

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

145 636

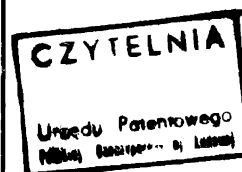
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 85 04 03 (P. 252744)

Pierwszeństwo 84 04 03 Węgry

Zgłoszenie ogłoszono: 86 08 12

Opis patentowy opublikowano: 89 06 30



Int. Cl.⁴ C07C 157/14

Twórca wynalazku _____

Uprawniony z patentu: Peremartoni Vegyipari Vállalat,
Peremartongyártelep (Węgry)

SPOSÓB WYTWARZANIA NOWYCH SOLI IZOTIOURONIOWYCH

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych soli izotiouroniowych. Związki te mają działanie przeciwnowotworowe i przeciwstymulacyjne i mogą być stosowane w terapii u ludzi i zwierząt.

Sposobem według wynalazku wytwarzane są nowe związki i sole o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 oznacza grupę C_{1-6} -alkilową, C_{2-6} -alkenylową, C_{2-6} -alkinylową, C_{3-6} -cykloalkilową, aralkilową lub aryłową, wymienione grupy mogą być dowolnie podstawione przez jedną lub więcej grupę hydroksylową, merkaptanową i/lub chlorowiec, albo grupą glicydylową, R^2 oznacza atom wodoru, grupę C_{1-6} -alkilową, C_{2-6} -alkenylową, C_{2-6} -alkinylową lub C_{3-6} -cykloalkilową, X oznacza atom chlorowca z zastrzeżeniem, że jeżeli R^2 oznacza atom wodoru, R^1 oznacza inną grupę niż metylowa, etylowa lub benzylowa.

Określenie "grupa C_{1-6} -alkilowa" oznacza prosty lub rozgałęziony łańcuch nasyconego alifatycznego węglowodoru np. grupę metylową, etylową, n-propylową, izopropylową, n-butyłową, izobutyłową itd. Określenie "grupa C_{2-6} -alkenylowa" oznacza prosty lub rozgałęziony łańcuch nienasyconych olefin np. grupę winylową, allylową, metyloallylową itd. Określenie "grupa C_{2-6} -alkinylowa" oznacza prosty lub rozgałęziony łańcuch alifatyczny zawierający co najmniej jedno potrójne wiązanie np. grupę propargilową itd. Określenie "grupa C_{3-6} -cykloalkilowa" oznacza cykliczny nasycony alifatyczny węglowodór np. grupę cyklobutyłową, cyklopentylową, cykloheksylową itd. Określenie "grupa aryłowa" oznacza mono- i policykliczny węglowodór np. grupę fenylową, naftylową itd. Określenie "grupa aralkilowa" oznacza grupę alkilową podstawioną przez co najmniej jedną grupę aryłową np. grupę benzylową, β -fenyloetylową itd. Określenie "chlorowiec" oznacza atomy fluoru, chloru, bromu i jodu.

Wymienione grupy alkilowa, alkenylowa, alkinylowa, cykloalkilowa, aryłowa i aralkilowa mogą zawierać dowolnie jeden lub więcej podstawników takich jak grupa hydroksylo-
wa, merkaptanowa i chlorowiec np. grupa 2-chloro-etyłowa, 3-bromo-propylowa, 2-hydroksy-
etyłowa, 3-chloro-2-hydroksy-propylowa itd.

Preferowaną grupą związków o ogólnym wzorze 1 są takie pochodne, w których R^1 jest grupą allilową. Dalszą preferowaną grupą związków o ogólnym wzorze 1 są te pochodne, w których R^1 jest grupą 2-chlorowcoetyłową. R^2 oznacza korzystnie atom wodoru, grupę metylową, etylową, n-propylową, izopropylową, n-butyłową, allilową lub cykloheksylową. X oznacza anion halogenkowy, szczególnie chlorek, bromek lub jodek.

Szczególnie preferowanymi przedstawicielami związków o ogólnym wzorze 1 są farmaceutycznie dopuszczalne sole następujących pochodnych: sole N-aminoiminometylo-S-metylo-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-propylo-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-/2-chloroetylo/-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-/1-chloro-2-hydroksy-propylo/-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-/3-chloro-propylo/-izotiouroniowe, N-aminiminometylo-S-/2-hydroksy-etylo/-izotiouroniowe, N-aminoiminometylo-S-glicydylo-izotiouroniowe. Dalszymi preferowanymi związkami o ogólnym wzorze 1 są sole N-aminoiminometylo-N'-alkilo-S-allilo-izotiouroniowe, szczególnie odpowiednie związki N'-metylo, N'-etylo, N'-n-propylo i N'-izopropylo.

Sposób według wynalazku wytwarzania związków o ogólnym wzorze 1 i ich soli polega na tym, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym R^2 oznacza grupy przedstawione powyżej lub jego sól węglanową poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze $R^1 - Y$, w którym R^1 oznacza grupy przedstawione powyżej, a Y oznacza atom chlorowca i ewentualnie tak otrzymany związek przeprowadza się w sól w reakcji z kwasem. W wymienionych reakcjach tworzą się sole izotiouroniowe. Reakcji towarzyszy na ogół powstanie N-alkilowanych produktów ubocznych.

Według preferowanej formy przeprowadzania procesu związki wyjściowe o ogólnym wzorze 2 nie są używane w postaci wolnych zasad lecz w postaci odpowiedniej soli - szczególnie węglanu. W ten sposób zmniejszone jest wytwarzanie N-alkilowanych pochodnych prawdopodobnie wskutek tego, że wydzielający się dwutlenek węgla obniża pH silnie zasadowego środowiska. Reagenty można stosować w ilościach równomolowych lub można dodać środek alkilujący w nadmiarze. Jako środowisko reakcji można stosować obojętne organiczne rozpuszczalniki, korzystnie alkohol, alifatyczny keton, alifatyczny nitril lub eter. Reakcję można przeprowadzać pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze 20 - 80°C. Według preferowanej postaci sposobu wyjściowy związek o ogólnym wzorze 2 i środek alkilujący poddaje się reakcji w stosunku molowym 1:1 - 1:1,8, w bezwodnym etanolu, acetonitrylu, dwumetyloformamidzie, acetonie lub eterze, w temperaturze 20 - 30°C. Związki wyjściowe o ogólnym wzorze 2 są znaczne lub mogą być wytworzone znanymi metodami. W ten sposób N-aminoiminometylotiomocznik można łatwo wytworzyć poddając dicyano-diamid reakcji z siarkowodorem (Houben-Weyl VIII., 214). Pochodne N-aminoiminometylo-N'-alkilo-tiomocznika o ogólnym wzorze 2 można wytworzyć poddając guanidynę (zasadę) reakcji z odpowiednim izotiocyanianem alkilowym (US patent No. 4,009, 163).

Otrzymany w ten sposób produkt przekształca się w farmaceutycznie dopuszczalną sól wytworzoną z organicznym lub nieorganicznym kwasem. Do wytworzenia soli korzystnie stosuje się następujące kwasy: mrówkowy, mlekowy, cytrynowy, maleinowy lub siarkowy, chlorowodorowy, fosforowy, bromowodorowy.

Związki o ogólnym wzorze 1 mają przeciwnowotworowe i przeciwpasożytnicze i immunostymulacyjne właściwości. Siła i kierunek działania oraz toksyczność zależy od podstawników w cząsteczce. Wiadomo, że gutimina, która jest pod względem budowy podobna do związków o ogólnym wzorze 1, była badana jako środek przeciwko niedotlenieniu (C.A. 66, 452,929 /1972/; Pathol. Phys. Exp. Ther. 10, /6/) w farmakologicznych i klinicznych testach jako substancja powodująca mikrokrażeńowe zaburzenia (Gemamol, Transfusiol. /1984/, 29 /1/, 49-52).

Stwierdzono, że związki o ogólnym wzorze 1 są zdolne do zwiększenia obniżonej naturalnej odporności organizmu do wartości prawidłowej lub podwyższenia odporności powyżej normalnego poziomu. Organizm ludzki i zwierzęcy posiada system immunologiczny np. system eliminujący nowotwory. Gdy aktywność wspomnianego systemu jest zmniejszona lub przestaje on działać, zjawiają się różne choroby i nowotwory. Związki o ogólnym wzorze 1 pobudzają naturalne systemy immunologiczne i są w ten sposób użyteczne we wszystkich przypadkach kiedy pożądane jest zwiększenie obniżonej aktywności systemu immunologicznego i dalsze podwyższenie jego normalnej aktywności.

Związki o ogólnym wzorze 1 wykazują dalsze użyteczne działania biologiczne, np. leczenie zaburzeń mikrokrażeńiowych, wiązanie rodników szkodliwych dla zdrowia, poprawa działania i wydłużenie czasu życia komórek będących w stanie deficytu tlenowego.

Czynność biologiczną związków o ogólnym wzorze 1 przedstawiają poniższe testy. Stwierdzono jednakże, że nie są pokazane wszystkie oddziaływania tych wysoko aktywnych związków.

Badanie specyficznych działań.

Testy immunologiczne. Limfocyty. Limfocyty wydzielano przy gradiencie Ficoll-Uromiro (on Ficoll-Uromiro gradient) (Böyum 1968) z krwi żyłnej zdrowych dawców i z krwi chorych na złośliwą białaczkę i na przerzutowe lite nowotwory. Przy selekcji pacjentów należących do ostatniej grupy brano pod uwagę zmniejszoną aktywność ADCC i NK. Fagocyty usuwano działając sproszkowanym żelazem i magnezem. ADCC. ADCC oznaczano metodą Perlmana i Perlmana (1970) z niewielkimi modyfikacjami (Láng i in., 1981). Erytrocyty kurczą oznaczone 10^5 ^{51}Cr i spłaszczono surowicą króliczą z przeciwnakurczającymi erytrocytami inkubowano z limfocytami w czasie 4 godzin w temperaturze 37°C . Reakcję stopowano i oznaczano w liczniku gamma radioaktywność supernatantu po odwirowanych komórkach. Stopień odłączenia chromu wyrażano jako wskaźnik cytotoksyczności (CI %). Wartość tę wyliczano w sposób opisany we wcześniejszych publikacjach (Láng i in., 1980) (Tablica 1). NK: Czynność NK oznaczano metodą Jondala i Prossa (1975) z zastosowaniem niewielkich modyfikacji (Láng i in., 1981).

Komórki nowotworu K-562 znaczone ^{51}Cr inkubowano z komórkami efektorowymi w środowisku ciekłej pożywki TC 199 zawierającej 10% surowicy cielęcej pozbawionej dopełniacza. Reakcję stopowano i mierzono w liczniku gamma radioaktywność supernatantu z uwolnionym chromem po odwirowaniu komórek. Zabicie komórek docelowych (indeks cytotoksyczności %) wyrażano jako różnicę odłączenia testowego i odłączenia spontanicznego.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy pomocy jednopróbkowego testu. Kilka związków o ogólnym wzorze 1 wykazuje znakomite działanie immunostymulacyjne np. związki wytworzone według przykładów XI, XII i XVI. Wymienione związki są zdolne znacząco zwiększyć normalną i silnie obniżoną czynność komórkową NK i K, nawet powyżej normalnego poziomu. Efekt ten może być tak silny, że cytotoksyczna czynność zmniejszona do jednej dziesiątej początkowej wartości może być przywrócona do poziomu początkowego (Tablica 2).

W zakresie dawki odpowiadającej oczekiwanemu stężeniu ludzkiej plazmy związki o ogólnym wzorze 1 zwiększają NK i K komórkową czynność limfocytów ludzkich i wzmacniają reakcję NCMC i ADCC, odpowiednio w stopniu zależnym od dawki. Według wstępnych wyników dalszych testów immunologicznych związki te zwiększają blastyczną transformację i migrację. Przeprowadzenie podstawienia przy atomach azotu powoduje zwykle zmniejszenie molowego proporcjonalnego immunostymulacyjnego efektu związanego z toksycznością.

Ponieważ cytotoksyczna czynność pacjentów z chorobą nowotworową jest zmniejszona proporcjonalnie do stadium choroby i ponadto jest dalej redukowana przez normalne leczenie cytostatyczne, jest sprawą bardzo ważną, że związki o ogólnym wzorze 1 posiadają silne działanie immunostymulacyjne i nie są immunodepresorami. Fakt ten może być bardzo znaczący z punktu widzenia rekonwalescencji.

Migracja leukocytów. Spontaniczną (przypadkową) migrację leukocytów mierzono na agarozowych mikrokroplach według metody McCoy i.in. (1977) z wprowadzonymi pewnymi niewielkimi modyfikacjami (Kalmár i Gergely, 1982).

2 ml krople agarozowe (0,2%) umieszczano na płytkach migracyjnych (Greiner, Republika Federalna Niemiec). Dodawano ciekłą pożywkę TC 199 i zamykano szczelnie płytki. Po 24 godzinach obszar migracji mierzono w stereomikroskopie. Pole migracji wyrażano w mm^2 .

Migracja leukocytów. Bezpośrednią (przypadkową) migrację polimfionuklearnych komórek zdrowych dawców zwiększono związkami wytworzonymi według przykładów XI, XII i XIV. Optymalna dawka wynosiła do 1,0 $\mu\text{g/ml}$. Przy wyższej dawce 10 $\mu\text{g/ml}$ efekt był mniej wyraźny (Tablica 3).

Transformacja blastyczna indukowana mitogenami. Limfocyty namnażano w środowisku ciekłej pożywki TC 199 uzupełnionej 10% surowicy cielęcej pozbawionej dopełniacza, antybiotykami i 25 mM HEPES (Serva). 200 μl zawiesiny komórek zawierającej 2×10^5 limfocytów umieszczano na mikropłytkę (producent: Sterilin Wielka Brytania); przygotowano pięć równoległych próbek.

Do kultur dodano 2 i 10 $\mu\text{g/ml}$ kolejno fitohemaglutyniny /leukoaglutyniny (producent Pharmacie Szwecja) i 25 $\mu\text{g/ml}$ Konkanawaliny A (Calbiochem); powyższe wartości odnoszą się do końcowego stężenia. Kultury kultywowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Osiem godzin przed zakończeniem okresu kultywacji dodano do próbek 0,5 uCi tymidyny- ^3H (Chemapol, Czechosłowacja). Inkorporację stopowano przez zamrożenie kultur. Po stopieniu kultury odsączano na automatycznym aparacie do sączenia (Dynatech). Radioaktywność próbek mierzono w liczniku scyntylacyjnym. Aktywność wyrażano w c.p.m. czyli ilości zliczeń na minutę (Tablice 4 i 5).

Analiza statystyczna. Istotność oznaczano przy pomocy jednopróbkowego testu 2T2. Wyniki otrzymane z produktem wytworzonym według przykładu XI są przedstawione w tablicach 1, 2 i 3. Wstępny szybki test oznaczania działania przeciwnowotworowego i immunostymulacyjnego. Metodę tę opracowano w naszych laboratoriach do szybkiego badania dużej liczby próbek. Myszy (samce CFLP, średni ciężar ciała 30 g) szczepiono czterema milionami komórek chłoniaka puchliny brzusznej.

W teście używano tych zwierząt, u których w czwartym dniu rozwinął się łatwo widoczny nowotwór czyli puchlina brzuszna. W każdej grupie użyto co najmniej dziesięć zwierząt i myszom podano doustnie jedną dziesiątą wielkości LD_{50} . W 24 godziny po podaniu doustnym oceniano wyniki przy pomocy rozmazu z puchliny brzusznej barwionego Gienzą na podstawie analizy cytologicznej. W grupie kontrolnej używano tej samej liczby zwierząt co w grupie leczonej.

Oceniano uszkodzenie komórek nowotworowych, pobudzenie organizmu i ewentualnie działanie toksyczne. Przy ocenie działania przeciwnowotworowych określano procentowy stosunek zabitych i nieuszkodzonych komórek nowotworowych. Wyniki podano według następującego układu:

Stopień zabicia komórek nowotworowych	Wynik
0-30%	bez wpływu
30-70%	średni wpływ
70-100%	silny wpływ

Wzrost aktywności układu odpornościowego organizmu oceniano na podstawie liczby i aktywności obojętnochłonnych granulocytów, limfocytów i makrofagów występujących wśród komórek nowotworowych pochłiny brzusznej i biorących udział w systemie immunologicznym. Aktywność układu odpornościowego manifestuje się również stopniem tworzenia przez powyższe komórki w puchlinie brzusznej wiązania plazmowo-mostkowego z komórkami nowotworowymi. Według tej oceny jeżeli nie ma różnicy w ilości i aktywności wspomnianych komórek, nie można stwierdzić żadnego wzrostu powyżej wartości kontrolnej. Średni efekt obserwuje się jeśli wzrost liczby komórek lub aktywności powyżej wartości kontrolnej wynosi do 20%. Efekt jest silny jeżeli wzrost liczby komórek i aktywności układu odpornościowego jest więcej niż 20% wyższy od wartości kontrolnej (Tablica 7).

Toksyczność oznaczano na podstawie oceny morfologicznych zmian obojętnochłonnych granulocytów i limfocytów, waskuolizacji plazmy, fragmentaryzacji jądra, tworzenia polisegmentów i granulacji toksycznej. Toksyczność wyrażano według następującej skali:

Wyniki obserwowane	Toksyczność
żadne powyższe zmiany we własnych komórkach	brak toksyczności
20% zmian	średnia toksyczność
zmiany powyżej 20%	wysoka toksyczność

Badanie działania przeciwnowotworowego

1. In vitro

Komórki ludzkiej erytroleukemii K-562 i kultury komórek chłoniaka myszy P-388 poddano działaniu 1-100 µg/ml badanego związku.

2. In vivo

a) Chłoniak NK-Sy-puchliny brzusznej

Jeden milion komórek chłoniaka Nemeth-Kellner puchliny brzusznej transplutowano i.p. dwudziestu samcom myszy CFLP (średni ciężar ciała 30 g); Neoplasma 8, 337 (1961). Połowa zwierząt była kontrolna a drugiej połowie podawano jedną dziesiątą wielkości LD₅₀ różnych związków o ogólnym wzorze 1 doustnie i śródtrzewnowo kolejno w pierwszym i piątym z rzędu dniu. Jeżeli jedna dziesiątą wielkości LD₅₀ była skuteczna, stosowano niższą dawkę. W grupie poddanej jednemu działaniu przeprowadzono cytomorfologiczne oznaczanie rozmazu z puchliny brzusznej po czasie 24 godzin i określano stopień uszkodzonych i zabitych komórek. W grupach poddanych działaniu w czasie 5 dni oznaczano stopień przeżycia.

b) Nowotwór L₁₂₁₀

10⁶ komórek nowotworowych L₁₂₁₀ transplutowano i.p. dwudziestu samcom myszy BDF₁ o ciężarze ciała 20 g. Leczenie rozpoczynano w 24 godziny po transplantacji nowotworu i kontynuowano przez osiem dni. Każda grupa składała się z 5 zwierząt; dzienna dawka wynosiła 5, 50 i 500 mg/kg p.o. Grupa kontrolna składała się również z 5 zwierząt. Obserwowano stopień przeżycia.

c) Nowotwór typu Lewis long

W każdej grupie używano 6 zwierząt. Dawka: 5 i 50 mg/kg. Grupa kontrolna składała się również z 6 zwierząt. W teście używano samic myszy C₅₇Bl o ciężarze 20 g. Nowotwór transplutowano s.c. do mięśnia prawej nogi. Po 10 dniach nogę amputowano, rozpoczynano leczenie drogą doustną i kontynuowano przez 9 dni. Zwierzęta zabijano i przerzuty zliczano pod stereomikroskopem.

d) Psom należącym do różnych ras i posiadającym spontaniczny nowotwór sutka (dottus cc.) podawano doustnie w czasie 4 tygodni testowane związki w dawkach 1-10 mg/kg. Przeprowadzano testowe wycięcie i zbierano próbki tkanek do analizy histologicznej.

Związki wytworzone według sposobu podanego w przykładach XI, XIII, XIV, XV, XXVII, XXVIII, XXXIV, XXXV, XXXVI i XXXVIII wykazują wybitne działanie przeciwnowotworowe. Związek wytworzony według sposobu opisanego w przykładzie XI zahamowuje komórki ludzkiej erytroleukemii K-562 w kulturze tkankowej w stężeniu 4 µg/ml. Z drugiej strony związek ten hamuje proliferencję komórek P-388 tylko w stężeniu 40 µg/ml i przy wzroście stężenia do 400 µg/ml aktywność jego nie zwiększa się. Związki posiadające wysoką aktywność wykazują działanie zależnie od dawki w zakresie stężeń 0,5 µg/ml, podczas gdy oddziaływanie związków o niskiej aktywności jest niezależne od dawki. Według testów in vivo związki tej grupy nie są w ogóle aktywne przeciwko L₁₂₁₀ lub tylko w niewielkim stopniu.

Związki znacząco zmniejszają liczbę przerzutów płucnych przy nowotworze typu Lewis long. Związki XI, XIII, XIV, XV, XXII, XXVII, XXVIII, XLV są skuteczne w dawce niższej niż jedna dziesiątą wielkości LD₅₀. Związek otrzymany według sposobu podanego w przykładzie XIV zmniejsza o 50% ilość przerzutów płucnych już w dawce 5 mg/kg. Wynik ten jest szczególnie znaczący wobec faktu, że LD₅₀ = 2380 mg/kg.

Stwierdzono, że efekt może być spotęgowany w większym stopniu przez powtórzenie leczenia niż przez zwiększenie dawki.

Związki wytworzone według sposobów podanych w przykładach XI, XIII, XIV, XX, XXII, XXVII i XLV okazały się aktywnymi przeciwko nowotworowi Nk-ly-puchliny brzusznej w stężeniu poniżej jednej dziesiątej wielkości LD_{50} . Te ostatnie związki podwyższają stopień przemycia i czas życia w sposób zależny od dawki. Związki te wykazują działanie immunostymulacyjne w małych dawkach, podczas gdy w wyższych dawkach bezpośrednie działanie przeciwnowotworowe ujawnia się samo również. W ten sposób związki z przykładu XI i XXII wykazują działanie immunostymulacyjne w dawkach wynoszących odpowiednio 25 mg/kg i 20 mg/kg. Związki z przykładu XI i XXII są cytotoksyczne w zakresie dawek wynoszących kolejno 250-500 mg/kg i 40-160 mg/kg. S-allilo-, S-1-chloro-2-hydroksy-propylo- lub S-1-bromo-hydroksy-propylo- podstawione związki o ogólnym wzorze 1 są wysoko aktywne w stosunku do spontanicznych nowotworów sutka u psów. W biopsji przeprowadzonej po leczeniu stosowanym w czasie 3 - 4 tygodni obserwowano komórkową infiltrację o charakterze inwazyjnym w nowotworach (ductus cc.) składającą się z limfocytów i obojętnochłonnych granulocytów, makrofagów i od czasu do czasu z kwasochłonnych granulocytów. Na komórkach nowotworowych zauważono zmiany degeneracyjne i znaczny rozkład.

Komórki NK tworzą plazmowe mostkowe wiązania z komórkami nowotworowymi co powoduje wodniczkową degenerację plazmy komórek nowotworowych i znaczne ściśnienie w miejscu DNS jądra. Ulega zmianie wzajemny stosunek jądro-plazma, jądro jest silnie nabrzmiałe i jest zmniejszona zasadochłonność plazmy. W około jednej czwartej przypadków infiltracji leukocytów w nowotworze jest nieznaczająca; z drugiej strony komórki nowotworowe są nabrzmiałe i szklisto zdegenerowane. W obszarze międzykomórkowym osadzona jest duża ilość szklisto zabarwionego materiału.

Przy podawaniu związku z przykładu XI w doustnej dziennej dawce wynoszącej 30-120mg (0,5-2 mg/kg) w czasie 6 - 12 miesięcy wyraźne polepszenie lub rekonwalescencję obserwowano u ludzi w przypadkach przerzutów do kości nowotworów sutka (in human bone metastasis of Mammal tumors), nowotworów jajników i nowotworów trzustki.

Badanie działania przeciwnowotworowego w połączeniach

1) Połączenie ze znanymi środkami cytostatycznymi. Różne środki cytostatyczne mające biologiczne alkilujące działanie podawano razem ze związkami o ogólnym wzorze 1 myszom CFLP z nowotworem NK-ly puchliny brzusznej. Środki cytostatyczne podawano doustnie, dootrzewnowo lub dożylnie w dawce odpowiadającej jednej piątej lub jednej dziesiątej wielkości LD_{50} lub w bardziej efektywnym dawkowaniu obejmującym wcześniejsze próby. Związki o ogólnym wzorze 1 podawano doustnie w dawce wynoszącej jedną dziesiątą lub jedną dwudziestą wartości LD_{50} jednorazowo lub kilka razy, w 48 godzin po leczeniu środkiem cytostatycznym. W ten sposób podawano kombinacje cyklofosfamid, karnomustliny, degranolu, dibromodulcitolu i dibromomannitolu z jednej strony i związki z przykładów XI, XIII, XIV, XV, XVI, XXVII, XXVIII i XLV z drugiej strony. W porównaniu z grupą kontrolną, której podawano jedynie znany środek cytostatyczny, obserwowano wzmocnione działanie przeciwnowotworowe i zmniejszoną immunodepresję.

2) Połączenie ze znanymi witaminami. Sole izotliouroniowe o ogólnym wzorze 1 mogą być skutecznie kombinowane ze średnimi dawkami witamin A i D_3 i z dużymi dawkami witaminy C. Otrzymano dobre wyniki zarówno w testach farmakologicznych jak i w przypadkach klinicznych u ludzi.

3) Połączenie ze znanymi hormonami. W oddziaływaniu na nowotwory zależne od hormonów połączenie okazało się być użyteczne zarówno w testach farmakologicznych jak i w przypadkach klinicznych u ludzi.

4) Użycie w chirurgii. Związki o ogólnym wzorze 1 stosowano pomyślnie w testach farmakologicznych w przypadku litych nowotworów dla oddziaływania przed i po zabiegu chirurgicznym (NK-ly-solid, Yosida). Na podstawie testów farmakologicznych można stwierdzić, że związki o ogólnym wzorze 1 są prawdopodobnie również odpowiednie do zastosowania w chirurgii u ludzi w oddziaływaniu przed- i pooperacyjnym.

Badanie działania przeciwpasożytniczego

Związki o ogólnym wzorze 1 podawano doustnie w ciągu trzech dni psom zakażonym kleszczami (*Ixodes ricinus*). Tak więc chlorowodorek N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowy podawano w doustnej dawce wynoszącej 1-2 mg/kg i rejestrowano tempo zabijania kleszczy. Sześć do ośmiu godzin po podaniu aktywnego związku o ogólnym wzorze 1 wszystkie kleszcze zostały w psach zabite.

Wiązanie wolnych rodników

Związki wytwarzane sposobem podanym w przykładach IX, X, XI, XVI, XXIII i XXIX znacząco obniżoną toksyczność (LD_{50}) nadtlenu wodoru, nadtlenu organicznych i biologicznych środków alkilujących (tworzących wolne rodniki). Na podstawie korzystnych danych ich toksyczności związki o ogólnym wzorze 1 są bardziej odpowiednie do wiązania wolnych rodników i ochrony przed promieniowaniem niż znane pochodne izotiouroniowe otrzymywane z odpowiedniego tiomocznika. Tak więc działanie terapeutyczne związku z przykładu XXIII jest lepsze niż działanie terapeutyczne chlorowodoru beta-aminoetyloizotiouroniowego.

Działanie ochraniające serce w narkozie izoprenalinowej

Szczurom samcom CFY o ciężarze 250-300 g podano i.p. 5 mg/kg izoproterenolu. W każdej grupie użyto 10 zwierząt. Jedna część zwierząt była kontrolna a drugiej podano związek No. XIV w ilości 1-5 mg/kg i.p. lub 10-50 mg/kg p.o. Po dwóch tygodniach serca poddano ocenie histologicznej. Określano stopień nekrotyzacji i nieczynny obszar mięśnia sercowego. Stwierdzono, że wszystkie podania chlorowodoru N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowego o ogólnym wzorze 1 powodowały znaczące zmniejszenia nekrozy.

W uszkodzonym obszarze testowany związek wywiera prawdopodobnie swój wpływ przez wiązanie nadtlenu wodoru wytwarzanego przez obojętne granulocyty. W tym modelu inne wiążące wolne rodniki i przeciwutleniające cząsteczki wywierają podobny skutek.

Działanie na krążenie i oddychanie

Związek wytworzony według sposobu podanego w przykładzie XI nie oddziałuje poważnie na hemodynamiczne parametry i funkcje oddechowe kotów z otwartą i zamkniętą klatką piersiową, po podaniu i.v. dawki wynoszącej 10 mg/kg. Badano następujące parametry: ciśnienie komorowe i obwodowe, częstotliwość pracy serca EKG, objętość/minutę, kurczliwość, objętość oddechowa, tempo oddechu i oporność. Przy dawce dożylnnej wynoszącej powyżej 10 mg/kg zmniejszało się ciśnienie lewokomorowe i częstotliwość. Przy dawce wynoszącej 50 mg/kg efekty powyższe były znaczące i dłużej trwające. Przy dawce i.v. wynoszącej 100 mg/kg obserwowano silne zmiany hemodynamiczne ale koty nie zginęły.

Działanie soli N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowych (halogenków) (Związek A).

T a b l i c a 1

Wpływ na ADDC. Wskaźnik cytotoxyczności (%)
Stosunek komórek efektorowych do komórek docelowych = 5:1
Czas inkubacji 4 godziny
średnie: $\pm$ S.E.

Grupa (liczba przypadków)	Kontrola	Leczenie /mole/ml/		
		Związek A /C. cząst. 194,7/		
		$6,7 \times 10^{-10}$ mola/ml	$6,7 \times 10^{-9}$ mola/ml	$6,7 \times 10^{-8}$ mola/ml
Normalny ADDC (10)	42,0 $\pm$ 5,0	58,5 $\pm$ 5,2 + 39%	64 $\pm$ 5,8 + 52%	68,2 $\pm$ 5,3 ^x + 62%
Obniżony ADDC (10)	2,8 $\pm$ 0,8	6,35 $\pm$ 1,7 + 126%	7,7 $\pm$ 1,9 + 175%	10,2 $\pm$ 2,7 ^x + 264%

x znaczący ($p < 0,05$)

T a b l i c a 2

Wpływ na aktywność NK

Stosunek komórek efektorowych do komórek docelowych = 50:1

Czas inkubacji 4 godziny

Wskaźnik cytotoksyczności (%), Wartości średnie: $\pm$ S.E.

Grupa (liczba przypadków)	Kontrola	Leczenie /mole/ml/		
		Związek A (C. cząst. 194,7)		
		$6,7 \times 10^{-10}$ mola	$6,7 \times 10^{-9}$ mola	$6,7 \times 10^{-8}$ mola
Normalny NK (8)	$32,9 \pm 2,5$	$41 \pm 2,9$ + 25%	$43,4 \pm 2,7$ + 32%	$47,6 \pm 1,4$ + 45%
Obniżony 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 znaczący ($p < 0,05$)

T a b l i c a 3

Wpływ in vitro na bezpośrednią (przypadkową) migrację polimorfonuklearnych leukocytów.
Obszar migracji (mm^2). Wartości średnie siedmiu zdrowych osób kontrolnych: $\pm$ S.E.M.

Traktowanie	Kontrola	Dawka / $\mu\text{g}/\text{ml}/$		
		0,1	1,0	10,0
Związek 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 nie znaczący

2 znaczący ($p < 0,01$)3 znaczący ($p < 0,05$)

T a b l i c a 4

Czynnik mitogeniczny	Kontrola	Dawka / $\mu\text{g}/\text{ml}/$		
		0,1	1,0	10,0
1. Związek A				
PHA 2 $\mu\text{g}/\text{m}$	21166 ± 3774	22253 ± 3688	23156 ± 2737	25404 ± 2860
PHA 10 $\mu\text{g}/\text{m}$	29959 ± 4051	29969 ± 3557	33826 ± 3638	33790 ± 5203
Con A 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10545 ± 3414	10564 ± 3764	14089 ± 2602	17038 ± 3202

T a b l i c a 5

Wpływ in vitro na blastyczną transformację ludzkich limfocytów stymulowaną przez PHA i Con A.

Pacjenci o obniżonej reaktywności (nowotwór i SLE; n=6)

Średnio c.p.m. $\pm$ S.E.M.

Czynnik mitogeniczny	Kontrola	Dawka $\mu\text{g/ml}$		
		0,1	1,0	10,0
1. Związek 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

T a b l i c a 6

Ostra toksyczność związków o ogólnym wzorze 1 w czasie 24 godzin

Przykład nr	R ²	R ¹	LD ₅₀ mg/kg	
			p.o.	i.p.
IX	H	metyl	2320 $\pm$ 220	
XXIII	H	etyl	3080 $\pm$ 290	
X	H	propyl	2800 $\pm$ 260	
XXV	H	butyl	2700 $\pm$ 310	
XXIV	H	1-propyl	2260 $\pm$ 210	
XXVI	H	1-amyl	2260 $\pm$ 241	
XIII	H	2-chloroetyl	1120 $\pm$ 140	
XXVII	H	2-bromo-etyl	1050 $\pm$ 280	
XIV	H	1-chloro-2-OH-propyl	1240 $\pm$ 160	
XV	H	3-chloro-propyl	1210 $\pm$ 180	
XXVIII	H	3-bromo-propyl	980 $\pm$ 640	
XVI	H	2-hydroksy-etyl	3280 $\pm$ 460	1680 $\pm$ 210
XXIX	H	1-oksypropyl	2860 $\pm$ 180	
XI	H	allil	2380 $\pm$ 320	320 $\pm$ 30
XLIV	H	metallil	1640 $\pm$ 210	
XVIII	H	benzyl	2420 $\pm$ 260	
XVII	H	propargil	90 $\pm$ 7,6	
XX	metyl	allil	600 $\pm$ 54	75 $\pm$ 6,3
XXXIV	etyl	allil	780 $\pm$ 62	84 $\pm$ 7,6
XXII	cykloheksyl	allil	450 $\pm$ 51	65 $\pm$ 5,1
XXI	izopropyl	allil	280 $\pm$ 26	32 $\pm$ 4
XLV	allil	allil	380 $\pm$ 41	36 $\pm$ 4
XXII	cykloheksyl	allil	400 $\pm$ 38	40 $\pm$ 6

T a b l i c a 7

Działanie przeciwnowotworowe i immunostymulacyjne związków o wzorze 1

Związek badany Przykład nr	Przeciwnowotworowe działanie	Immunostymulacyjne działanie	Toksyczne działanie
IX	średnie	średnie	średnie
XXIII	średnie	silne	0
X	średnie	średnie	0
XXV	średnie	średnie	0
XXIV	średnie	średnie	0
XXVI	średnie	średnie	0
XIII	silne	słabe	0
XXVII	silne	słabe	0
XIV	silne	słabe	0
XV	silne	słabe	0
XXVIII	silne	słabe	0
XVI	średnie	silne	0
XXIX	średnie	średnie	0
XI	silne	silne	0
XLIV	średnie	średnie	0
XVIII	wzrost	0	0
XVII	słabe	słabe	średnie
XX	silne	słabe	0
XXXIV	średnie	średnie	0
XXII	silne	słabe	0
XXI	silne	słabe	0
XLV	silne	słabe	0
XXII	słabe	słabe	0

Kompozycje farmaceutyczne zawierają jako aktywny składnik co najmniej jeden związek o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 oznacza grupę C_{1-6} alkilową, C_{2-6} alkanylową, C_{2-6} alkinylową, C_{3-6} cykloalkilową, aralkilową lub arylową, przy czym wymienione grupy ewentualnie są podstawione dowolnie przez jedną lub więcej grup hydroksylowych, merkaptanowych i/lub atom chlorowca, R^2 oznacza atom wodoru, grupę C_{1-6} alkilową, C_{2-6} alkenylową, C_{2-6} alkinylową lub C_{3-6} cykloalkilową, X oznacza atom chlorowca.

Kompozycje farmaceutyczne ewentualnie wytwarza się znanymi metodami przemysłu farmaceutycznego. Aktywne składniki o ogólnym wzorze 1 podaje się korzystnie w formie kapsułek zmieszane z konwencjonalnymi, stosowanymi zwykle środkami pomocniczymi np. środkami dającymi poślizg i innymi. Kapsułki wytwarza się przy pomocy automatycznych maszyn kapslujących. Kompozycje farmaceutyczne, ewentualnie przyrządza się również w postaci ampulek z proszkiem, pozajelitowych kompozycji do iniekcji i infuzji. Kompozycje te ewentualnie wytwarza się również znanymi metodami. Jako rozpuszczalnik ewentualnie stosuje się np. wodę destylowaną lub roztwór fizjologiczny soli.

Aktywne składniki o ogólnym wzorze 1 można również podawać w postaci maści, szczególnie maści lipofilowych. Aktywne składniki o ogólnym wzorze 1 posiadające silny zapach, ewentualnie poddawane są mikrootorbieniu np. przez wytworzenie cyklodekstrynowych kompleksów inkluzyjnych.

Kompozycje farmaceutyczne mogą również zawierać jako dodatek do związku o ogólnym wzorze 1 jedną lub więcej znanych biologicznie czynnych substancji jako składnik aktywny.

Kompozycje farmaceutyczne można stosować w terapii zarówno u ludzi jak i u zwierząt. W przypadku stosowania jako środka immunostymulacyjnego preferowana dawka doustna lub doodbytnicza wynosi około 0,5 - 25 mg/kg. Do działań miejscowych preferuje się stosowanie wyższych dawek.

Wytwarzane sposobem według wynalazku nowe związki posiadają działanie przeciwnowotworowe i immunostymulacyjne.

Szczegóły sposobu według wynalazku wyjaśniają poniższe przykłady bez ograniczenia zakresu wynalazku do tych przykładów.

Materiały wyjściowe

P r z y k ł a d I. Wytwarzanie węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika

84,0 g (1,0 mola) dicyano-diamidu i 300 ml wody umieszcza się w autoklawie. Do zamkniętego autoklawu wprowadza się 34,0 g (1 mol) gazowego siarkowodoru w następujący sposób: w temperaturze 20°C wprowadza się tyle siarkowodoru aby ciśnienie w autoklawie osiągnęło $1,5 \times 10^5$ Pa. Wstrzymuje się dopływ gazu i ogrzewa powoli autoklaw w temperaturze 80°C. W międzyczasie wprowadza się gazowy siarkowódór w takim tempie aby ciśnienie w autoklawie wynosiło stale $1,5 \times 10^5$ Pa. Po wprowadzeniu całej ilości gazowego siarkowodoru autoklaw utrzymuje się w temperaturze 80°C aż do obniżenia ciśnienia do $0,3 \times 10^5 - 0,4 \times 10^5$ Pa. Mieszaninę reakcyjną oziębia się do temperatury 20°C, przepłukuje strumieniem azotu i odsącza. Klarowny przesącz oziębia się do temperatury 0°C i wprowadza gazowy ditlenek węgla. Wytrącony biały krystaliczny węglan N-aminoiminometylo-tiomocznika odsącza się, przemywa zimną wodą i suszy w temperaturze 60 - 80°C. Otrzymuje się w ten sposób 100 gżądanego związku; wydajność wynosi 67%; temperatura topnienia: 127 - 129°C. Widmo w podczerwieni otrzymanego w ten sposób produktu jest porównywalne z widmem próbki wzorcowej.

P r z y k ł a d II. Wytwarzanie węglanu N-aminoiminometylo-N'-metylo-tiomocznika

Do roztworu 5,9 g (0,1 mola) zasady guanidynowej w 30 ml acetonu dodaje się roztwór 7,3 g (0,1 mola) izotiocyanianu metylu w 10 ml acetonu. Roztwór izotiocyanianu dodaje się do roztworu guanidyny z taką szybkością aby temperatura mieszaniny nie przekroczyła 40°C. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się w temperaturze 40°C w czasie 4 godzin, a następnie usuwa rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały jasno żółty olej zawiesza się w wodzie do otrzymania opalizującego roztworu. Do roztworu wprowadza się gazowy ditlenek węgla, żądany związek wytrąca się w postaci białych kryształów, o temperaturze topnienia 132 - 134°C. Wydajność wynosi 12,0 g (73,5%).

P r z y k ł a d y III-VIII. W sposób analogiczny jak w przykładzie II wytwarza się następujące związki:

III. Węglan N-aminoiminometylo-N'-etylo-tiomocznika

IV. Węglan N-aminoiminometylo-N'-n-propylo-tiomocznika

V. Węglan N-aminoiminometylo-N'-izopropylo-tiomocznika

VI. Węglan N-aminoiminometylo-N'-n-butylo-tiomocznika

VII. Węglan N-aminoiminometylo-N'-allilo-tiomocznika

VIII. Węglan N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-tiomocznika

W poniższych przykładach podano sposób wytwarzania produktów końcowych o ogólnym wzorze 1.

P r z y k ł a d IX. Wytwarzanie jodku N-aminoiminometylo-S-metyloizotiourowniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika zawiesza się w 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 17,0 g (0,12 mola) jodku metylu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się powoli do wrzenia, wydzieia się przy tym ditlenek węgla. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia w czasie 30 minut i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia ewentualnego krystalicznego osadu. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostały olej krystalizuje z octanu etylu. Żółte kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzy-

muje się w ten sposób 22,1 g żądanego produktu o temperaturze topnienia 124 - 125°C; wydajność wynosi 85%.

P r z y k ł a d X. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-n-propylo-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika zawiesza się w 50 ml bezwodnego etanolu. Do zawiesiny dodaje się 14,8 g (0,12 mola) bromku n-propyłu. Mieszaninę ogrzewa się powoli z mieszaniem do wrzenia, wydziela się przy tym ditlenek węgla. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia przez 45 minut i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconych ewentualnie substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Odsącza się białe kryształy i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 19,5 g żądanego produktu o temperaturze topnienia 122 - 124°C; wydajność wynosi 81%.

P r z y k ł a d XI. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 14,5 g (0,12 mola) bromku allilu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się powoli do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną w czasie 30 minut i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconych ewentualnie substancji. Przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Wytrącone kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. W ten sposób otrzymuje się 19,6 g żądanego związku o temperaturze topnienia 123 - 125°C; wydajność wynosi 82%.

P r z y k ł a d XII. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-S-alliloizotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 9,18 g (0,12 mola) chlorku allilu i mieszaninę reakcyjną ogrzewa się powoli do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną w czasie 1 godziny i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji. Przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Wytrącone kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. W ten sposób otrzymuje się 15,7 g żądanego związku o temperaturze topnienia 125 - 127°C; wydajność wynosi 81%.

P r z y k ł a d XIII. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-/2-chloroetylo/-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 17,2 g (0,12 mola) 1-bromo-2-chloro-etanu i mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną w czasie 90 minut i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Wytrącone białe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 17,2 g żądanego związku o temperaturze topnienia 142 - 143°C; wydajność wynosi 66%.

P r z y k ł a d XIV. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-/1-chloro-2-hydroksy-propylo/-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 20,8 g (0,12 mola) 1-bromo-2-hydroksy-3-chloro-propanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się powoli do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez 90

minut i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia ewentualnie wytrąconej substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Wytrącone lekko kremowe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 17,8 g żądanego związku o temperaturze topnienia 118 - 119°C; wydajność wynosi 61%.

P r z y k ł a d XV. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-/3-chloro-propylo/-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 80 ml acetonitrylu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 18,9 g (0,12 mola) 1-bromo-3-chloro-propanu i ogrzewa mieszaninę reakcyjną powoli do wrzenia przy intensywnym mieszaniu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez 90 minut, stałą substancję usuwa się przez przesączenie gorącej mieszaniny reakcyjnej i pozostawia przesącz do ochłodzenia do temperatury pokojowej. Wytrącone białe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 17,3 g żądanego związku o temperaturze topnienia 129 - 131°C; wydajność wynosi 65%.

P r z y k ł a d XVI. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-S-/2-hydroksyetylo/-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 9,7 g (0,12 mola) etylenochlorohydryny i ogrzewa mieszaninę reakcyjną do wrzenia przy intensywnym mieszaniu. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez 90 minut i następnie oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji i odparowuje klarowny przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 13,5 g żądanego związku o temperaturze topnienia 134 - 136°C; wydajność wynosi 68%.

P r z y k ł a d XVII. Wytwarzanie bromku N-aminoiminometylo-S-glicydylo-izotiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 80 ml acetonitrylu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 16,5 g (0,12 mola) epibromohydryny i mieszaninę reakcyjną ogrzewa powoli do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą przez 2 godziny i przesącza na gorąco. Klarowny przesącz pozostawia się do oziębienia do temperatury pokojowej. Wytrącone białe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 13,5 g żądanego związku o temperaturze topnienia 138 - 139°C; wydajność wynosi 53%.

P r z y k ł a d XVIII. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-S-benzylu-tiouroniowego

14,9 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-tiomocznika dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 15,2 g (0,12 mola) chlorku benzylu i mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną w ciągu 1 godziny i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość krystalizuje z octanu etylu. Wytrącone białe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. W ten sposób otrzymuje się 19,1 g żądanego związku o temperaturze topnienia 159 - 161°C; wydajność wynosi 78%.

P r z y k ł a d XIX. Sole izotiouroniowe wytworzone według sposobów podanych w przykładach IX - XVIII ewentualnie przekrystalizowuje się w opisany poniżej sposób. Sposób przedstawiono na przykładzie chlorku N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowego.

10 g chlorku N-aminoiminometylo-S-allilo-izotiouroniowego dodaje się do 60 ml mieszaniny etanolu i metanolu w stosunku 5:1. Niewielką ilość nierozpuszczonych kryształów usuwa się przez przesączenie gorącej mieszaniny. Przesącz ewentualnie klaruje się

węglanem aktywowanym. Klarowny przesącz pozostawia się do ochłodzenia do temperatury pokojowej, w tym czasie wytrąca się biały krystaliczny osad. Mieszaninę oziębia się do temperatury 0 - 5°C, pozostawia się w tej temperaturze przez jedną godzinę a następnie przesącza. Osad przemywa się lodowato zimnym etanolem i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 8,1 g żadanego związku; wydajność wynosi 81%.

P r z y k ł a d XX. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-N'-metylo-S-allilo-izotiouroniowego

16,3 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-N'-metylotiomocznika wytworzonego według sposobu podanego w przykładzie II dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 9,18 g (0,12 mola) chlorku allilu i ogrzewa do wrzenia z intensywnym mieszaniem. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę i oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Biały krystaliczny osad odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 13,6 g żadanego związku o temperaturze topnienia 137 - 139°C; wydajność wynosi 61%.

P r z y k ł a d XXI. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-N'-izopropilo-S-allilo-izotiouroniowego

19,1 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-N'-izopropilo-tiomocznika wytworzonego według sposobu podanego w przykładzie V dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu.

Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 9,18 g (0,12 mola) chlorku allilu i mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia przy intensywnym mieszaniu i utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez godzinę, oziębia do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji. Klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i oleistą pozostałość krystalizuje z octanu etylu. Wytrącony biały krystaliczny osad odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 13,3 g żadanego związku o temperaturze topnienia 134 - 135°C; wydajność wynosi 56%.

P r z y k ł a d XXII. Wytwarzanie chlorku N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-allilo-izotiouroniowego

23,1 g (0,05 mola) węglanu N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-tiomocznika wytworzonego według sposobu opisanego w przykładzie VIII dodaje się do 50 ml bezwodnego etanolu. Do otrzymanej zawiesiny dodaje się 9,18 g (0,12 mola) chlorku allilu i mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia z intensywnym mieszaniem i utrzymuje się we wrzeniu pod chłodnicą zwrotną przez godzinę, ochładza do temperatury pokojowej. Mieszaninę przesącza się celem usunięcia wytrąconej ewentualnie substancji i klarowny przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość krystalizuje się z octanu etylu. Wytrącone białe kryształy odsącza się i suszy w temperaturze 40 - 50°C. Otrzymuje się w ten sposób 20,85 g żadanego związku o temperaturze topnienia 129 - 130°C; wydajność wynosi 85%.

P r z y k ł a d y XXIII - XXXI. W sposób analogiczny do podanego w przykładzie XII wytwarza się następujące związki izotiouroniowe o ogólnym wzorze 1:

XXIII. Bromek N-aminoiminometylo-S-etylo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 123 - 124°C.

XXIV. Bromek N-aminoiminometylo-S-izopropilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 120 - 122°C.

XXV. Bromek N-aminoiminometylo-S-n-butylo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 116 - 118°C.

XXVI. Bromek N-aminoiminometylo-S-izoamilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 111 - 113°C.

XXVII. Bromek N-aminoiminometylo-S-/2-bromo-etylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 129 - 131°C.

XXVIII. Bromek N-aminoiminometylo-S-/3-bromo-propylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia 127 - 129°C.

XXIX. Bromek N-aminoiminometylo-S-/3-hydroksy-propylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 132 - 135°C.

XXX. Bromek N-aminoiminometylo-S-/3-merkpto-propylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 141 - 142°C.

XXXI. Bromek N-aminoiminometylo-S-propargilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 131 - 133°C.

P r z y k ł a d y XXXII - XL. W sposób analogiczny do podanego w przykładzie XX wytwarza się następujące związki:

XXXII. Bromek N-aminoiminometylo-N'-metylo-S-/2-hydroksy-etylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 147 - 148°C.

XXXIII. Bromek N-aminoiminometylo-N'-etylo-S-/2-chloroetylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 143 - 144°C.

XXXIV. Chlorek N-aminoiminometylo-N'-etylo-S-allilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 138 - 139°C.

XXXV. Bromek N-aminoiminometylo-N'-izopropylo-S-/3-chloropropylo/-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 140 - 142°C.

XXXVI. Chlorek N-aminoiminometylo-N'-izopropylo-S-metallilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 138 - 139°C.

XXXVII. Bromek N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-S-n-propylo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 133 - 135°C.

XXXVIII. Chlorek N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-S-metallilo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 130 - 132°C.

XXXIX. Bromek N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-S-glicydylo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 143 - 145°C.

XL. Chlorek N-aminoiminometylo-N'-cykloheksylo-S-benzylo-izotiouroniowy, temperatura topnienia: 147 - 149°C.

Temperatury topnienia i widma w podczerwieni związków o ogólnym wzorze 1 podano zbiorczo w Tablicy 8.

T a b l i c a 8

R ²	R ¹	X	Op(°C)	Charakterystyczne piki widma IR
1	2	3	4	5
H	metyl	J	124 - 125	3300, 3120, 1685, 1570
H	n-propyl	Br	122 - 124	3300, 3120, 2925, 2850, 1685, 1570, 730
H	allil	Br lub Cl	123 - 125	3290, 3260, 3160, 3105, 1640, 1605, 1550, 1375, 1090, 980, 910, 705, 650
H	2-chloroetyl	Br	142 - 143	3300, 3110, 2925, 1640, 920, 720,
H	1-chloro-2-hydroksypropyl	Br	118 - 119	3300, 3110, 3000, 2850, 1685, 1610, 720
H	3-chloro-propyl	Br	129 - 131	3300, 3275, 3165, 3105, 2900, 2825, 1680, 695
H	2-hydroksy-etyl	Cl	134 - 136	3310, 3280, 3110, 3000, 2990, 1675, 1610

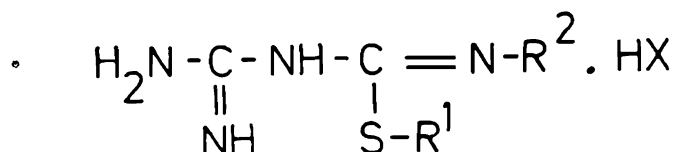
cd. Tablicy 8

1	2	3	4	5
H	glicydyl	Br	138 - 139	3300, 3275, 3110, 3000, 1690, 1600, 865
H	benzyl	Cl	159 - 161	3290, 3280, 3115, 3005, 1680, 1590, 1485, 755
H	etyl	Br	123 - 124	3300, 3120, 1685, 1570
H	izopropyl	Br	120 - 122	3300, 3120, 1680, 1380, 1365
H	n-butyl	Br	116 - 118	3315, 3300, 3210, 3180, 2850, 1690, 1450
H	izoamyl	Br	111 - 113	3305, 3300, 3205, 3175, 2960, 2845, 1695, 1470
H	2-bromo-etyl	Br	129 - 131	3300, 3205, 2910, 1670, 1090, 715
H	3-bromo-propyl	Br	127 - 129	3305, 3215, 2920, 1665
H	3-hydroksy-propyl	Br	132 - 135	3590, 3300, 3220, 2925, 1680
H	3-merkapt-propyl	Br	141 - 142	3320, 3305, 3210, 3180, 2920, 2570, 1690
H	propargil	Br	131 - 133	3310, 3300, 3200, 2180, 1680
metyl	allil	Cl	137 - 139	3305, 3290, 2960, 2690, 1640
metyl	2-hydroksy-etyl	Br	147 - 148	3585, 3300, 3285, 1680, 1375, 1360
etyl	2-chloro-etyl	Br	143 - 144	3305, 3285, 2965, 1660, 765
etyl	allil	Cl	138 - 139	3310, 3300, 3210, 3180, 1650, 990, 905
izo-propyl	allil	Cl	134 - 135	3305, 3295, 3200, 3170, 1655, 985, 895
izo-propyl	metallil	Cl	138 - 139	3305, 3295, 3200, 3175, 1650, 890
izo-propyl	3-chloro-propyl	Br	140 - 142	3320, 3300, 3195, 3160, 1690, 775
cyklo-heksyl	allil	Cl	129 - 130	3315, 3305, 3200, 3170, 2830, 1695, 985, 900
cyklo-heksyl	n-propyl	Br	133 - 135	3320, 3300, 3210, 3175, 2925
cyklo-heksyl	metallil	Cl	130 - 132	3315, 3300, 3215, 3180, 885
cyklo-heksyl	glicydyl	Br	143 - 145	3325, 3315, 3210, 3190, 1690, 870
cyklo-heksyl	benzyl	Cl	147 - 149	3300, 3275, 3120, 3000, 1675, 1590, 750

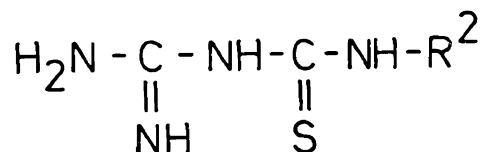
Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania nowych soli izotiouroniowych o ogólnym wzorze 1, w którym R^1 oznacza grupę C_{1-6} -alkilową, C_{2-6} -alkenylową, C_{2-6} -alkinylową, C_{3-6} -cykloalkilową, aralkilową lub aryłową, wymienione grupy ewentualnie podstawione są jedną lub więcej grupą hydroksylową, grupą merkaptanową i/lub atomem chlorowca albo grupą glicydylową, R^2 oznacza atom wodoru, grupę C_{1-6} -alkilową, C_{2-6} -alkenylową, C_{2-6} -alkinylową lub C_{3-6} -cykloalkilową; X oznacza atom chlorowca z zastrzeżeniem, że jeśli R^2 oznacza atom wodoru R^1 jest różne od grupy metylowej, etylowej albo benzylowej, z n a m i e n n y t y m, że związek o ogólnym wzorze 2, w którym R^2 ma znaczenie podane powyżej, lub jego sól węglanową poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze $R^1 - Y$, w którym R^1 ma znaczenie podane powyżej, a Y oznacza atom chlorowca i ewentualnie tak otrzymany związek przeprowadza się w sól w reakcji z kwasem.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że przeprowadza się w reakcję w obecności organicznego rozpuszczalnika, korzystnie alkoholu, alifatycznego ketonu, nitrylu i/lub eteru.



WZÓR 1



WZÓR 2