiertohäiriöitä, sitovat terveydelle haitallisia radikaaleja, parantavat happivajetta kärsivien solujen toimintaa ja pidentävät niiden kestoikkää.

Yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden biologinen aktiivisuus esitetään seuraavien testien avulla. Todettakoon kuitenkin, että kaikkia erittäin aktiivisten yhdisteiden vaikutuksia ei ole esitetty.

Vaikutusten testauksesta

Immunologiset testit:

Lymfosyytit. Lymfosyytit eristettiin Ficoll-Uromiro- (Böyum 1968) gradientilla terveiden luovuttajien ja sellaisten potilaiden laskimoverestä, jotka sairastivat pahanlaatuista imukudoskasvainta ja vastaavasti etäispesäkkeitä muodostavia kiinteitä kasvaimia. Kun valittiin viimeksi mainittuun ryhmään kuuluvia potilaita, otettiin huomioon vähentynyt ADCC-

ja NK-aktiivisuus. Fagosyytit poistettiin käsittelemällä rautajauheella ja magneetilla.

ADCC. ADCC määritettiin Perlmannin & Perlmannin menetelmän (1970) mukaisesti pienin muunnelmien (Láng et al, 1981). Kananpoikien erytrosyyttejä, jotka oli merkitty 10^5 ^{51}Cr :lla ja päällystetty antikananpoikaerytrosyytti-kaniiniseerumilla, inkuboitiin lymfosyyttien kanssa 4 tunnin ajan 37°C :ssa. Kun reaktio oli pysähtynyt, sentrifugoitujen solujen emäliuoksen aktiivisuus määritettiin gamma-laskimella. Kromin vapautumisnopeus ilmaistiin sytotoksisuus-indeksillä (CI %). Tämä arvo laskettiin yhdessä aikaisemmista julkaisuistamme määritellyllä tavalla (Láng et al, 1980) - (ks. taulukko I).

NK: NK-aktiivisuus määritettiin Jondalin ja Prossin menetelmällä (1975) käyttämällä pienehköjä muutoksia (Láng et al, 1981). K-562-kasvainsoluja, jotka oli merkitty ^{51}Cr :lla, inkuboitiin efektorisolujen kanssa TC 199 nestemäisessä ravintoväliaineessa, joka sisälsi 10 % dekomplementoitua vasikan seerumia. Kun reaktio oli päättynyt, sentrifugoitujen solujen emäliuoksen radioaktiivisuus (kromin vapautuminen) laskettiin gamma-laskimella. Aiottujen solujen kuoleminen (sytotoksisuus-indeksi %) ilmaistiin kokeessa tapahtuneen vapautumisen ja spontaanin vapautumisen erona.

Tilastolliset laskelmat suoritettiin mononäytetestin avulla. Useilla yleisen kaavan I mukaisilla yhdisteillä on erinomainen immunostimulanttinen vaikutus (esim. esimerkkien 10, 11 ja 15 mukaisesti valmistetuilla yhdisteillä). Mainitut yhdisteet pystyvät lisäämään normaalia ja voimakkaasti vähentynyttä NK- ja K-soluaktiivisuutta, jopa yli normaalin tason. Mainittu vaikutus voi olla niin voimakas, että sytotoksinen aktiivisuus, joka on vähentynyt kymmenesosaan alkuperäisestä arvosta, voidaan palauttaa alkuperäiselle tasolle (taulukko II).

Annosalueella, joka vastaa odotettua ihmisen plasmakonsentraatiota, yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet lisäävät ih-

misten lymfosyyttien NK- ja K-soluaktiivisuutta ja parantavat vastaavasti NCMC- ja ADCC-reaktiota annoksesta riippuvaisella nopeudella. Muiden immunologisten testien alustavien tulosten mukaisesti yhdisteet lisäävät blastotransformaatiota ja -migraatiota.

Suoritettaessa substituuutio typpiatomeissa molaarinen suhteellinen immunostimulanttinen vaikutus vähenee yleensä suhteessa toksisuuteen.

Koska kasvaimia sairastavien potilaiden sytotoksinen aktiivisuus vähenee verrannollisesti sairauden tilan suhteen ja lisäksi se vähenee edelleen tavanomaisten sytostaattisten hoitojen ansiosta, on erittäin tärkeää, että yleisen kaavan I mukaisilla yhdisteillä on vahva immunostimulanttinen vaikutus eivätkä ne ole immunodepressoreita. Tämä voi olla erittäin tärkeää toipumisen kannalta.

Leukosyyttien migraatio:

Leukosyyttien spontaani (satunnainen) migraatio mitattiin agaroosimikropisaroilla McCoy et al:in menetelmän mukaisesti (1977) suorittamalla muutamia pienehköjä muunnelmia (Kalmár ja Gergely, 1982).

2 ml agaroosipisaroita (0,2 %) sijoitettiin migraatiolevyille (Greiner, Saksan Liittotasavalta). TC 199 nestemäistä ravintoväliainetta lisättiin ja levyt suljettiin ilmatiiviisti. 24 tunnin kuluttua migraatioalue mitattiin stereomikroskoopilla. Migraatioalue ilmaistiin mm²:nä.

Leukosyyttien migraatio:

Terveiden luovuttajien polymorfiytimisten solujen suoraa (satunnaista) migraatiota lisättiin esimerkkien 10, 11 ja 13 mukaisilla yhdisteillä. Optimiannos oli 1,0 ug/ml. Korkeamassa annoksessa (10 ug/ml) vaikutus oli vähemmän selvä (taulukko III).

Mitogeeni-indusoitu blastos-transformaatio:

Lymfosyyttejä viljeltiin TC 199 nestemäisessä ravintoväliaineessa, jota oli täydennetty 10 %:lla dekomplementoitua vasikan seerumia, antibiooteilla ja 25 mM HEPES:illä (Serva). 200 µl solususpensiota, joka sisälsi $2 \cdot 10^5$ lymfosyyttejä, sijoitettiin mikrolevyille (valmistaja Sterilin, Iso-Britannia); viisi rinnakkaisvertailua suoritettiin.

2 ja vastaavasti 10 µg/ml Phytohaemagglutinine:aa (Leucoagglutinine; valmistaja Pharmacia, Ruotsi) ja 25 µg/ml Concanavalini A:ta (Carbiochem) lisättiin viljelyihin; yllä olevat arvot on ilmoitettu suhteessa lopulliseen konsentraatioon. Viljelmiä viljeltiin 37°C:ssa 72 tunnin ajan. Kahdeksan tuntia ennen viljelyjakson päättymistä näytteisiin lisättiin 0,5 µCi ^3H -tymidiiniä (Chemapol, Tšekkoslovakia). Inkubaatio pysäytettiin jäädyttämällä viljelmät. Sulamisen jälkeen näytteet suodatettiin automaattisessa korjuulaitteessa (Dynatech). Näytteiden radioaktiivisuus mitattiin tuikeainelaskimella. Aktiivisuus ilmaistiin cpm:nä (taulukot IV ja V).

Tilastollinen analyysi

Merkittävyys määritettiin mononäyte-2T2-testin avulla. Esimerkin 10 mukaisella tuotteella saadut tulokset on esitetty taulukoissa I, II ja III.

Alustava nopea testi antituumori- ja immunostimulanttisen vaikutuksen määrittämiseksi

Tämä menetelmä suoritettiin laboratorioissamme suuren näytemäärän testaamiseksi nopeasti. Koiraspuolisia CFLP-hiiriä (keskimääräinen paino 30 g) inokuloitiin i.p. neljällä miljoonalla askiiteslymfoomasoluilla.

Testissä käytettiin niitä eläimiä, joissa oli kehittynyt neljäntenä päivänä helposti näkyvä kasvain - s.o. askiites. Vähintään 10 eläintä käytettiin jokaisessa ryhmässä ja hiiret käsiteltiin oraalisesti LD₅₀-arvon kymmenesosalla.

24 tuntia oraalisen käsittelyn jälkeen tulokset arvioitiin Giemsa-värjättyllä askiites-voiteluaineella sytologisen analyysin perusteella. Kontrolliryhmässä käytettiin sama määrä eläimiä kuin käsitellyssä ryhmässä.

Arvioitiin kasvainsolujen vauriot, organismin aktivointi ja mahdolliset toksiset vaikutukset.

Arvioitaessa antituumorivaikutusta kuolleiden ja ehjien kasvainsolujen prosenttisuhde arvioitiin. Tulokset ilmaistaan seuraavan asteikon mukaisesti:

<u>Kasvainsolujen kuolemisnopeus</u>	<u>vaikutus</u>
0...30	ei vaikutusta
30...70 %	keskivahva vaikutus
70...100 %	vahva vaikutus (esto)

Organismin immuunijärjestelmän kasvu arvioitiin neutrofiilisten granulosyyttien, lymfosyyttien ja makrofagien määrän ja aktiivisuuden perusteella, joita esiintyi askiites-tuumorisoluissa ja jotka olivat mukana immuunijärjestelmässä. Immuunijärjestelmän aktiivisuus ilmeni nopeudella, jolla yllä mainitut askiitesissä olevat solut muodostavat plasmasiltsidoksen kasvainsolujen kanssa. Tämän arvioinnin mukaisesti, jos ei ole mitään eroa mainittujen solujen määrässä eikä aktiivisuudessa, ei voida todeta mitään kasvua kontrolliin verrattuna. Keskivahva vaikutus havaittiin, jos solumäärän ja aktiivisuuden kasvu kontrollin suhteen oli 20 %. Vaikutus oli vahva, jos immuunijärjestelmän solumäärän ja aktiivisuuden kasvu oli yli 20 % korkeampi kuin kontrollin (taulukko VII).

Toksisuus määritettiin arvioimalla neutrofiilisten granulosyyttien ja lymfosyyttien morfologiset muutokset, plasman verisuonitus, tumen fragmentoituminen, polysegmenttien muodostus ja toksinen granuloituminen. Toksisuus ilmaistaan seuraavan asteikon mukaisesti:

Havaitut tuloksettoksisuus

ei yllä mainittuja muutok-

sia omissa soluissa

20 %:n muutoksia

yli 20 %:n muutoksia

ei toksisuutta

keskisuuri toksisuus

korkea toksisuus

Antituumorivaikutuksen testaus1. In vitro:

K-562 ihmisen erytroleukemia-solujen ja P-388 hiiren lymfoomasoluviljelyjä käsiteltiin 1 - 100 ug/ml:lla testiainetta.

2. In vivo:a) NK-ly-askiites-lymfooma

1 miljoona Németh-Kellner-askiites-lymfooma-soluja siirrettiin i.p. 20 koiraspuoliseen CFLP-hiireen (keskimääräinen paino 30 g). [Uutta hiiren askiites-tuumoria käytettiin seulontavälineenä. Neoplasma 8, 337 (1961)]. Puolet eläimistä toimivat kontrollina ja loput käsiteltiin LD₅₀-arvon kymmenesosalla erilaisia yleisen kaavan I mukaisia yhdisteitä p.o. ja i.p. yhtenä ja vastaavasti viitenä seuraavana päivänä. (Jos LD₅₀-arvon kymmenesosa oli tehokas, käytettiin pienempää annosta). Käsiteltävässä ryhmässä suoritettiin askiites-voiteluaineen sytomorfologinen määrittäminen 24 tunnin kuluttua ja vaurioituneiden ja vastaavasti kuolleiden solujen suhde arvioitiin. 5 päivän ajan käsitellyissä eläimissä määritettiin eloonjääntimäärä.

b) L1210-kasvain

10⁶ L1210-kasvainsoluja siirrettiin i.p. 20 naaraspuoliseen BDF₁-hiireen (paino 20 g). Käsitely aloitettiin 24 tuntia kasvaimen siirron jälkeen ja sitä jatkettiin 8 päivän ajan. Jokainen ryhmä koostui 5 eläimestä; annos: 5, 50 ja 500

mg/kg p.o. päivittäin. Kontrolliryhmässä oli samoin 5 eläintä. Eloönjääntimäärää tarkkailtiin.

c) Lewis-pitkäaikaiskasvain

Jokaisessa ryhmässä käytettiin 6 eläintä. Annos: 5 ja 50 mg/kg. Kontrolliryhmässä oli samoin 6 eläintä. Testissä käytettiin naaraspuolisia C₅₇Bl-hiiriä (paino 20 g).

Kasvain siirrettiin s.c. oikean jalan lihakseen. 10 päivän kuluttua jalka amputoitiin, oraalinen käsittely käynnistettiin ja sitä jatkettiin 9 päivän ajan. Eläimet tapettiin ja etäispesäkkeet laskettiin stereomikroskoopilla.

d) Erilajisia koiria, joilla oli spontaani rintasyöpä (ductus cc.), käsiteltiin 4 viikon ajan 1...10 mg/kg:n oraalisilla testiaineiden annoksilla. Testileikkaus suoritettiin ja kudospätkät kerättiin histologista analyysiä varten.

Esimerkkien 10, 12, 13, 14, 22, 23, 29, 30, 31, 33 mukaisilla yhdisteillä on erinomainen antituumorivaikutus. Näin esimerkin 10 mukainen yhdiste estää ihmisen K-562 erytroleukemia-solut kudospätkätestissä 4 ug/ml:n konsentraatiossa. Toisaalta tämä yhdiste estää P-388-solujen uudiskasvua ainoastaan 40 ug/ml:n konsentraatiossa ja korotettaessa konsentraatio 400 ug/ml, aktiivisuudesta ei tule vahvempaa. Suuren aktiivisuuden omaavilla yhdisteillä on annoksesta riippuvainen vaikutus 0,5...5 ug/ml:n konsentraatiossa, kun taas alhaisen aktiivisuuden omaavat yhdisteet eivät ole annoksesta riippuvaisia. In vivo-testien mukaisesti tämän yhdisteryhmän jäsenet eivät ole joko ollenkaan aktiivisia L₁₂₁₀-kasvainta vastaan tai vain hyvin pienessä määrin.

Yhdisteet vähentävät merkittävästi Lewis-pitkäaikaiskasvaimen keuhkoetäispesäkkeiden määrää. Yhdisteet 10, 12, 13, 14, 22, 23, 39 ovat tehokkaita annoksessa, joka on alhaisempi kuin LD₅₀-arvon kymmenesosa. Esimerkin 13 mukainen yhdiste vähentää 50 %:lla keuhkometastaasien määrää jo 5 mg/kg:n annoksessa ja tämä tulos on erittäin merkittävä sen seikan johdosta, että LD₅₀ = 2380 mg/kg.

On todettu, että vaikutusta voidaan vahvistaa suuremmassa määrin toistamalla hoito kuin lisäämällä annosta.

Esimerkkien 10, 12, 13, 17, 22, 39 mukaiset yhdisteet osoittautuivat aktiivisiksi Nk-ly-askiites-kasvaimen suhteen konsentraatiossa, joka oli alle kymmenesosan LD₅₀-arvosta. Viimeksi mainitut yhdisteet lisäävät eloonjääntä ja elinikää annoksen mukaan. Näillä yhdisteillä on immunostimulanttinen vaikutus pienissä annoksissa, kun taas korkeammissa annoksissa suora antituumorivaikutus ilmenee samoin. Näin esimerkin 10 mukaisilla yhdisteillä on immunostimulanttinen vaikutus 25 mg/kg:n annoksissa. Esimerkin 10 mukainen yhdiste on sytotoksinen 250...500 mg/kg:n annosalueella. Yleisen kaavan I mukaiset S-allyyli-, S-1-kloori-2-hydroksipropyylitai S-1-bromi-2-hydroksi-propyyli-substituoidut yhdisteet ovat erittäin aktiivisia koirien spontaaneja rintakasvaimia vastaan. 3...4 viikkoa kestävästä käsittelyn jälkeen elävästä kudoksesta otetussa näytteessä todettiin tunkeutuvan luonteen omaavaa lymfosyyttien ja neutrofiilisten granulosityttien, makrofagien ja silloin tällöin eosinofiilisten granulosityttien soluinfiltraatiota kasvaimissa (ductus cc.). Kasvainsoluissa havaittiin rappeutumista osoittavia muutoksia ja voimakasta hajoamista.

NK-solut muodostavat plasmasiltasidoksia kasvainsolujen kanssa ja tämä saa aikaan kasvainsolujen plasman solurakulan rappeutumista ja tuman DNS-rakenteen suurta ohenemista. Tuma-plasma-suhde muuttuu, tumat paisuvat voimakkaasti ja plasman basofiilisyyksi eli emäshakuisuus pienenee.

Noin neljäsosassa tapauksista leukosyyttien tunkeutuminen kasvaimeen on mitättömän pieni; toisaalta kasvainsolut ovat paisuneet ja lasimaisesti rappeutuneita. Solujen väliseen rakenteeseen saostuu hyvin suuri määrä lasimaisesti värjäytynyttä materiaalia.

Annettaessa esimerkin 10 mukaista yhdistettä oraalisesti 30 ...120 mg:n päivittäisenä annoksena (0,5 - 2 mg/kg) 6...12

kuukauden ajan havaittiin merkittävä parannus tai vastaavasti toipuminen rintasyövän, munasarjasyövän ja haimasyövän aiheuttamien ihmisen luumetastaaseissa.

Antituumorivaikutuksen testauksesta yhdistelmissä

1) Yhdistelmät tunnettujen sytostaattisten aineiden kanssa:

Erilaisia sytostaattisia eli solun kasvua ehkäiseviä aineita, joilla oli biologinen alkylointivaikutus, annettiin yhdessä yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden kanssa CFLP-hiirille, joilla oli NK-ly-askiites-kasvain. Sytostaattiset aineet annettiin oraalisesti, intraperitoneaalisesti tai intravenöosisesti annoksena, joka vastasi viidesosaa tai kymmenesosaa LD₅₀-arvosta tai tekniikan tasolla tehokkaimaksi esitettyä annostuksena. Yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet annettiin oraalisesti annoksena, joka vastasi kymmenesosaa tai kahdeskymmenesosaa LD₅₀-arvosta, yhtenä annoksena tai useina kertoina 48 tunnin kuluttua sytostaattisella aineella suoritettua käsittelyn jälkeen. Näin annettiin syklofosfamidin, karnomustiinin, degranolin, dibromidulsitolin ja dibromimannitolin yhdistelmiä toisaalta ja toisaalta esimerkkien 10, 12, 13, 14, 15, 22, 23, 39 mukaisia yhdisteitä. Verrattuna ainoastaan tunnetuilla sytostaattisilla aineilla käsiteltyyn kontrolliryhmään antituumorivaikutus vahvistui ja immunodepressio väheni.

2) Yhdistelmä tunnettujen vitamiinien kanssa:

Yleisen kaavan I mukaisia isotiuronium-suoloja voidaan tehokkaasti yhdistellä vitamiinien A ja D₃ keskisuurien annosten ja vitamiinin C suurien annosten kanssa. Hyviä tuloksia saatiin sekä farmakologissa testeissä että ihmisten kliinisissä tapauksissa.

3) Yhdistelmä tunnettujen hormonien kanssa:

Käsiteltäessä hormoni-riippuvaisia kasvaimia yhdistelmä osoittautui käyttökelpoiseksi sekä farmakologisissa testeissä että ihmisten kliinisissä tapauksissa.

4) Käyttö kirurgiassa:

Yleisen kaavan I mukaisia yhdisteitä käytettiin onnistuneesti farmakologisissa testeissä kiinteiden kasvaimien tapauksessa kirurgiseen esi- ja jälkihoitoon (NK-ly kiinteä, Yosida). Voidaan todeta farmakologisten testien perusteella, että yleisen kaavan I mukaiset yhdisteet ovat luultavasti sopivia myös käytettäväksi ihmisten kirurgiassa esi- ja jälkihoidossa.

Antiparasiittivaikutuksen testaus:

Yleisen kaavan I mukaisia yhdisteitä annettiin oraalisesti koirille, jotka oli infektoitu punkeilla (*Ixodes ricinus*) kolmen päivän ajan. Näin N-aminoiminometyyli-S-allyyli-iso-tiurenumhydrokloridia annettiin oraalisesti 1 - 2 mg/kg ja punkkien kuolinmäärä rekisteröitiin. 6 - 8 tuntia yleisen kaavan I mukaisen aktiivisen aineen antamisen jälkeen kaikki punkit olivat kuolleet koirissa.

Vapaiden radikaalien sitominen:

Esimerkkien 9, 10, 15 ja 24 mukaiset yhdisteet vähentävät merkittävästi vetyperoksidin, orgaanisten peroksidien ja biologisten alkylointi- (vapaan radikaalin muodostavien) aineiden toksisuutta (LD_{50}). Perustuen yleisen kaavan I mukaisen yhdisteiden edullisiin toksisuusarvoihin ne ovat sopivampia vapaiden radikaalien sitomiseen ja suojaavat paremmin säteilyltä kuin tunnetut isotiurenum-johdannaiset, jotka saadaan vastaavasta tioureasta.

Kardioprotektiivinen vaikutus isoprenaliini-nekroosissa:

5 mg/kg isoproterenolia annettiin i.p. koiraspuolisille CFY-rotille (paino 250-300 g). Jokaisessa ryhmässä oli 10 eläintä. Osa eläimistä toimi kontrollina ja loput käsiteltiin 1... 5 mg:llä/kg i.p. tai 10...50 mg:llä/kg p.o yhdistettä n:o 13. Kahden viikon kuluttua sydämet tutkittiin histologisesti. Sydänlihaksen kuolioituneiden ja terveiden alueiden

suhde määritettiin. Todettiin, että kaikki käsittelyt yleisen kaavan I mukaisella N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-hydrokloridilla tuottivat kuolion eli nekroosin merkittävän vähenemisen.

Vaurioituneella alueella testiyhdiste saa oletettavasti aikaan vaikutuksensa sitomalla neutrofiilisten granulosityttien tuottaman vetyperoksidin. Tässä mallissa muilla vapaita radikaaleja sitovilla ja antioksidanttimolekyyleillä on samanlainen vaikutus.

Vaikutus verenkiertoon ja hengitykseen:

Esimerkin 10 mukainen yhdiste i.v. 10 mg/kg-annoksena annettuna ei vaikuta huomattavasti selllaisten kissojen hemodynaamisiin parametreihin ja hengitystoimintaan, joilla oli avattu ja suljettu rinta. Seuraavat parametrit testattiin: kammio- ja ääreispaine, sydämen lyöntitiheys (toiminta) EKG, tilavuus/minuutti, supistuvuus, hengitystilavuus, hengitysnopeus ja vastus. Yli 10 mg/kg:n intravenöosisessä annoksessa vasen kammiopaine ja lyöntitiheys vähenivät. 50 mg/kg:n annoksessa vaikutukset olivat merkittäviä ja pitkään kestäviä. 100 mg/kg:n i.v.-annoksessa havaittiin voimakkaita hemodynaamisia muutoksia, mutta kissat eivät menehtyneet.

N-(aminoiminometyyli)-S-allyyli-isotiuronium-suolojen (halogenidien) vaikutukset (yhdiste A).

TAULUKKO I

Vaikutus ADD:hen. Sytotoksisuusindeksi (%).
 Efektorisolujen ja aiottujen solujen suhde = 5:1. Inkubointiaika 4 tuntia.
 Keskimäärin: $\pm$ S.E.

Ryhmä (tapaus n:o)	Kontrolli	Käsittely	
		Yhdiste A	(Moolipaino: 194,7)
		$6,7 \times 10^{-10}$ moolia	$6,7 \times 10^{-9}$ moolia
Normaali ADCC (10)	$42,0 \pm 5,0$	$58,5 \pm 5,2$ + 39 %	$64 \pm 5,8$ + 52 %
Vähentynyt ADCC (10)	$2,8 \pm 0,8$	$6,35 \pm 1,7$ + 126 %	$68,2 \pm 5,3^x$ + 62 % $10,2 \pm 2,7^x$ + 264 %

x merkittävä ($p < 0,05$)

TAULUKKO II

Vaikutus NK-aktiivisuuteen.
Efektorisolujen ja aiottujen solujen suhde = 50:1. Inkubointiaika 4 tuntia.
Sytotoksisuusindeksi (%). Keskiarvot: $\pm$ S.E.

Ryhmä (tapaus n:o)	Kontrolli	Käsittely (moolia/ml)		
		Yhdiste A	(Moolipaino: 194,7)	
		$6,7 \times 10^{-10}$ moolia	$6,7 \times 10^{-9}$ moolia	$6,7 \times 10^{-8}$ moolia
Normaali NK (8)	$32,9 \pm 2,5$	$41 \pm 2,9$ + 25 %	$43,4 \pm 2,7$ + 32 %	$47,6 \pm 1,4$ + 45 %
Vähentynyt NK (7)	$15,1 \pm 2,4$	$21,6 \pm 3,0$ + 43 %	$25,3 \pm 3,2$ + 68 %	$32,2 \pm 3,2^x$ + 113 %

x merkittävä ($p < 0,05$)

TAULUKKO III

In vitro-vaikutus ihmisen polymorfiytimisten leukosyyttien suoraan (satunnaiseen) migraatioon. Migraatioalue (mm^2).
7 terveen kontrollin keskiarvot: $\pm$ S.E.M.

Käsittely	Kontrolli	Annos ($\mu\text{g/ml}$)		
		0,1	1,0	10,0
Yhdiste A	$10,02 \pm 1,65$	$10,51 \pm 1,22^1$	$12,25 \pm 1,58^2$	$11,24 \pm 1,69^2$

¹ ei merkittävä

² merkittävä ($p < 0,01$)

³ merkittävä ($p < 0,05$).

TAULUKKO IV

In vitro-vaikutus PHA:lla ja Con A:lla indusoitujen ihmisen lymfosyyttien blastos-transformaatioon. Normaalin reaktiivisuuden omaavat kontrollit; n = 6.
Keskimmäärin c.p.m. $\pm$ S.E.M.

Mytogeeninen aine	Kontrolli	Annos ($\mu\text{g/ml}$)		
		0,1	1,0	10,0
PHA 2 $\mu\text{g/ml}$	21166 $\pm$ 3774	22233 $\pm$ 3688	23156 $\pm$ 2737	25404 $\pm$ 2860
PHA 10 $\mu\text{g/ml}$	29959 $\pm$ 4051	29969 $\pm$ 3557	33826 $\pm$ 3638	33790 $\pm$ 5203
Con A 25 $\mu\text{g/ml}$	10545 $\pm$ 3414	10564 $\pm$ 3764	14089 $\pm$ 2602	17038 $\pm$ 3202

TAULUKKO V

In vitro-vaikutus PHA:lla ja Con A:lla stimuloitujen ihmisen lymfosyyttien blastos-transformaatioon. Vähentyneen reaktiivisuuden omaavia potilaita (tuumori ja SLE); n = 6.
Keskimäärin c.p.m. $\pm$ S:E.M.

Mytogeeninen aine	Kontrolli	Annos ($\mu\text{g/ml}$)		
		0,1	1,0	10,0
1. Yhdiste A				
PHA 2 $\mu\text{g/ml}$	3034 $\pm$ 1293	2877 $\pm$ 984	4344 $\pm$ 1153	4716 $\pm$ 1287
PHA 10 $\mu\text{g/ml}$	5267 $\pm$ 1392	5802 $\pm$ 1504	6323 $\pm$ 1161	6968 $\pm$ 1669
Con A 25 $\mu\text{g/ml}$	804 $\pm$ 307	1097 $\pm$ 354	935 $\pm$ 363	1023 $\pm$ 361

Taulukko VI

Yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden 24 tunnin akuuttitoksisuus

Esim. n:o	R ²	R ¹	LD ₅₀ mg/kg i.p. p.o.	
9	H	propyyli	2800±260	
20	H	butyyli	2700±310	
19	H	1-propyyli	2260±210	
21	H	1-amyli	2260±241	
12	H	2-kloorietyyli	1120±140	
22	H	2-bromietyyli	1050±280	
13	H	1-kloori-2-OH-propyyli	1240±160	
14	H	3-klooripropyyli	1210±180	
23	H	3-bromipropyyli	980±640	
15	H	2-hydroksietyyli	3280±460	1680±210
24	H	1-oksi-propyyli	2860±180	
10	H	allyyli	2380±320	320±30
38	H	metallyyli	1640±210	
17	metyyli	allyyli	600±54	75±6,3
29	etyyli	allyyli	780±62	84±7,6
18	isopropyyli	allyyli	280±26	32±4
39	allyyli	allyyli	380±41	36±4

Taulukko VII

Testiyhdiste esim. n:o	antituumori- vaikutus	immunostimu- lanttinen vaik.	toksinen vaikutus
9	keskisuuri	keskisuuri	0
20	keskisuuri	keskisuuri	0
19	keskisuuri	keskisuuri	0
21	keskisuuri	keskisuuri	0
12	vahva	heikko	0
22	vahva	heikko	0
13	vahva	heikko	0
14	vahva	heikko	0
23	vahva	heikko	0
15	keskisuuri	vahva	0
24	keskisuuri	keskisuuri	0
10	vahva	vahva	0
38	keskisuuri	keskisuuri	0
17	vahva	heikko	0
29	keskisuuri	keskisuuri	0
18	vahva	heikko	0
39	vahva	heikko	0

Farmaseuttiset koostumukset voidaan valmistaa sinänsä farmaseuttisessa teollisuudessa tunnetuilla menetelmillä. Yleisen kaavan I mukaiset aktiiviset aineosat voidaan viimeistellä kapselien muodossa, joihin on sekoitettu tavanomaisia yleisesti käytettyjä apuaineita (liukuaineita jne.); kapselit voidaan valmistaa käyttämällä automaattisia kapselointikoneita. Farmaseuttiset valmisteet voidaan valmistaa myös jauheampullien muodossa, injektioita ja infuusioita varten parenteraalisina koostumuksina; nämä koostumukset voidaan valmistaa myös sinänsä tunnetuilla menetelmillä. Liuottimena voidaan käyttää tislattua vettä tai fysiologista suolaliuosta.

Yleisen kaavan I mukaiset aktiiviset aineosat voidaan viimeistellä myös voiteen muodossa, etenkin lyofiillisinä voiteina. Yleisen kaavan I mukaiset aktiiviset aineosat, jotka tuoksuvat voimakkaasti, voidaan viimeistellä mieluummin mikrokapseloinnin avulla, esim. muodostamalla syklodekstriiniin sisällytettyjä komplekseja.

Farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää myös yleisen kaavan I mukaisen yhdisteen lisäksi yhtä tai useampaa tunnettua biologisesti aktiivista ainetta aktiivisena aineosana.

Farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää sekä ihmisten että eläinten terapiassa. Käytettäessä immunostimulanttina oraalinen tai rektaalinen annos voi olla mieluummin noin 0,5 - 25 mg/kg. Paikalliseen käsittelyyn käytetään mieluummin suurempia annoksia.

Teollinen soveltuvuus:

Keksinnön koskee etupäässä uusia yhdisteitä, joilla on antituumori- ja immunostimulanttinen vaikutus.

Tämän keksinnön muita yksityiskohtia on esitetty seuraavissa esimerkeissä rajoittamatta suojan piiriä esimerkkeihin.

Lähtöaineet

Esimerkki 1

N-aminoiminometyyllitiourea-karbonaatti

84,0 g (1,0 moolia) disyaanidiamidia ja 300 ml vettä laitetaan autoklaaviin. Suljettuun autoklaaviin johdetaan 34,0 g (1 moolia) kaasumaista vetysulfidia seuraavalla tavalla: 20°C:n lämpötilassa johdetaan niin paljon vetysulfidikaasua, että paine autoklaavissa on 1,5 baaria. Kaasun johtaminen lopetetaan ja autoklaavi lämmitetään hitaasti 80°C:seen. Tällä välin kaasumaista vetysulfidia johdetaan sellaisella nopeudella, että autoklaavissa tulisi olla vakiosuuruinen 1,5 baarin paine. Sen jälkeen kun koko vetysulfidikaasumäärä on johdettu autoklaaviin, autoklaavi pidetään 80°C:ssa, kunnes paine laskee 0,3...0,4 baariin. Reaktioseos jäähdytetään 20°C:seen, huuhdellaan typellä ja suodatetaan. Kirkas suodos jäähdytetään 0°C:seen ja hiilidioksidikaasua lasketaan sisään. Saostunut valkoinen kiteinen N-(aminoiminometyyli)-tiourea-karbonaatti suodatetaan pois, pestään vedellä ja kuivataan 60-80°C:ssa. Näin saadaan 100 g haluttua yhdistettä, saanto 67 %, sp. 127...129°C.

Näin saadun tuotteen IR-spektriä verrataan yhdisteen vakionäytteen IR-spektriin.

Esimerkki 2

N-aminoiminometyyli-N'-metyyllitiourea-karbonaatti

Liuokseen, jossa on 5,9 g (0,1 moolia) guanidiiniemästä ja 30 ml asetonia, lisätään liuos, jossa on 7,3 g (0,1 moolia) metyyli-isotiosyanaattia 10 ml:ssa asetonia. Isotiosyanaatti-liuos lisätään sellaisella nopeudella guanidiini-liuokseen, että seoksen lämpötila ei pääse nousemaan yli 40°C. Reaktioseoksen annetaan seistä 40°C:ssa 4 tunnin ajan, minkä jälkeen liuotin poistetaan tyhjössä. Jäljelle jäävä vaaleankeltainen öljy suspendoidaan veteen, jolloin saadaan opaakki liuos. Hiilidioksidikaasua johdetaan näin saatuun liuokseen ja haluttu yhdiste saostuu valkoisten kiteiden muodossa. Saanto: 12,0 g (73,5 %). Sp.: 132...134°C.

Esimerkit 3 - 8

Vastaavalla tavalla kuin esimerkissä 2 voidaan valmistaa seuraavat yhdisteet:

3. N-aminoiminometyyli-N'-etyyllitiourea-karbonaatti,
4. N-aminoiminometyyli-N'-n-propyyliitiourea-karbonaatti,
5. N-aminoiminometyyli-N'-isopropyyliitiourea-karbonaatti,
6. N-aminoiminometyyli-N'-n-butyyliitiourea-karbonaatti,
7. N-aminoiminometyyli-N'-allyyliitiourea-karbonaatti,
8. N-aminoiminometyyli-N'-sykloheksyyliitiourea-karbonaatti.

Seuraavissa esimerkeissä selitetään yleisen kaavan I mukaisen lopputuotteiden valmistusta.

Esimerkki 9

N-aminoiminometyyli-S-n-propyyli-isotiuronium-bromidi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyyllitiourea-karbonaattia suspendoidaan 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Suspensioon lisätään 14,8 g (0,12 moolia) n-propyyli-bromidia. Reaktioseos kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla, jolloin kehittyy hiilidioksidi. Reaktioseos kuumennetaan kiehumaan 45 minuutin kuluessa ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Kirkas suodos haihdutetaan tyhjössä ja öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Valkoiset kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 19,5 g haluttua yhdistettä, saanto 81 %, sp.: 122...124°C.

Esimerkki 10

N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-bromidi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyyllitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 14,5 g (0,12 moolia) allyylibromidia. Reaktioseos kuumennetaan kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttämällä 30 minuutin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Suo-

dos haihdutetaan tyhjössä ja öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Saostuneet kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 19,6 g haluttua yhdistettä, saanto 82 %, sp.: 123...125°C.

Esimerkki 11

N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyylitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 9,18 g (0,12 moolia) allyylikloridia ja reaktioseos kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään tunnin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Suodos haihdutetaan tyhjössä. Öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Saostuneet kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 15,7 g haluttua yhdistettä, saanto 81 %, sp.: 125...127°C.

Esimerkki 12

N-aminoiminometyyli-S-(2-kloorietyyli)isotiuronium-bromidi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyylitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 17,2 g (0,12 moolia) 1-bromi-2-kloorietaania ja reaktioseos kuumennetaan kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Kirkas suodos haihdutetaan tyhjössä. Öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Saostuneet valkoiset kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 17,2 g haluttua yhdistettä, saanto 66 %, sp.: 142...143°C.

Esimerkki 13

N-aminoiminometyyli-S-(1-kloori-2-hydroksipropyli)isotiuronium-bromidi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyylitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 20,8 g (0,12 moolia) 1-bromi-2-hydroksi-3-klooripropaania. Reaktioseos kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään 90 minuutin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Kirkas suodos haihdutetaan tyhjössä. Öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Saostuneet hieman kermanväriset kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 17,8 g haluttua yhdistettä, saanto 61 %, sp.: 118...119°C.

Esimerkki 14

N-aminoiminometyyli-S-(3-klooripropyli)isotiuronium-bromidi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyylitiourea-karbonaattia lisätään 80 ml:aan asetonitriiliä. Näin saatuun suspensioon lisätään 18,9 g (0,12 moolia) 1-bromi-3-kloori-propaania ja reaktioseos kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään 90 minuutin ajan, kiinteä aine poistetaan suodattamalla kuuma reaktioseos ja suodoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan. Saostuneet valkoiset kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 17,3 g haluttua yhdistettä, saanto 65 %, sp.: 129...131°C.

Esimerkki 15

N-aminoiminometyyli-S-(2-hydroksietyyli)isotiuronium-kloridi

14,9 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyylitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 9,7 g (0,12 moolia) etyleenikloorihydriiniä ja reaktioseos kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautus-

jäähdyttään 90 minuutin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi ja kirkas suodos haihdutetaan tyhjössä. Öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 13,5 g haluttua yhdistettä, saanto 68 %, sp.: 134...136°C.

Esimerkki 16

Esimerkkien 9 - 15 mukaisesti valmistetut isotiuronium-suolat voidaan haluttaessa kiteyttää uudelleen seuraavalla tavalla. Menetelmää selostetaan käyttämällä N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridia.

10 g N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridia lisätään 60 ml:aan etanolin ja metanolin 5:1-seosta. Pieni määrä liukenemattomia kiteitä poistetaan suodattamalla kuuma seos. Suodos selkeytetään tarvittaessa aktivoimalla hiilellä. Kirkkaan suodoksen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, jolloin saostuu valkoisia kiteitä. Seos jäähdytetään 0...5°C:seen, sen annetaan seistä tässä lämpötilassa tunnin ajan ja suodatetaan. Kiteet pestään jääkylmällä etanolilla ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 8,1 g haluttua yhdistettä, saanto 81 %.

Esimerkki 17

N-aminoiminometyyli-N'-metyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridi

16,3 g (0,05 moolia) esimerkin 2 mukaisesti valmistettua N-aminoiminometyyli-N'-metyylitiourea-karbonaattia lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 9,18 g (0,12 moolia) allyylikloridia ja reaktioseos kuumennetaan kiehumään sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään tunnin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodatetaan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Kirkas suodos haihdutetaan tyhjössä. Öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Valkoiset kiteet suodatetaan ja kuivataan

40...50°C:ssa. Näin saadaan 13,6 g haluttua yhdistettä, saanto 61 %, sp.: 137...139°C.

Esimerkki 18

N-aminoiminometyyli-N'-isopropyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridi

19,1 g (0,05 moolia) N-aminoiminometyyli-N'-isopropyyli-tiourea-karbonaattia (valmistettu esimerkin 5 mukaisesti) lisätään 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Näin saatuun suspensioon lisätään 9,18 g (0,12 moolia) allyylikloridia ja reaktioseos kuumennetaan kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttämällä tunnin ajan ja jäähdytetään huoneenlämpötilaan. Seos suodataan mahdollisesti saostuneen aineen poistamiseksi. Kirkas suodos haihdutetaan tyhjiössä ja öljyinen jäännös kiteytetään etyyliasetaatista. Saostuneet valkoiset kiteet suodatetaan ja kuivataan 40...50°C:ssa. Näin saadaan 13,3 g haluttua yhdistettä, saanto 56 %, sp.: 134...135°C.

Esimerkit 19 - 26

Vastaavalla tavalla kuin esimerkissä 11 valmistetaan seuraavat yleisen kaavan I mukaiset isotiuronium-yhdisteet:

19. N-aminoiminometyyli-S-isopropyyli-isotiuronium-bromidi, sp.: 120...122°C;
20. N-aminoiminometyyli-S-n-butyyli-isotiuronium-bromidi, sp.: 116...118°C;
21. N-aminoiminometyyli-S-isoamyyli-isotiuronium-bromidi, sp.: 111...113°C;
22. N-aminoiminometyyli-S-(2-bromietyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 129...131°C;
23. N-aminoiminometyyli-S-(3-bromipropyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 127...129°C;
24. N-aminoiminometyyli-S-(3-hydroksipropyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 132...135°C;
25. N-aminoiminometyyli-S-(3-merkaptopropyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 141...142°C;

26. N-aminoiminometyyli-S-propargyyli-isotiuronium-bromidi, sp.: 131...133°C.

Esimerkit 27 - 34

Vastaavalla tavalla kuin esimerkissä 18 valmistetaan seuraavat yhdisteet:

27. N-aminoiminometyyli-N'-metyyli-S-(2-hydroksietyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 147...148°C;
28. N-aminoiminometyyli-N'-etyyli-S-(2-kloorietyyli)isotiuronium-bromidi, sp.: 143...144°C;
29. N-aminoiminometyyli-N'-etyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridi, sp.: 138...139°C;
30. N-aminoiminometyyli-N'-isopropyyli-S-(3-klooripropyyli)-isotiuronium-bromidi, sp.: 140...142°C;
31. N-aminoiminometyyli-N'-isopropyyli-S-metallyyli-isotiuronium-kloridi, sp.: 138...139°C;
32. N-aminoiminometyyli-N'-sykloheksyyli-S-n-propyyli-isotiuronium-bromidi, sp.: 133...135°C;
33. N-aminoiminometyyli-N'-sykloheksyyli-S-metallyyli-isotiuronium-kloridi, sp.: 130...132°C;
34. N-aminoiminometyyli-N'-sykloheksyyli-S-bentsyyli-isotiuronium-kloridi, sp.: 147...149°C.

Yleisen kaavan I mukaisten yhdisteiden sulamispisteet ja IR-spektrit on esitetty seuraavassa taulukossa VIII.

Taulukko VIII

R ²	R ¹	X	Sp./°C	luonteenomaiset IR-spektrin piikit
H	<u>n</u> -propyyli	Br	122-124	3300, 3120, 2925, 2850, 1685, 1570, 730
H	allyyli	Br tai Cl	123-125	3290, 3260, 3160, 3105, 1640, 1605, 1550, 1375, 1090, 980, 910, 705, 650
H	2-kloorietyyli	Br	142-143	3300, 3110, 2925, 1640, 920, 720
H	1-kloori-2-hydr-oksipropyyli	Br	118-119	3300, 3110, 3000, 2850, 1685, 1610, 720
H	3-klooripropyyli	Br	129-131	3300, 3275, 3165, 3105, 2900, 2825, 1680, 695
H	2-hydroksietyyli	Cl	134-136	3310, 3280, 3110, 3000, 2990, 1675, 1610
H	isopropyyli	Br	120-122	3300, 3120, 1680, 1380, 1365
H	<u>n</u> -butyyli	Br	116-118	3315, 3300, 3210, 3180, 2850, 1690, 1450
H	isoamyyli	Br	111-113	3305, 3300, 3205, 3175, 2960, 2845, 1695, 1470

Taulukko VIII jatkuu

R ²	R ¹	X	Sp./°C	luonteenomaiset IR-spektrin piikit
H	isopropyyli	Br	120-122	3300, 3120, 1680, 1380, 1365
H	<u>n</u> -butyyli	Br	116-118	3315, 3300, 3210, 3180, 2850, 1690, 1450
H	isoamyli	Br	111-113	3305, 3300, 3205, 3175, 2960, 2845, 1695, 1470
H	2-bromietyyli	Br	129-131	3300, 3205, 2910, 1670, 1090, 715
H	3-bromipropyli	Br	127-129	3305, 3215, 2920, 1665
H	3-hydroksipro-pyyli	Br	132-135	3590, 3300, 3220, 2925, 1680
H	3-merkaptopro-pyyli	Br	141-142	3320, 3305, 3210, 3180, 2920, 2570, 1690
H	propargyyli	Br	131-133	3310, 3300, 3200, 2180, 1680
metyyli	allyyli	Cl	137-139	3305, 3290, 2960, 2690, 1640
metyyli	2-hydroksietyyli	Br	147-148	3583, 3300, 3285, 1680, 1375, 1360
etyyli	2-kloorietyyli	Br	143-144	3305, 3285, 2965, 1660, 765
etyyli	allyyli	Cl	138-139	3310, 3300, 3210, 3180, 1650, 990, 905

Taulukko VIII jatkuu

R ²	R ¹	X	Sp./°C	luonteenomaiset IR- spektrin piikit
isopro- pyyli	allyyli	Cl	134-135	3305, 3295, 3200, 3170, 1655, 985, 895
isopro- pyyli	metallyyli	Cl	138-139	3305, 3295, 3200, 3175, 1650, 890
isopro- pyyli	3-klooripropyli	Br	140-142	3320, 3300, 3195, 3160, 1690, 775
syklohek- syyli	<u>n</u> -propyyli	Br	133-135	3320, 3300, 3210, 3175, 2925
syklohek- syyli	metallyyli	Cl	130-132	3315, 3300, 3215, 3180, 885
syklohek- syyli	bentsyyli	Cl	147-149	3300, 3275, 3120, 3000, 1675, 1590, 750

Esimerkki 35

Tablettien ja rakeiden valmistus

Tabletit ja rakeet valmistetaan puristuskoneella, joka on varustettu automaattisella syöttölaitteella. Aktiivinen aineosa on edellä granuloitu sopivien apuaineiden kanssa kuiva- tai märkämenetelmän avulla. Jos valmistetaan märkiä rakeita, rakeet kuivataan mieluummin tyhjössä. Tablettien ja raeydinten valmistukseen käytetyt raket puristetaan sopivan metallivapaan seulan läpi. Rakeiden valmistamiseksi voidaan käyttää etenkin Pharmacopiean mukaista granule simplex-koostumusta tai jotain muuta sopivaa koostumusta. Valmistetaan tabletteja ja raeytimiä, jotka sisältävät 30 mg aktiivista aineosaa, johon on lisätty 70 mg apuainetta (esim. granulum simplex).

Esimerkki 36

Kapseleiden valmistus

Mieluummin käytetään automaattisia täyttökoneita. Aktiivinen aineosa granuloidaan sopivien apuaineiden (esim. granulum simplex) tai jonkin muun inertin lisäaineen kanssa. Rakeet saatetaan sopivaan hiukkaskokoon, seulotaan ja täytetään kapseleihin. Kapseleiden aktiivisen aineosan pitoisuus on 30 mg.

Esimerkki 37

Jauheampullien valmistus

Mitään erillisiä apuaineita ei käytetä jauheampullien valmistuksessa. Jauheampullien aktiivisen aineosan pitoisuus on 10 ja vast. 20 mg. Liuosampullit sisältävät 1 tai 2 ml tislattua vettä tai vast. fysiologista suolaliuosta. On edullista laimentaa vähintään 100 ml:lla infuusioliuosta ja käyttää ampullien sisällöt suoraan liuottamisen jälkeen.

Esimerkki 38

N-(aminoiminometyyli)-S-metallyyli-isotiuronium-bromidi

14,9 g N-aminoiminometyyli-tiourea-karbonaattia suspendoidaan 50 ml:aan abs. etanolia. Lisätään 16,1 g metallyyli-bromidia ja reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään 30 minuutin ajan. Suodattamisen jälkeen liuotin tislataan pois tyhjössä. Saadaan 21 g hunajamaista tuotetta, joka kiteytyy seistessään.

Esimerkki 39

N-(aminoiminometyyli)-N'-allyyli-S-allyyli-isotiuronium-bromidi

17,6 g N-(aminoiminometyyli)-N'-allyyli-tiourea-karbonaattia suspendoidaan 50 ml:aan vedetöntä etanolia. Lisätään 14,5 g allyyli-bromidia ja reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään sekoittaen samalla voimakkaasti tunnin ajan, minkä jälkeen seos suodatetaan ja liuotin tislataan pois tyhjössä. Saadaan 23 g öljyistä viskoosia tuotetta.

Esimerkki 40

N-aminoiminometyyli-S-allyyli-isotiuronium-kloridi

Seos, jossa on 4,2 g disyaanidiamidia, 20 ml etanolia, joka on kyllästetty kloorivetyhapolla, ja 3,7 g allyylimerkaptania, kuumennetaan hitaasti kiehumaan sekoittaen samalla voimakkaasti. Reaktioseosta kuumennetaan palautusjäähdyttään 3 tunnin ajan ja jäähdytetään 0°C:seen. Saostuneet kiteet suodatetaan pois ja pestään etanolilla. Näin saadaan 7 g haluttua yhdistettä. Sp.: 125-127°C.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten yleiskaavan



mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 on C_1 -6-alkyyli, C_2 -6-alkenyyl, C_2 -6-alkynyyl tai bentsyyli, jolloin mainitut alkyyli-ryhmät on valinnanvaraisesti substituoitu yhdellä tai useammalla hydroksilla, merkaptolla ja/tai halogeenilla,

R^2 merkitsee vetyä, C_1 -6-alkyyliä, C_2 -6-alkenyyl, tai C_3 -6-sykloalkyyliä, ja

X merkitsee halogeeni-onia,

edellyttäen, että mikäli R^2 edustaa vetyä, R^1 on muu kuin metyyli, etyyli tai bentsyyli, ja mikäli R^2 edustaa etyyliä, R^1 on muu kuin metyyli,

t u n n e t t u siitä, että

a) yleisen kaavan II



mukainen yhdiste, jossa kaavassa R^2 merkitsee samaa kuin yllä, tai sen sopiva suola saatetaan reagoimaan sellaisen alkylointiaineen kanssa, joka pystyy liittämään R^1 -ryhmän, sopivimmin yleisen kaavan R^1 -Y mukaisen alkylointiaineen kanssa, jossa kaavassa R^1 merkitsee samaa kuin yllä ja Y merkitsee poistuvaa ryhmää, edullisesti halogeenia, tai

b) kaavan III



mukainen yhdiste saatetaan reagoimaan yleisen kaavan R^1 -SH mukaisen tioalkoholin kanssa, jossa kaavassa R^1 merkitsee

samaa kuin yllä,
ja tarvittaessa muunnetaan näin saatu tuote suolaksi saattamalla se reagoimaan yleisen kaavan HX mukaisen hapon kanssa, jossa kaavassa X merkitsee halogeeni-iona.

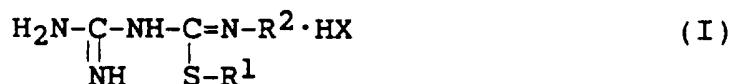
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että yleisen kaavan II mukaista lähtöainetta
käytetään suolan, sopivimmin karbonaatin muodossa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että alkylointiaineena käytetään
alkyylihalidia.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että reaktio suoritetaan orgaanisen
liuottimen, sopivimmin alkoholin, alifaattisen ketonin,
nitriilin ja/tai eetterin läsnäollessa.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara föreningar med den allmänna formeln



vari

R^1 är C_{1-6} -alkyl, C_{2-6} -alkenyl, C_{2-6} -alkynyl eller bensyl, varvid nämnda alkylgrupper är valbart substituerade med en eller flera hydroxi-, merkapto- och/eller halogen-grupper,

R^2 står för väte, C_{1-6} -alkyl, C_{2-6} -alkenyl, eller C_{3-6} -cykloalkyl, och

X representerar en halogenjon,

förutsatt att om R^2 representerar väte, så är R^1 annat än metyl, etyl eller bensyl, och

om R^2 representerar etyl, så är R^1 annat än metyl,

k ä n n e t e c k n a t av att

a) en förening med den allmänna formeln II,



vari R^2 betyder samma som ovan, eller ett lämpligt salt därav omsätts med ett alkyleringsmedel som förmår ansluta en grupp R^1 , företrädesvis med ett alkyleringsmedel med den allmänna formeln R^1-Y , vari R^1 betyder samma som ovan och Y representerar en lämnande grupp, företrädesvis halogen, eller

b) en förening med den allmänna formeln III



omsätts med en tioalkohol med den allmänna formeln R^1-SH , vari R^1 betyder samma som ovan, och vid behov överförs en

sålunda erhållen produkt till dess salt genom att omsätta den med en syra med den allmänna formeln HX , vari X står för en halogenjon.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att utgångsämnet med den allmänna formeln II används i form av ett salt, företrädesvis i form av ett karbonat.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e - t e c k n a t av att såsom alkyleringsmedel används en alkylhalid.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3, k ä n n e t e c k n a t av att reaktion utförs i närvaro av ett organiskt lösningsmedel, företrädesvis en alkohol, en alifatisk keton, en nitril och/eller en eter.