



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 666 024 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 C 149/437
A 61 K 31/145

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 5171/85

㉔ Date de dépôt: 02.04.1985

㉔ Priorité(s): 03.04.1984 HU 1324/84
19.03.1985 HU 1324/84

㉔ Brevet délivré le: 30.06.1988

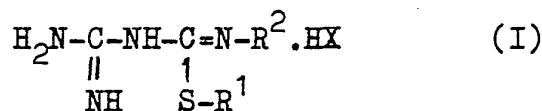
㉔ Fascicule du brevet
publié le: 30.06.1988㉔ Titulaire(s):
Peremartoni Vegyipari Vallalat,
Peremartongyartelep (HU)㉔ Inventeur(s):
Vértesi, Csaba, Budapest (HU)
Molnar, Attila, Budapest (HU)
Guczoghy, Lajos, Budapest (HU)㉔ Mandataire:
Kirker & Cie SA, Genève

㉔ Demande internationale: PCT/HU 85/00022 (En)

㉔ Publication internationale: WO 85/04399 (En)
10.10.1985

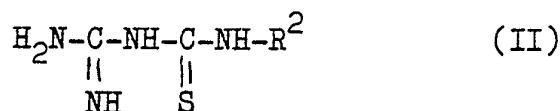
㉔ Sels d'isothiuronium, procédé pour leur préparation et compositions pharmaceutiques les contenant.

㉔ On décrit des sels d'isothiuronium de formule générale (I)



dans laquelle R¹ est un alkyle C₁₋₆, un alcényle C₂₋₆, un alcynyle C₂₋₆, un cycloalkyle C₃₋₆, un aralkyle ou un aryle, lesdits groupes pouvant comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants hydroxy, mercapto et/ou halogène; R² représente un hydrogène, un alkyle C₁₋₆, un alcényle C₂₋₆, un alcynyle C₂₋₆ ou un cycloalkyle C₃₋₆; X représente un anion organique ou minéral.

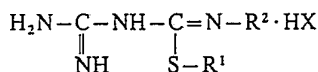
Ces composés et les sels de la présente invention peuvent être préparés en faisant réagir un composé de la formule générale (II)

avec un agent capable d'introduire un groupe R¹.

Les composés de formule générale (I) présentent un effet antitumoral et immunostimulateur et sont utiles en thérapeutique.

REVENDECATIONS

1. Composés et sels de formule générale (I)



dans laquelle R^1 est un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} , un cycloalkyle C_{3-6} , un aralkyle ou un aryle, lesdits groupes pouvant comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants hydroxy, mercapto et/ou halogène; R^2 représente un hydrogène, un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} ou un cycloalkyle C_{3-6} ; X représente un anion organique ou minéral, avec la condition que R^1 ne soit ni méthyle, ni éthyle, ni benzyle lorsque R^2 est l'hydrogène.

2. Sels de N-amino-iminométhyl-S-alkylisothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

3. Sels de N-amino-iminométhyl-S-(halogéno-2-éthyl)isothiuronium, à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

4. Sels de N-amino-iminométhyl-S-propylisothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

5. Chlorures de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

6. Halogénures de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-2-éthyl)-isothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

7. Sels de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-1-hydroxy-2-propyl)-isothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

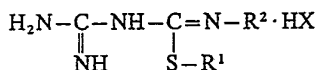
8. Sels de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-3-propyl)isothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

9. Sels de N-amino-iminométhyl-S-(hydroxy-2-éthyl)isothiuronium.

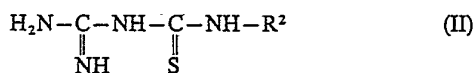
10. Sels de N-amino-iminométhyl-S-glycidylisothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

11. Sels de N-amino-iminométhyl-N'-alkyl-S-allylisothiuronium à titre de composés de formule (I) selon la revendication 1.

12. Procédé de préparation de composés et de sels de formule générale (I)



dans laquelle R^1 est un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} , un cycloalkyle C_{3-6} , un aralkyle ou un aryle, lesdits groupes pouvant comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants hydroxy, mercapto et/ou halogène; R^2 représente un hydrogène, un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} ou un cycloalkyle C_{3-6} ; X représente un anion organique ou minéral, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé de formule (II)



dans laquelle R^2 est défini comme pour la formule (I), ou un sel approprié de ce composé avec un agent d'alkylation capable d'introduire le groupe R^1 tel que défini précédemment et, lorsque cela est souhaitable, à convertir le composé de formule (I) ainsi obtenu en le faisant réagir avec un acide de formule



dans laquelle X est un anion minéral ou organique.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'agent d'alkylation est un composé de formule



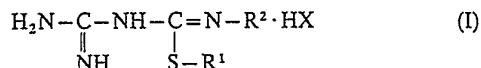
dans laquelle R^1 est défini comme indiqué ci-dessus et Y est le groupe qui part, de préférence un halogène.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que le composé de départ de formule générale (II) est sous la forme d'un sel, de préférence de son carbonate.

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'on utilise un halogénure d'alkyle ou un sulfate de dialkyle comme agent d'alkylation.

16. Procédé selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'on effectue la réaction en présence d'un solvant organique, de préférence un alcool, une cétone aliphatique, un nitrile et/ou un éther.

17. Compositions pharmaceutiques, comprenant en tant qu'ingrédient actif au moins un composé de formule générale (I)



dans laquelle R^1 est un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} , un cycloalkyle C_{3-6} , un aralkyle ou un aryle, lesdits groupes pouvant comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants hydroxy, mercapto et/ou halogène; R^2 représente un hydrogène, un alkyle C_{1-6} , un alcényle C_{2-6} , un alcynyle C_{2-6} ou un cycloalkyle C_{3-6} ; X représente un anion organique ou minéral sous la forme de la base libre ou d'un sel de cette base qui soit acceptable sur le plan pharmaceutique en mélange avec des véhicules et/ou des excipients pharmaceutiques inertes adéquats.

18. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant un sel de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium en tant qu'ingrédient actif.

19. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant en tant qu'ingrédient actif un sel de N-amino-iminométhyl-S-(halogéno-2-éthyl)isothiuronium.

20. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant en tant qu'ingrédient actif un sel de N-amino-iminométhyl-S-méthylisothiuronium ou un sel de N-amino-iminométhyl-S-éthylisothiuronium.

21. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant en tant qu'ingrédient actif un sel de N-amino-iminométhyl-S-propylisothiuronium.

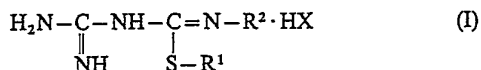
22. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant en tant qu'ingrédient actif un halogénure de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium.

23. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17, comprenant en tant qu'ingrédient actif un halogénure de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-2-éthyl)isothiuronium.

DESCRIPTION

Cette invention concerne des sels d'isothiuronium, un procédé pour leur préparation et des compositions pharmaceutiques les contenant. La majorité desdits sels d'isothiuronium sont des composés nouveaux. Lesdits composés possèdent des propriétés antitumorales et antistimulatrices utiles et peuvent être utilisés en thérapeutique humaine et animale.

Les composés de formule générale I



où R^1 est un méthyle, éthyle ou benzyle et R^2 représente un hydrogène sont connus (brevet français N° 788 429 et DOS N° 2 426 683). Lesdits composés ne sont mentionnés dans ces publications qu'en tant qu'intermédiaires, et celles-ci sont totalement muettes sur l'existence d'une activité biologique de ces composés ou sur leur utilisation thérapeutique.

Selon un aspect de la présente invention, on fournit des nouveaux composés et des sels de formule générale I tels que définis à la revendication 1.

Le terme «alkyle C₁₋₆» se rapporte aux groupes hydrocarbonés aliphatiques saturés à chaîne droite ou ramifiée (par exemple méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, isobutyle, etc.). Le terme «alcényle C₂₋₆» recouvre les groupes oléfiniques insaturés droits ou ramifiés (par exemple vinyle, allyle, méthallyle, etc.). Le terme «alcynyle C₂₋₆» se rapporte aux groupes aliphatiques droits ou ramifiés comportant au moins une triple liaison (par exemple propargyle, etc.). Le terme «cycloalkyle C₃₋₆» se rapporte aux groupes hydrocarbonés aliphatiques cycliques saturés (par exemple cyclobutyle, cyclopentyle, cyclohexyle, etc.). Le terme «groupe aryle» englobe les groupes aromatiques mono- et polycycliques (par exemple phényle, naphthyle, etc.). Le terme «aralkyle» concerne les groupes alkyle comprenant comme substituant au moins un groupe aryle (par exemple benzyle, β-phényléthyle, etc.). Le terme «halogène» recouvre les atomes de fluor, de chlore, de brome et d'iode.

Lesdits groupes alkyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle et aralkyle peuvent comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants choisis parmi les groupes hydroxy, mercapto et halogène. Comme exemples desdits groupes substitués, on peut mentionner les groupes suivants: chloro-2-éthyle, bromo-3-propyle, hydroxy-2-éthyle, chloro-3-hydroxy-2-propyle, etc.

Les composés de formule générale I dans laquelle R¹ est un allyle constituent un groupe de produits préférés.

Les composés de formule générale I dans laquelle R¹ est un halogéno-2-éthyle constituent un autre groupe de produits préférés.

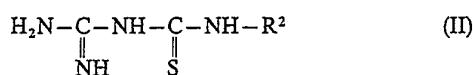
R² représente de préférence un hydrogène, un méthyle, un éthyle, un n-propyle, un isopropyle, un n-butyle, un allyle ou un cyclohexyle.

X représente de préférence un anion halogénuré, en particulier un chlorure, un bromure ou un iode.

Les sels acceptables sur le plan pharmaceutique des dérivés énumérés ci-dessous sont des produits préférés représentatifs des composés de formule générale I:

sels de N-amino-iminométhyl-S-méthylisothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-propylisothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-2-éthyl)isothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-1-hydroxy-2-propyl)isothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-3-propyl)isothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-(hydroxy-2-éthyl)isothiuronium;
sels de N-amino-iminométhyl-S-glycidylisothiuronium.

D'autres composés préférés de formule générale I sont les sels de N-amino-iminométhyl-N'-alkyl-S-allylisothiuronium, et en particulier les composés N'-méthyle, N'-éthyle, N'-n-propyle et N'-isopropyle. Selon un autre aspect de la présente invention, on fournit un procédé pour la préparation de composés de formule générale I' telle que définie à la revendication 12 et de leurs sels, qui consiste à faire réagir un composé de formule générale



(où R² a la même signification que plus haut) ou un sel approprié de ce composé avec un agent d'alkylation capable d'introduire un groupe R¹, et de préférence avec un agent d'alkylation de formule générale R¹ - Y (où R¹ a la même signification que plus haut et Y représente le groupe qui part, de préférence un halogène) et, lorsque cela est souhaité, à convertir le produit ainsi obtenu en un sel par réaction avec un acide de formule générale HX (où X est un anion d'un acide organique ou minéral).

Dans ces réactions, on forme des sels d'isothiuronium. La réaction est généralement accompagnée de la production de produits secondaires N-alkylés.

Dans une forme d'exécution préférée du procédé, le composé de départ de formule générale II n'est pas utilisé sous la forme d'une base libre, mais sous la forme d'un sel adéquat, en particulier d'un carbonate. La formation de dérivés N-alkylés se trouve alors

réduite; cela est probablement dû au fait que le gaz carbonique libéré diminue le pH du milieu fortement basique.

Comme agent d'alkylation, on peut utiliser de préférence les halogénures d'alkyle ou les dialkylsulfates correspondants, mais d'autres agents d'alkylation peuvent aussi être utilisés.

Les réactifs peuvent être utilisés en quantités équimoléculaires, ou l'agent d'alkylation peut être utilisé en excès. Comme milieu de réaction, on peut utiliser des solvants organiques inertes, et de préférence un alcool, une cétone aliphatique, un nitrile aliphatique ou un éther.

La réaction peut être réalisée sous pression atmosphérique et à une température de 20-80° C.

Dans une forme de mise en œuvre préférée, on fait réagir le composé de départ de formule générale II et l'agent d'alkylation dans un rapport molaire 1:1-1:1,8 dans de l'éthanol anhydre, de l'acétonitrile, du diméthylformamide, de l'acétone ou de l'éther et à une température entre 20° C et 30° C.

Les composés de départ de formule générale II sont connus ou peuvent être préparés selon des méthodes connues. Ainsi, on peut aisément préparer la N-amino-iminométhylthio-urée en faisant réagir le dicyanodiamide avec de l'hydrogène sulfuré (Houben-Weyl VIII, 214). Les dérivés N-amino-iminométhyl-N'-alkylthio-urée de formule générale II peuvent être préparés en faisant réagir la guanidine base avec l'alkylisothiocyanate correspondant (brevet US N° 4 009 163).

Le produit ainsi obtenu peut être converti en un sel acceptable du point de vue pharmaceutique au moyen d'un acide organique ou minéral. Pour former le sel, on peut utiliser de préférence l'acide formique, l'acide lactique, l'acide citrique, l'acide maléique, l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique ou l'acide bromhydrique.

Les composés de formule générale I possèdent des propriétés immunostimulatrices antitumorales et antiparasitaires. La force et la direction de l'activité et la toxicité dépendent des substituants de la molécule.

On sait que la gutimine — qui est proche, du point de vue de la structure, des composés de formule générale I — a été testée comme agent antihypoxémique [C.A. 66, 452 929 (1972); Pathol. Phys. Exp. Ther. 10, (6)]; cette substance a provoqué, dans des essais pharmacologiques et cliniques, des désordres de la microcirculation [Hematol. Transfusiol. (1984), 29 (1), 49-52].

Il a été trouvé que les composés de formule générale I sont capables de rétablir à un niveau normal un système immunitaire déprimé ou de renforcer un système immunitaire normal.

Les organismes humain et animaux possèdent un système immunitaire (par exemple un système éliminant les tumeurs). Lorsque l'activité dudit système est réduite ou arrête de fonctionner, diverses maladies et tumeurs apparaissent et se manifestent. Les composés de formule générale I stimulent le système immunitaire naturel, et sont donc utiles dans tous les cas où l'on souhaite rétablir l'activité d'un système immunitaire affaibli ou augmenter l'activité d'un système immunitaire normal.

Les composés de formule générale I ont d'autres effets biologiques utiles, par exemple l'élimination de désordres de la microcirculation, la fixation de radicaux néfastes pour la santé, l'amélioration du fonctionnement et l'augmentation de la durée de vie de cellules en état de sous-oxygénation.

L'activité biologique des composés de formule générale I est démontrée par les tests qui suivent. Il faut toutefois préciser que tous les effets de ces composés hautement actifs ne sont pas montrés.

Evaluation d'effets spécifiques

Tests immunologiques

Lymphocytes. Des lymphocytes étaient séparés avec un gradient de Ficoll-Uromiro (Böyum 1969) à partir de sang veineux de donneurs sains et de patients souffrant respectivement de lymphome malin et de tumeurs solides en état de métastase. Lorsque l'on faisait

appel aux patients du second groupe, la diminution de l'activité ADCC et NK était prise en considération. Les phagocytes étaient éliminés avec un traitement par de la poudre de fer et avec un aimant.

ADCC. L'ADCC était déterminé selon la méthode de Perlman et Perlman (1970) légèrement modifiée (Láng et coll., 1981). Des érythrocytes de poulet marqués avec 10^5 de ^{51}Cr revêtus d'un sérum de lapin anti-érythrocytes de poulet étaient incubés avec les lymphocytes pendant 4 h à 37°C . Après l'arrêt de la réaction, l'activité du surnageant obtenu par la centrifugation des cellules était déterminée dans un compteur gamma. Le taux de libération du chrome était exprimé sous la forme d'un indice de cytotoxicité (% IC). Cette valeur était calculée comme décrit dans une de nos publications antérieures (Láng et coll., 1980; voir tableau I).

NK. L'activité NK était déterminée selon la méthode de Jondal et Pross (1975) légèrement modifiée (Láng et coll., 1981). Des cellules malignes K-562 marquées au ^{51}Cr étaient incubées avec des cellules effectrices dans un milieu nutritif liquide TC 199 comprenant 10% de sérum de veau décomplémenté. Après l'arrêt de la réaction, la radioactivité (libération du chrome) du surnageant obtenu après centrifugation des cellules était mesurée dans un compteur gamma. La mortalité des cellules visées (indice de cytotoxicité en %) était exprimée par la différence entre la libération observée dans l'essai et la libération spontanée.

Des calculs statistiques ont été effectués au moyen d'une méthode mono-échantillon. Plusieurs composés de formule générale I manifestent un effet immunostimulateur remarquable (par exemple dans le cas des composés préparés comme décrit dans les exemples 11, 12 et 16). Lesdits composés sont capables d'augmenter d'une manière significative l'activité cellulaire NK et K lorsque celle-ci est normale ou fortement diminuée, pour atteindre des niveaux supérieurs même à la normale. Ledit effet peut être important au point de restaurer à son niveau normal une activité cytotoxique diminuée à un dixième de sa valeur originelle (tableau II).

Lorsqu'ils sont testés dans une gamme de concentrations correspondant à celles attendues dans le plasma humain, les composés de formule générale I augmentent l'activité cellulaire NK et K des lymphocytes humains et stimulent les réactions NCMC et ADCC, l'effet observé étant fonction de la dose. Les résultats préliminaires d'autres essais immunologiques ont montré que les composés augmentaient la transformation blastique et la migration.

Lorsque l'on procède à des substitutions sur les atomes d'azote, l'effet immunostimulateur proportionnel molaire se trouve généralement diminué par rapport à la toxicité.

L'activité cytotoxique de patients affectés de tumeurs diminue proportionnellement au stade de la maladie et elle est en plus diminuée par les traitements cytostatiques usuels. Dans ces conditions, le fait que les composés de formule générale I possèdent de fortes propriétés immunostimulatrices et qu'ils ne soient pas des immunodépresseurs est d'une importance capitale. Cela peut se révéler très important pour l'évolution vers la guérison.

Migration des leucocytes

La migration spontanée (au hasard) des leucocytes a été mesurée sur des microgouttes d'agarose selon la méthode de McCoy et coll. (1977) légèrement modifiée (Kalmár et Gergerly, 1982).

2 ml de gouttes d'agarose (0,2%) étaient placés sur des plaques de migration (Greiner, République fédérale allemande). Du milieu nutritif liquide TC 199 était ajouté et les plaques étaient fermées de manière à être étanches à l'air. La surface de migration était mesurée 24 heures plus tard à l'aide d'un stéréomicroscope. Les surfaces de migration étaient exprimées en mm^2 .

Migration des leucocytes

La migration directe (au hasard) des cellules polymorphonucléaires de donneurs sains était augmentée par les composés selon les exemples 11, 12 et 14. La dose optimale était de $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$. A une

dose plus élevée ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$), l'effet était moins prononcé (tableau III).

Transformation blastique induite par mitogène

Des lymphocytes étaient cultivés dans un milieu nutritif liquide T 199 complété avec 10% de sérum de veau décomplémenté, des antibiotiques et 25 mM de HEPES (Serva). 200 μl d'une suspension cellulaire comprenant $2 \cdot 10^5$ lymphocytes étaient placés sur une microplaque (fabricant: Sterilin, Grande-Bretagne); cinq essais parallèles étaient faits chaque fois.

2 $\mu\text{g/ml}$ de phytohémagglutinine, 10 $\mu\text{g/ml}$ de leucoagglutinine (fabricant: Pharmacie, Suède) et 25 $\mu\text{g/ml}$ de concavaline A (Carbiochem) étaient ajoutés aux cultures; les valeurs indiquées correspondent aux concentrations finales. Les cultures étaient incubées à 37°C pendant 72 heures. Huit heures avant la fin de l'incubation, on a ajouté 0,5 μCi de ^3H thymidine (Chemapol, Tchécoslovaquie) aux échantillons. L'incorporation était arrêtée en congelant les cultures. Après leur fonte, les échantillons étaient filtrés sur un collecteur automatique (Dynatech). La radioactivité des échantillons était mesurée dans un scintillomètre. L'activité était exprimée en cpm (tableaux IV et V).

Analyse statistique

La signification a été déterminée par le moyen d'un test mono-échantillon 2T2. Les résultats obtenus avec le produit de l'exemple 11 sont donnés dans les tableaux I, II et III.

Test préliminaire rapide pour la détermination de l'effet antitumoral et immunostimulateur

Cette méthode a été mise au point dans nos laboratoires pour pouvoir évaluer rapidement un grand nombre d'échantillons. Des souris mâles CFLP (poids moyen 30 g) étaient inoculées par voie intrapéritonéale avec quatre millions de cellules provenant d'un lymphome d'ascite.

On a utilisé dans le test ceux des animaux qui présentaient au quatrième jour une tumeur (c'est-à-dire une ascite) nettement visible. Dix animaux au moins étaient utilisés dans chaque groupe, et les souris étaient traitées par voie orale avec une dose correspondant à un dixième de la DL_{50} .

Les résultats du traitement étaient évalués 24 heures après l'administration orale par analyse cytologique d'un frottis de l'ascite coloré à l'aide d'une solution de Giemsa. On a utilisé dans le groupe de contrôle le même nombre d'animaux que dans le groupe d'animaux traités.

On a évalué les lésions causées aux cellules malignes, l'activation de l'organisme et d'éventuels effets toxiques.

Pour évaluer l'effet antitumoral, on a déterminé la proportion (en %) de cellules malignes tuées et intactes. Les résultats sont exprimés à l'aide de l'échelle suivante:

Taux de mortalité des cellules malignes	Effet
0-30%	Aucun effet
30-70%	Effet moyen
70-100%	Effet fort (inhibition)

La stimulation du système immunitaire de l'organisme était évaluée en se fondant sur le nombre et l'activité des granulocytes neutrophiles, des lymphocytes et des macrophages faisant leur apparition au milieu des cellules malignes de l'ascite et participant à la réaction immunitaire. L'activité du système immunitaire se manifeste également par la proportion de ces cellules formant des ponts plasmiques avec les cellules de l'ascite. D'après cette méthode d'évaluation, on considère qu'il n'y a pas une augmentation de l'activité lorsqu'il n'y a pas une augmentation du nombre desdites cellules et de leur activité. L'effet est considéré comme moyen lorsque le nombre de cellules ou leur activité est augmenté(e) par rapport au contrôle de 20%. L'effet est considéré comme fort lorsque l'augmen-

tation du nombre de cellules et de l'activité du système immunitaire est supérieure à 20% (tableau VII).

La toxicité a été déterminée à partir d'une évaluation des changements morphologiques observés sur les granulocytes neutrophiles et les lymphocytes, c'est-à-dire vacuolisation cytoplasmique, fragmentation du noyau, formation de polysegments et granulations de toxicité. La toxicité a été exprimée en utilisant l'échelle suivante:

Résultats observés	Toxicité
Pas de changement dans les cellules	Pas de toxicité
20% de changement	Toxicité moyenne
Changement supérieur à 20%	Toxicité forte

Evaluation de l'effet antitumoral

1. In vitro

Des cultures de cellules érythroleucémiques humaines K-562 et des cultures de cellules de lymphome de souris P-388 étaient traitées avec 1-100 µg/ml du produit testé.

2. In vivo

a) Lymphome d'ascite NK-ly

On a injecté par voie intrapéritonéale un million de cellules de lymphome d'ascite Németh-Kellner à vingt souris mâles pesant en moyenne 30 g [une nouvelle tumeur d'ascite de souris utilisable pour des tests d'orientation, Neoplasma, 8, 337 (1961)]. Une moitié des animaux servait de contrôle, et l'autre moitié était traitée avec une dose de différents composés de formule générale I correspondant à un dixième de la DL_{50} . L'administration était faite soit par voie orale le premier jour, soit par voie intrapéritonéale pendant cinq jours consécutifs. Lorsque des doses égales à un dixième de la DL_{50} se montraient efficaces, des doses plus faibles étaient testées. Dans le cas du groupe soumis à un traitement, on a effectué un examen cytomorphologique sur un frottis de l'ascite après 24 heures pour déterminer la proportion de cellules mortes et endommagées. Dans les groupes traités pendant 5 jours, on a déterminé le taux de survie.

b) Tumeur L_{1210}

10^6 cellules malignes L_{1210} étaient transplantées par voie intrapéritonéale à vingt souris femelles BDF₁ (poids 20 g). Le traitement était commencé 24 heures après la transplantation des cellules malignes et était poursuivi pendant huit jours. Chaque groupe consistait en 5 animaux. Les doses administrées chaque jour par voie orale étaient de 5, 50 et 500 mg/kg. Le groupe de contrôle consistait également en 5 animaux. Le taux de survie était déterminé.

c) Tumeur longue de Lewis

Chaque groupe consistait en 6 animaux. Dose: 5 et 50 mg/kg. Le groupe de contrôle comprenait également 6 animaux. On a utilisé dans ces essais des souris femelles C₅₇B1 (poids 20 g).

La tumeur était transplantée dans le muscle de la patte droite. 10 jours plus tard, on a procédé à l'amputation de cette patte. Le traitement par voie orale était alors commencé et il était poursuivi pendant 9 jours. Les animaux étaient ensuite sacrifiés, et les métastases étaient comptées avec un stéréomicroscope.

d) Des chiens appartenant à diverses espèces et porteurs de tumeurs de mammifère spontanées (ductus cc) étaient traités pendant 4 semaines avec des doses orales de 1-10 mg/kg des produits testés. Des excisions étaient pratiquées, et des échantillons de tissu étaient prélevés pour effectuer des analyses histologiques.

Les composés des exemples 11, 13, 14, 15, 27, 28, 34, 35, 36 et 38 présentent des propriétés antitumorales remarquables. Ainsi, le composé de l'exemple 11 inhibe des cultures de cellules érythroleucémiques humaines K-562 à la concentration de 4 µg/ml. Par contre, ce composé inhibe la prolifération des cellules P-388 seulement lorsque la concentration est de 40 µg/ml, et l'activité n'est pas augmentée lorsque cette concentration atteint 400 µg/ml. Les composés ayant une activité forte manifestent un effet qui est dépendant de la

dose dans la gamme des concentrations de 0,5 à 5 µg/ml, alors que l'effet des composés ayant une activité faible n'est pas dépendant de la dose. Selon des essais effectués *in vivo*, les composés de ce groupe sont soit inactifs vis-à-vis de L_{1210} , soit très faiblement actifs.

Les composés diminuent d'une manière significative le nombre de métastases pulmonaires dans la tumeur longue de Lewis. Les composés 11, 13, 14, 15, 22, 27, 28 et 45 sont efficaces à une dose inférieure à un dixième de la valeur DL_{50} . Le composé selon l'exemple 14 diminue le nombre de métastases pulmonaires de 50% déjà à la dose de 5 mg/kg. Ce résultat est particulièrement important lorsqu'on sait que la DL_{50} = 2380 mg/kg.

Il a été trouvé que l'effet se trouve davantage renforcé en répétant le traitement qu'en augmentant la dose.

Les composés selon les exemples 11, 13, 14, 20, 27, 45 se sont révélés efficaces contre les tumeurs d'ascite NK-ly à une concentration inférieure à un dixième de la valeur DL_{50} . Ces composés augmentent le taux de survie et la durée de vie d'une manière qui est dépendante de la dose. Ces composés manifestent des propriétés immunostimulatrices aux doses faibles, tandis qu'à des doses plus importantes, on observe en plus un effet antitumoral direct. C'est ainsi que les composés des exemples 11 et 22 manifestent un effet immunostimulant respectivement à la dose de 25 mg/kg et de 20 mg/kg. Ces composés des exemples 11 et 22 sont cytotoxiques respectivement à une dose située dans la gamme 250-500 mg/kg et la gamme 40-160 mg/kg. Les composés de formule générale I, comportant les substituants suivants: S-allyl, S-(chloro-1-hydroxy-2-propyl) ou S-(bromo-1-hydroxy-2-propyl), sont hautement actifs vis-à-vis des tumeurs spontanées de mammifère chez le chien. Grâce à des biopsies effectuées après 3-4 semaines de traitement, on a pu observer une infiltration de cellules à caractère invasif dans les tumeurs (ductus cc) consistant en lymphocytes, granulocytes neutrophiles, macrophages, et occasionnellement des granulocytes éosinophiles. Sur les cellules malignes, on a observé des changements se manifestant par une dégénérescence et par une forte décomposition.

Les cellules NK forment des ponts plasmiques avec des cellules malignes, et cela provoque une dégénérescence vacuolaire du cytoplasme des cellules malignes et un amincissement important dans les fibres d'ADN du noyau. La relation noyau-cytoplasme est changée, le noyau est fortement gonflé et la basophilie du cytoplasme est diminuée.

L'infiltration de leucocytes dans la tumeur est négligeable dans environ un quart des cas; cependant, les cellules malignes sont gonflées et atteintes d'une dégénérescence hyalinique. De grandes quantités d'hyaline se trouvent déposées dans l'espace intercellulaire.

L'administration de composé de l'exemple 11 par voie orale à une dose journalière de 30-120 mg (0,5-2 mg/kg) pendant 6-12 mois a permis d'observer une amélioration importante ou une guérison dans des cas de métastases osseuses humaines de tumeurs de mammifère, de tumeurs des ovaires et de tumeurs du pancréas.

50 Evaluation de l'effet antitumoral en association

1) Association avec des agents cytostatiques connus

On a administré différents agents cytostatiques ayant des propriétés biologiques d'agent d'alkylation en association avec des composés de formule générale I à des souris CFLP ayant des tumeurs d'ascite NK-ly. Les agents cytostatiques étaient administrés par voie orale, intrapéritonéale ou intraveineuse à une dose correspondant à un cinquième ou un dixième de la DL_{50} , ou à la dose indiquée par l'art antérieur comme étant la plus efficace. Les composés de formule générale I étaient administrés par voie orale à des doses d'un dixième ou d'un vingtième de la DL_{50} en une ou plusieurs fois, et cela 48 heures après le traitement par l'agent cytostatique. On a administré ainsi ensemble, d'une part, le cyclophosphamide, la carnomustine, le dégranol, le dibromodulcinol ou le dibromomannitol et, d'autre part, les composés des exemples 11, 13, 14, 16, 27, 28, 45. Par rapport au groupe de contrôle traité seulement par l'agent cytostatique connu, l'effet antitumoral se trouvait renforcé et l'immuno-dépression diminuée.

2) Association avec des vitamines connues

Les sels d'isothiuronium de formule générale I peuvent être utilement associés avec des doses moyennes de vitamines A et D₃, ainsi qu'avec de fortes doses de vitamine C. De bons résultats ont été obtenus aussi bien dans des tests pharmacologiques qu'en essais cliniques.

3) Association avec des hormones connues

Cette association s'est révélée utile pour le traitement de tumeurs dépendant d'hormones, aussi bien dans des tests pharmacologiques qu'en essais cliniques.

4) Utilisation en chirurgie

Les composés de formule générale I ont été utilisés avec succès dans des essais pharmacologiques sur des tumeurs solides en traitement pré- et postopératoire (NK-ly solide, Yosida). On peut dire, sur la base des essais pharmacologiques, que les composés de formule générale I sont probablement utiles pour le traitement pré- et postopératoire de patients.

Evaluation de l'effet antiparasitaire

Les composés de formule générale I ont été administrés par voie orale pendant trois jours à des chiens infestés de tiques (*Ixodes ricinus*). On a ainsi administré du chlorure de N-amino-iminométhyl-S-allylthiuronium par voie orale à la dose de 1-2 mg/kg et on a mesuré le taux de mortalité des tiques. 6-8 heures après l'administration de l'ingrédient actif de formule générale I, toutes les tiques étaient mortes.

Fixation des radicaux libres

Les composés des exemples 9, 10, 11, 16, 23 et 29 diminuent d'une manière significative la toxicité (DL₅₀) de l'eau oxygénée, des peroxydes organiques et des agents d'alkylation (formateurs de radicaux libres) biologiques. Etant donné les propriétés favorables qu'ont les composés de formule générale I sur le plan de la toxicité, ils sont mieux adaptés à la fixation des radicaux libres et à la protection contre les radiations que les dérivés d'isothiuronium connus

dérivés des thio-urées correspondantes. Ainsi, l'effet thérapeutique du composé de l'exemple 23 est meilleur que celui du chlorure de β -aminométhylisothiuronium.

Effet cardioprotecteur dans des nécroses dues à l'isoprénaline

On a administré 5 mg/kg d'isoprotérénol par voie intrapéritonéale à des rats mâles CFY pesant 250-300 g. On a utilisé 10 animaux dans chaque groupe. Une partie des animaux servait de contrôle, et l'autre était traitée avec 1-5 mg/kg (administration intrapéritonéale) ou avec 10-50 mg/kg (administration orale) du composé N° 14. Deux semaines plus tard, les cœurs étaient soumis à un examen histologique. On a déterminé le rapport de surface cardiaque nécrosée et de surface cardiaque intacte. Il a été trouvé que tous les traitements avec le chlorure de N-amino-iminométhyl-S-allylthiuronium de formule générale I provoquaient une diminution importante de la nécrose.

Le composé testé agit sur les parties endommagées probablement en liant l'eau oxygénée produite par les granulocytes neutrophiles. D'autres molécules capables de fixer des radicaux libres et antioxydantes exercent un effet similaire sur le modèle en question.

Effet sur la circulation et sur la respiration

Le composé selon l'exemple 11 n'a pas un effet très important sur les paramètres hémodynamiques et les fonctions respiratoires de chats dont la poitrine est ouverte ou fermée, lorsqu'il est administré par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/kg. Les paramètres suivants ont été testés: pression ventriculaire et périphérique, fréquence cardiaque (action), ECG, volume/minute, contractilité, volume respiratoire, vitesse de respiration et résistance. La pression du ventricule gauche et la fréquence étaient diminuées lorsque la dose administrée par voie intraveineuse était supérieure à 10 mg/kg. Lorsque la dose était de 50 mg/kg, ces effets étaient significatifs et durables. Lorsque la dose administrée par voie intraveineuse était de 100 mg/kg, d'importants changements hémodynamiques étaient observés, mais les chats ne mouraient pas.

Effets des sels de N-amino-iminométhyl-S-allylthiuronium (halogénures) (composé A)

Tableau I
Effet sur l'ADCC. Indice de cytotoxicité (%).
Rapport cellules effectrices: cellules visées = 5:1.
Durée d'incubation 4 heures.
Moyenne $\pm$ E.S.

Groupe (Nombre de cas)	Contrôle	Traitement		
		Composé A	(P.M.: 194,7)	
		6,7 · 10 ⁻¹⁰ mole	6,7 · 10 ⁻⁹ mole	6,7 · 10 ⁻⁸ mole
ADCC normal (10)	42,0 $\pm$ 5,0	58,5 $\pm$ 5,2 + 39%	64 $\pm$ 5,8 + 52%	68,2 $\pm$ 5,3* + 62%
ADCC diminué (10)	2,8 $\pm$ 0,8	6,35 $\pm$ 1,7 + 126%	7,7 $\pm$ 1,9 + 175%	10,2 $\pm$ 2,7* + 264%

*Significatif (p < 0,05).

Tableau II
Effet sur l'activité NK. Indice de cytotoxicité (%).
Rapport cellules effectrices: cellules visées = 50:1.
Durée d'incubation 4 heures.
Moyenne $\pm$ E.S.

Groupe (Nombre de cas)	Contrôle	Traitement		
		Composé A	(P.M.: 194,7)	
		6,7 · 10 ⁻¹⁰ mole	6,7 · 10 ⁻⁹ mole	6,7 · 10 ⁻⁸ mole
NK normal (8)	39,9 $\pm$ 2,5	41 $\pm$ 2,9 + 25%	43,4 $\pm$ 2,7 + 32%	47,6 $\pm$ 1,4 + 45%
NK diminué (7)	15,1 $\pm$ 2,4	21,6 $\pm$ 3,0 + 43%	25,3 $\pm$ 3,2 + 68%	32,2 $\pm$ 3,2* + 113%

*Significatif (p < 0,05).

Tableau III

*Effet in vitro sur la migration directe (au hasard)
de leucocytes humains polymorphonucléaires.
Surface de migration (mm²).
Valeurs moyennes de 7 contrôles sains: $\pm$ E.S.M.*

Traitement	Contrôle	Dose (μ g/ml)		
		0,1	1,0	10,0
Composé A	10,02 $\pm$ 1,65	10,51 $\pm$ 1,22 ¹	12,25 $\pm$ 1,58 ²	11,24 $\pm$ 1,69 ³

¹ Non significatif.
² Significatif (p < 0,01).
³ Significatif (p < 0,05).

Tableau IV

*Effet in vitro sur la transformation blastique de lymphocytes humains
stimulée par PHA et Con. A.
Nombre de contrôles sains à réactivité normale n: 6.
Moyenne de cpm $\pm$ E.S.M.*

Agent mitogène	Contrôle	Dose (μ g/ml)		
		0,1	1,0	10,0
PHA 2 μ g/ml	21166 $\pm$ 3774	22233 $\pm$ 3688	23156 $\pm$ 2737	25404 $\pm$ 2860
PHA 10 μ g/ml	29959 $\pm$ 4051	29969 $\pm$ 3557	33826 $\pm$ 3638	33790 $\pm$ 5203
Con. A 25 μ g/ml	10545 $\pm$ 3414	10564 $\pm$ 3764	14089 $\pm$ 2602	17038 $\pm$ 3202

Tableau V

*Effet in vitro sur la transformation blastique de lymphocytes humains
stimulée par PHA et Con. A.
Patients à réactivité diminuée (tumeur et SLE) n = 6.
Moyenne de cpm $\pm$ E.S.M.*

Agent mitogène	Contrôle	Dose (μ g/ml)		
		0,1	1,0	10,0
1. Composé A				
PHA 2 μ g/ml	3034 $\pm$ 1293	2877 $\pm$ 984	4344 $\pm$ 1153	4716 $\pm$ 1287
PHA 10 μ g/ml	5267 $\pm$ 1392	5802 $\pm$ 1504	6323 $\pm$ 1161	6968 $\pm$ 1669
Con. A 25 μ g/ml	804 $\pm$ 307	1097 $\pm$ 354	935 $\pm$ 363	1023 $\pm$ 361

Tableau VI

Toxicité aiguë à 24 heures de composés de formule générale I

Exemple N°	R ²	R ¹	DL ₅₀ (mg/kg)	
			Voie orale	Voie intra-péritonéale
9	H	méthyle	2320 $\pm$ 220	
23	H	éthyle	3080 $\pm$ 290	
10	H	propyle	2800 $\pm$ 260	
25	H	butyle	2700 $\pm$ 310	
24	H	i-propyle	2260 $\pm$ 210	
26	H	i-amyle	2260 $\pm$ 241	
13	H	chloro-2-éthyle	1120 $\pm$ 140	
27	H	bromo-2-éthyle	1050 $\pm$ 280	
14	H	chloro-1-OH-2-propyle	1240 $\pm$ 160	
15	H	chloro-3-propyle	1210 $\pm$ 180	
28	H	bromo-3-propyle	980 $\pm$ 640	
16	H	hydroxy-2-éthyle	3280 $\pm$ 460	1680 $\pm$ 210
29	H	oxy-1-propyle	2860 $\pm$ 180	
11	H	allyle	2380 $\pm$ 320	320 $\pm$ 30
44	H	méthallyle	1640 $\pm$ 210	
18	H	benzyle	2420 $\pm$ 260	

Tableau VI (suite)

Exemple N°	R ²	R ¹	DL ₅₀ (mg/kg)	
			Voie orale	Voie intra-péritonéale
17	H	propargyle	90 ± 7,6	
20	méthyle	allyle	600 ± 54	75 ± 6,3
34	éthyle	allyle	780 ± 62	84 ± 7,6
22	cyclohexyle	allyle	450 ± 51	65 ± 5,1
21	isopropyle	allyle	280 ± 26	32 ± 4
45	allyle	allyle	380 ± 41	36 ± 4
22	cyclohexyle	allyle	400 ± 38	40 ± 6

Tableau VII

Composé testé Exemple N°	Effet antitumoral	Effet immunostimulateur	Effet toxique
9	moyen	moyen	moyen
23	moyen	fort	0
10	moyen	moyen	0
25	moyen	moyen	0
24	moyen	moyen	0
26	moyen	moyen	0
13	fort	faible	0
27	fort	faible	0
14	fort	faible	0
15	fort	faible	0
28	fort	faible	0
16	moyen	fort	0
29	moyen	moyen	0
11	fort	fort	0
44	moyen	moyen	0
18	augmentation	0	0
17	faible	faible	moyen
20	fort	faible	0
34	moyen	moyen	0
22	fort	faible	0
21	fort	faible	0
45	fort	faible	0
22	faible	faible	0

Selon un autre aspect encore de la présente invention, on fournit des compositions pharmaceutiques comprenant comme ingrédient actif au moins un composé de formule générale I, où

R¹ est un alkyle C₁₋₆, un alcényle C₂₋₆, un alcynyle C₂₋₆, un cycloalkyle, un aralkyle ou un aryle C₃₋₆, lesdits groupes pouvant comporter, le cas échéant, un ou plusieurs substituants hydroxy, mercapto et/ou halogène;

R² représente un hydrogène, un alkyle C₁₋₆, un alcényle C₂₋₆, un alcynyle C₂₋₆ ou un cycloalkyle C₃₋₆;

X représente un anion organique ou minéral.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent être préparées par des méthodes connues de l'industrie pharmaceutique. Les ingrédients actifs de formule générale I peuvent être de préférence fournis sous forme de capsules en mélange avec des agents auxiliaires conventionnels généralement utilisés (agents de glissement, etc.); les capsules peuvent être produites en utilisant des machines d'encapsulation automatiques. Les compositions pharmaceutiques peuvent également être préparées sous forme d'ampoules de poudre, de compositions parentérales destinées à être injectées ou de perfusions; ces compositions peuvent également être préparées selon des méthodes connues. Comme solvant,

on peut utiliser, par exemple, de l'eau distillée ou une solution physiologique salée.

Les ingrédients actifs de formule générale I peuvent être également fournis sous la forme d'une pommade, et en particulier sous forme de pommades lipophiles. Les ingrédients actifs de formule générale I, présentant une odeur plutôt forte, peuvent être de préférence fournis sous forme de microcapsules, se présentant par exemple comme des complexes d'inclusion dans de la cyclodextrine.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent également contenir, en plus du composé de formule générale I, une ou plusieurs substances biologiquement actives servant d'ingrédients actifs.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent aussi bien être utilisées en thérapeutique humaine qu'animale. Lorsqu'elles sont utilisées en tant qu'immunostimulant, les doses orales ou rectales peuvent être de préférence d'environ 0,5 à 25 mg/kg. Pour les traitements locaux, il est préférable d'appliquer des doses plus fortes.

L'invention concerne essentiellement de nouveaux composés ayant un effet antitumoral et immunostimulateur.

D'autres détails de la présente invention seront trouvés dans les exemples, sans pour autant limiter le domaine de son application.

Composés de départ

Exemple 1

Carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée

On met 84,0 g (1,0 mole) de dicyanodiamide et 300 ml d'eau dans un autoclave. On introduit 34,0 g (1 mole) d'hydrogène sulfuré gazeux de la manière suivante dans l'autoclave fermé: on introduit l'hydrogène sulfuré à la température de 20° C jusqu'à ce que la pression dans l'autoclave atteigne 1,5 bar. L'introduction du gaz est arrêtée, et l'autoclave est chauffé doucement jusqu'à 80° C. Pendant ce chauffage, on introduit de l'hydrogène sulfuré gazeux en une quantité telle que la pression dans l'autoclave reste constante à 1,5 bar. Une fois la quantité totale d'hydrogène sulfuré introduite dans l'autoclave, celui-ci est maintenu à 80° C jusqu'à ce que la pression décroisse à 0,3-0,4 bar. Le mélange de réaction est refroidi à 20° C, purgé avec de l'azote et filtré. Le filtrat clair est refroidi à 0° C, et on laisse rentrer le gaz carbonique. Le carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée forme un précipité de cristaux blancs qui sont séparés par filtration, lavés avec de l'eau froide et séchés à 60-80° C. On obtient ainsi 100 g du produit recherché, ce qui correspond à un rendement de 67%. Le point de fusion est de 127-129° C.

Le spectre infrarouge du produit ainsi obtenu est comparé avec celui d'un échantillon standard du composé.

Exemple 2

Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-méthylthio-urée

On ajoute une solution de 7,3 g (0,1 mole) d'isothiocyanate de méthyle dans 10 ml d'acétone à une solution de 5,9 g (0,1 mole) de guanidine base dans 30 ml d'acétone. La solution d'isothiocyanate est ajoutée à la solution de guanidine à une vitesse telle que la température du mélange ne dépasse pas 40° C. On laisse reposer le mélange de réaction à 40° C pendant 4 heures, puis on élimine le solvant sous vide. L'huile résiduelle qui est jaune clair est mise en suspension dans de l'eau où elle forme une solution opalescente. On introduit du gaz carbonique dans la solution ainsi obtenue, et le composé recherché précipite sous forme de cristaux blancs.

Rendement: 12,0 g (73,5%). Pf.: 132-134° C.

Exemples 3-8

On a préparé d'une manière analogue à celle de l'exemple 2 les composés suivants:

3. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-éthylthio-urée
4. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-n-propylthio-urée
5. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-isopropylthio-urée
6. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-n-butylthio-urée
7. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-allylthio-urée
8. Carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexylthio-urée

Dans les exemples qui suivent, on décrit la préparation des produits finis de formule générale I.

Exemple 9

Iodure de N-amino-iminométhyl-S-méthylisothiuronium

On met en suspension 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée dans 50 ml d'éthanol anhydre. On ajoute 17,0 g (0,12 mole) d'iodure de méthyle à la suspension ainsi obtenue. Le mélange de réaction est progressivement chauffé jusqu'à l'ébullition, ce qui provoque un dégagement de gaz carbonique. Le mélange de réaction est maintenu à l'ébullition pendant 30 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever un éventuel précipité de cristaux. Le filtrat clair est évaporé sous vide et l'huile résiduelle est recristallisée dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux jaunes sont séparés par filtration et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 22,1 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 85%. Pf.: 124-125° C.

Exemple 10

Bromure de N-amino-iminométhyl-S-n-propylisothiuronium

On met en suspension dans 50 ml d'éthanol anhydre 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée. 14,8 g (0,12 mole) de bromure de n-propyle sont ajoutés à la suspension. Le mélange de réaction est chauffé lentement tout en agitant jusqu'à l'ébullition, ce qui provoque un dégagement de gaz carbonique. Le mélange de réaction est maintenu à l'ébullition pendant 45 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide et le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 19,5 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 81%. Pf.: 122-124° C.

Exemple 11

Bromure de M-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 50 ml d'éthanol anhydre. 14,5 g (0,12 mole) de bromure d'allyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue. Le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 30 minutes et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat est évaporé sous vide et le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 19,6 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 82%. Pf.: 123-125° C.

Exemple 12

Chlorure de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 50 ml d'éthanol anhydre. 9,18 g (0,12 mole) de chlorure d'allyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue et le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant une heure et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 15,7 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 81%. Pf.: 125-127° C.

Exemple 13

Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-2-éthyl)isothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 50 ml d'éthanol anhydre. 17,2 g (0,12 mole) de bromo-1-chloro-2-éthane sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue, et le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 90 minutes et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 17,2 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 66%. Pf.: 142-143° C.

Exemple 14

Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-1-hydroxy-2-propyl)isothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 50 ml d'éthanol anhydre. 20,8 g (0,12 mole) de bromo-1-hydroxy-2-chloro-3-propane sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue. Le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 90 minutes et refroidi à la température

ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux ayant une légère coloration crème sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 17,8 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 61%. Pf.: 118-119° C.

Exemple 15

Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(chloro-3-propyl)isothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 80 ml d'acétonitrile. 18,9 g (0,12 mole) de bromo-1-chloro-3-propane sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue et le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 90 minutes, les substances solides sont éliminées par filtration du mélange de réaction chaud et le filtrat est laissé à refroidir jusqu'à la température ambiante. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 17,3 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 65%. Pf.: 129-131° C.

Exemple 16

Chlorure de N-amino-iminométhyl-S-(hydroxy-2-éthyl)isothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 50 ml d'éthanol anhydre. 9,7 g (0,12 mole) de chlorhydrate d'éthylène sont ajoutés à la suspension et le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 90 minutes et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité, et le filtrat clair est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 13,5 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 68%. Pf.: 134-136° C.

Exemple 17

Bromure de N-amino-iminométhyl-S-glycidylisothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée à 80 ml d'acétonitrile. 16,5 g (0,12 mole) d'épibromhydrine sont ajoutés et le mélange de réaction est chauffé lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 2 heures et filtré pendant qu'il est chaud. Le filtrat clair est laissé à refroidir jusqu'à la température ambiante. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 13,5 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 53%. Pf.: 138-139° C.

Exemple 18

Chlorure de N-amino-iminométhyl-S-benzylisothiuronium

On ajoute 14,9 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée dans 50 ml d'éthanol anhydre. 15,2 g (0,12 mole) de chlorure de benzyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue et le mélange de réaction est chauffé jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant une heure et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide et le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. 19,1 g du composé recherché sont ainsi obtenus, ce qui correspond à un rendement de 78%. Pf.: 159-161° C.

Exemple 19

Les sels d'isothiuronium préparés selon les exemples 9-18 peuvent être recristallisés, le cas échéant, selon la méthode suivante. Le procédé est illustré avec le chlorure de N-amino-iminométhyl-S-allylisothiuronium.

On ajoute 10 g de mélange 5:1 d'éthanol et de méthanol. La petite quantité de cristaux non dissous est enlevée par filtration du mélange chaud. Le filtrat est clarifié avec du charbon actif lorsque cela est nécessaire. Le filtrat clair est laissé à refroidir à la température ambiante, ce qui fait précipiter des cristaux blancs. On refroidit le mélange à 0-5° C, on le laisse reposer à cette température pendant une heure, et on le filtre. Les cristaux sont lavés avec de l'éthanol refroidi à la température de la glace et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 8,1 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 81%.

Exemple 20

Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-méthyl-S-allylisothiuronium

On ajoute 16,3 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-méthylthio-urée préparé selon l'exemple 2 dans 50 ml d'éthanol anhydre. 9,18 g (0,12 mole) de chlorure d'allyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue, et le mélange de réaction est chauffé à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le milieu de réaction est chauffé au reflux pendant une heure et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 13,6 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 61%. Pf.: 137-139° C.

Exemple 21

Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-isopropyl-S-allylisothiuronium

On ajoute 19,1 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-isopropylthio-urée préparé selon l'exemple 5 dans 50 ml d'éthanol anhydre. 9,18 g (0,12 mole) de chlorure d'allyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue et le mélange de réaction est chauffé jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant une heure et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient éventuellement précipité. Le filtrat clair est évaporé sous vide et le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 13,3 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 56%. Pf.: 134-135° C.

Exemple 22

Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexyl-S-allylisothiuronium

23,1 g (0,05 mole) de carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexylthio-urée préparés selon l'exemple 8 sont ajoutés à 50 ml d'éthanol anhydre. 9,18 g (0,12 mole) de chlorure d'allyle sont ajoutés à la suspension ainsi obtenue et le mélange de réaction est chauffé jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant une heure et refroidi à la température ambiante. Le mélange est filtré pour enlever les substances qui auraient précipité et le filtrat clair est évaporé sous vide. Le résidu huileux est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle. Les cristaux blancs précipités sont filtrés et séchés à 40-50° C. On obtient ainsi 20,85 g du composé recherché, ce qui correspond à un rendement de 85%. Pf.: 129-130° C.

Exemples 23-31

On a préparé d'une manière analogue à celle de l'exemple 12 les composés d'isothiuronium de formule générale I suivants:

23. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-éthylisothiuronium, pf.: 123-124° C;
24. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-isopropylisothiuronium, pf.: 120-122° C;
25. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-n-butylisothiuronium, pf.: 116-118° C;
26. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-isoamylisothiuronium, pf.: 111-113° C;

27. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(bromo-2-éthyl)isothiuronium, pf.: 129-131° C;

28. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(bromo-3-propyl)isothiuronium, pf.: 127-129° C;

29. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(hydroxy-3-propyl)isothiuronium, pf.: 132-135° C;

30. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-(mercapto-3-propyl)isothiuronium, pf.: 141-142° C;

31. Bromure de N-amino-iminométhyl-S-propargylisothiuronium, pf.: 131-133° C.

Exemples 32-40

On a préparé d'une manière analogue à celle de l'exemple 20 les composés suivants:

32. Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-méthyl-S-(hydroxy-2-éthyl)isothiuronium, pf.: 147-148° C;

33. Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-éthyl-S-(chloro-2-éthyl)isothiuronium, pf.: 143-144° C;

34. Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-éthyl-S-allylisothiuronium, pf.: 138-139° C;

35. Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-isopropyl-S-(chloro-3-propyl)isothiuronium, pf.: 140-142° C;

36. Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-isopropyl-S-méthallylisothiuronium, pf.: 138-139° C;

37. Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexyl-S-propylisothiuronium, pf.: 133-135° C;

38. Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexyl-S-méthallylisothiuronium, pf.: 130-132° C;

39. Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexyl-S-glycidylisothiuronium, pf.: 143-145° C;

40. Chlorure de N-amino-iminométhyl-N'-cyclohexyl-S-benzylisothiuronium, pf.: 147-149° C.

Les points de fusion et les spectres IR des composés de formule générale I sont résumés dans le tableau VIII qui suit:

Tableau VIII

R ²	R ¹	X	Pf (° C)	Pics caractéristiques du spectre IR
H	méthyle	I	124-125	3300, 3120, 1685, 1570
H	n-propyle	Br	124-125	3300, 3120, 2925, 2850, 1685, 1570, 730
H	allyle	Br ou Cl	123-125	3290, 3260, 3160, 3105, 1640, 1605, 1550, 1375, 1090, 980, 910, 705, 650
H	chloro-2-éthyle	Br	142-143	3300, 3110, 2925, 1640, 920, 720
H	chloro-1-hydroxy-2-propyle	Br	118-119	3300, 3110, 3000, 2850, 1685, 1610, 720
H	chloro-3-propyle	Br	129-131	3300, 3275, 3165, 3105, 2900, 2825, 1680, 695
H	hydroxy-2-éthyle	Cl	134-136	3310, 3280, 3110, 3000, 2990, 1675, 1610
H	glycidyle	Br	138-139	3300, 3275, 3110, 3000, 1690, 1600, 865
H	benzyle	Cl	159-161	3290, 3280, 3115, 3005, 1680, 1590, 1485, 755
H	éthyle	Br	123-124	3300, 3120, 1685, 1570
H	isopropyle	Br	120-122	3300, 3120, 1680, 1380, 1365
H	n-butyle	Br	116-118	3315, 3300, 3210, 3180, 2850, 1690, 1450
H	isoamyle	Br	111-113	3305, 3300, 3205, 3175, 2960, 2845, 1695, 1470
H	bromo-2-éthyle	Br	129-131	3300, 3205, 2910, 1670, 1090, 715
H	bromo-3-propyle	Br	127-129	3305, 3215, 2920, 1665
H	hydroxy-3-propyle	Br	132-135	3590, 3300, 3220, 2925, 1680
H	mercapto-3-propyle	Br	141-142	3320, 3305, 3210, 3180, 2920, 2570, 1690
H	propargyle	Br	131-133	3310, 3300, 3200, 2180, 1680
méthyle	allyle	Cl	137-139	3305, 3290, 2960, 2690, 1640
méthyle	hydroxy-2-éthyle	Br	147-148	3585, 3300, 3285, 1680, 1375, 1360
éthyle	chloro-2-éthyle	Br	143-144	3305, 3285, 2965, 1660, 765
éthyle	allyle	Cl	138-139	3310, 3300, 3210, 3180, 1650, 990, 905
isopropyle	allyle	Cl	134-135	3305, 3295, 3200, 3170, 1655, 985, 895
isopropyle	méthallyle	Cl	138-139	3305, 3295, 3200, 3175, 1650, 890
isopropyle	chloro-3-propyle	Br	140-142	3320, 3300, 3195, 3160, 1690, 775
cyclohexyle	allyle	Cl	129-130	3315, 3305, 3200, 3170, 2830, 195, 985, 900
cyclohexyle	n-propyle	Br	133-135	3320, 3300, 3210, 3175, 2925
cyclohexyle	méthallyle	Cl	130-132	3315, 3300, 3215, 3180, 885
cyclohexyle	glycidyle	Br	143-145	3325, 3315, 3210, 3190, 1690, 870
cyclohexyle	benzyle	Cl	147-149	3300, 3275, 3120, 3000, 1675, 1590, 750

Exemple 41

Préparation de comprimés et de dragées

Des comprimés et des dragées sont préparés dans une presse munie d'une alimentation automatique. L'ingrédient actif est d'abord granulé avec des agents auxiliaires adéquats par un procédé à sec ou à l'état humide. Lorsque l'on prépare les granulés par voie humide, ceux-ci sont de préférence séchés sous vide. Les granulés

utilisés pour la préparation de comprimés ou de noyaux de dragées sont pressés à travers un tamis adéquat ne comportant pas de métal. Pour préparer les granulés, on utilise de préférence une composition pour granulés simples selon la Pharmacopée, ou toute autre composition adéquate. Les noyaux des dragées et les comprimés sont préparés de manière à contenir 30 mg d'ingrédient actif, et on leur adjoint 70 mg de véhicule (granulé simple).

*Exemple 42**Préparation de capsules*

On utilise de préférence des machines de remplissage automatiques. L'ingrédient actif est granulé avec des agents auxiliaires adéquats (granulé simple) ou tout autre additif inerte. Les granules sont préparés de manière à avoir une taille appropriée, tamisés et mis dans des capsules. Le contenu des capsules en ingrédient actif est de 30 mg.

*Exemple 43**Préparation d'ampoules de poudre*

On n'utilise pas d'agents auxiliaires séparés dans la préparation d'ampoules de poudre. Le contenu en ingrédient actif des ampoules de poudre est de 10 et 20 mg. Les ampoules de solvant contiennent respectivement 1 ou 2 ml d'eau distillée ou de solution physiologique salée. Il est préférable de diluer avec au moins 100 ml d'une solution pour perfusion et d'utiliser le contenu des ampoules immédiatement après la dissolution.

*Exemple 44**Bromure de N-amino-iminométhyl-S-méthallylthiuronium*

On met en suspension 14,9 g de carbonate de N-amino-iminométhylthio-urée dans 50 ml d'éthanol absolu. 16,1 g de bromure de

méthallyle sont ajoutés et le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 30 minutes. Après filtration, le solvant est éliminé par distillation sous vide. On obtient ainsi 21 g d'un produit ressemblant à du miel qui cristallise au repos.

*Exemple 45**Bromure de N-amino-iminométhyl-N'-allyl-S-allylthiuronium*

On met en suspension 17,6 g de carbonate de N-amino-iminométhyl-N'-allylthio-urée dans 50 ml d'éthanol anhydre. On ajoute 14,5 g de bromure d'allyle, et le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 1 heure sous forte agitation; le mélange est ensuite filtré, et le solvant est éliminé par distillation sous vide. On obtient ainsi 23 g d'un produit visqueux et huileux.

*Exemple 46**Chlorure de N-amino-iminométhyl-S-allylthiuronium*

On chauffe lentement jusqu'à l'ébullition, tout en agitant vigoureusement, un mélange de 4,2 g de dicyanodiamide, de 20 ml d'éthanol saturé d'acide chlorhydrique et de 3,7 g d'allylmercaptan. Le mélange de réaction est chauffé au reflux pendant 3 heures, puis refroidi à 0° C. Les cristaux précipités sont séparés par filtration et lavés avec de l'éthanol. On obtient ainsi 7 g du produit recherché. Pf.: 125-127° C.