



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8520077**

- ⑤4 **Isothiuroniumzouten.**
- ⑤1 Int.Cl⁴.: C07C 157/14, A61K 31/155, A61K 31/335, C07D 303/34.
- ⑦1 Aanvrager: Peremartoni Vegyipari Vallalat te Peremartongyartelep, Hongarije.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

- ②1 Aanvraag Nr. 8520077.
- ⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/ HU85/00022
- ②2 Ingediend 2 april 1985.
- ③2 Voorrang vanaf 3 april 1984, 19 maart 1985.
- ③3 Land van voorrang: Hongarije (HU).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 132484 , 132484 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 3 februari 1986.
- ⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvraag 10 oktober 1985.
- ⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvraag. WO 85/04399.

Deze octrooiaanvraag werd ingediend als internationale octrooiaanvraag onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvraag wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvraag.

Isothiuroniumzouten

De uitvinding heeft betrekking op isothiuroniumzouten, een werkwijze voor het bereiden daarvan, alsmede op farmaceutische preparaten, die deze zouten bevatten. Het merendeel van de onderhavige isothiuroniumzouten is nieuw. Zij bezitten bruikbare
 5 anti-tumor- en anti-stimulerende werking en kunnen worden toegepast voor humane en veterinaire therapie.

Verbindingen met de formule 1 op het formuleblad, waarin R methyl, ethyl of benzyl en R' waterstof voorstellen, zijn bekend uit het Franse octrooischrift 788.429 en het Duitse
 10 "Offenlegungsschrift" 2.426.683. Daarin zijn zij echter alleen als tussenprodukten beschreven en wordt over enige biologische activiteit of therapeutische toepassing niets vermeld.

De uitvinding verschaft nieuwe verbindingen en zouten met de formule 1 op het formuleblad, waarin
 15 R_1 C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-6} cycloalkyl, aralkyl of aryl, welke groepen eventueel door een of meer hydroxygroepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen zijn gesubstitueerd, voorstelt,
 R_2 waterstof, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl
 20 of C_{3-6} cycloalkyl voorstelt, en X een organisch of anorganisch anion voorstelt,
 met dien verstande, dat wanneer R_2 waterstof voorstelt R_1 geen methyl, ethyl of benzyl voorstelt.

C_{1-6} alkyl omvat al dan niet vertakte, verzadigde,
 25 alifatische koolwaterstofgroepen, bijvoorbeeld methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl etc.. C_{2-6} alkenyl omvat al dan niet vertakte, alkenisch onverzadigde groepen, bijvoorbeeld vinyl, allyl, methallyl, etc.. C_{2-6} alkynyl omvat al dan niet vertakte, alifatische groepen met ten minste een drievoudige binding,
 30 bijvoorbeeld propargyl etc.. C_{3-6} cycloalkyl omvat cyclische, verzadigde, alifatische koolwaterstofgroepen, bijvoorbeeld cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl etc.. Aryl omvat mono- en polycyclische,

aromatische koolwaterstofgroepen, bijvoorbeeld fenyl, nafthyl etc.. Aralkyl omvat alkylgroepen gesubstitueerd door ten minste een aryl-groep, bijvoorbeeld benzyl, β -fenylethyl etc.. Halogeen omvat fluor-, chloor-, broom- en joodatomen.

5 De alkyl-, alkenyl-, alkynyl-, cycloalkyl-, aryl- en aralkylgroepen kunnen eventueel door een of meer hydroxy-groepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen gesubstitueerd zijn. Voorbeelden van gesubstitueerde groepen zijn 2-chloorethyl, 3-broompropyl, 2-hydroxyethyl, 3-chloor-2-hydroxypropyl etc..

10 Een voorkeursgroep verbindingen volgens de uitvinding zijn die met de formule 1, waarin R_1 allyl voorstelt.

Een andere voorkeursgroep volgens de uitvinding zijn verbindingen met de formule 1, waarin R_1 2-halogeenethyl voorstelt.

15 R_2 stelt bij voorkeur waterstof, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, allyl of cyclohexyl voor.

X stelt bij voorkeur een halogenideanion, in het bijzonder een chloride-, bromide- of jodideanion voor.

Verbindingen met de formule 1 met bijzondere
20 voorkeur zijn de volgende farmaceutisch aanvaardbare zouten:
N-aminoiminomethyl-S-methyl-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-propyl-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-allyl-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-(2-chloorethyl)-isothiuroniumzouten;
25 N-aminoiminomethyl-S-(1-chloor-2-hydroxypropyl)-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-(3-chloorpropyl)-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-(2-hydroxyethyl)-isothiuroniumzouten;
N-aminoiminomethyl-S-glycidyl-isothiuroniumzouten.

Andere voorkeursverbindingen met de formule 1
30 zijn de N-aminoiminomethyl-N'-alkyl-S-allyl-isothiuroniumzouten, in het bijzonder de N'-methyl-, N'-ethyl-, N'-n-propyl- en N'-iso-propylverbindingen.

De uitvinding heeft verder betrekking op een

8520077

werkwijze voor het bereiden van de verbindingen met de formule 1 en zouten daarvan, door

a) reactie van een verbinding met de formule 2, waar R_2 de bovenaangegeven betekenis heeft, of een geschikt zout
5 daarvan, met een alkyleringsmiddel, waarmee de R_1 -groep kan worden ingevoerd, bij voorkeur een alkyleringsmiddel met de formule R_1-Y , waarin R_1 de bovenaangegeven betekenis heeft en Y een afsplitsbare groep, bij voorkeur een halogeenatoom voorstelt, of

b) reactie van een verbinding met de formule 3,
10 met een verbinding met de formule R_1-SH , waarin R_1 de bovenaangegeven betekenis heeft, en
desgewenst omzetting van de verkregen verbinding in een zout door reactie met een zuur HX, waarin X een anion van een anorganisch of organisch zuur voorstelt.

15 Behalve isothiuroniumzouten worden bij deze reacties doorgaans ook N-gealkyleerde bijprodukten gevormd.

Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding a) worden de uitgangsverbindingen met de formule 2 niet als vrije base gebruikt, maar in de vorm van
20 een geschikt zout, in het bijzonder een carbonaat. Daarmee wordt aan de vorming van N-gealkyleerde bijprodukten een halt toegeroepen, waarschijnlijk omdat ten gevolge van kooldioxydeontwikkeling de pH van het sterk basisch reaktiemengsel daalt.

Als alkyleringsmiddel wordt bij voorkeur een
25 passend alkylhalogenide of dialkylsulfaat gebruikt, maar andere alkyleringsmiddelen komen ook in aanmerking.

De reaktanten kunnen in equimoleculaire hoeveelheden worden gebruikt, maar het alkyleringsmiddel kan ook in overmaat aanwezig zijn. Het reaktiedium is een inert, organisch oplos-
30 middel, bij voorkeur een alcohol, alifatisch keton, alifatisch nitril of ether.

De reactie kan onder atmosferische druk en bij een temperatuur van 20-80° C worden uitgevoerd.

8520077

Volgens een uitvoeringsvorm van de werkwijze a), die meer de voorkeur heeft, worden de uitgangsverbindingen met de formule 2 en het alkyleringsmiddel in een molverhouding van 1:1 tot 1:1,8, in absolute ethanol, acetonitril, dimethylformamide, 5 aceton of ether, en bij een temperatuur van 20-30° C met elkaar tot reactie gebracht.

Bij de werkwijze b) ontstaan verbindingen met de formule 4, die een kleinere subgroep van de verbindingen met de formule 1, waarin R_2 waterstof voorstelt, vormen. Deze kunnen worden 10 bereid door reactie van een verbinding met de formule 3 met een thioalkohol R_1 -SH. De reaktanten kunnen in equimoleculaire hoeveelheid worden gebruikt, maar de thioalkohol R_1 -SH kan ook in overmaat aanwezig zijn. Als reaktiemedium wordt bij voorkeur een 15 alcohol en in het bijzonder ethanol, gebruikt. De reactie kan, indien nodig, onder druk worden uitgevoerd, maar wordt bij voorkeur uitgevoerd onder een druk van 100-500 kPa en bij een temperatuur van 20-100° C.

De uitgangsverbindingen met de formule 2 zijn bekend of kunnen volgens bekende methoden worden bereid. Zo kunnen 20 N-aminoiminomethylthioureumverbindingen gemakkelijk worden bereid door reactie van dicyaandiamide met waterstofsulfide (Houben-Weyl VIII, 214). De N-aminoiminomethyl-N'-alkylthioureumverbindingen met de formule 2 kunnen worden bereid door reactie van guanidinebase met een overeenkomstig alkylisothiocyanaat (Amerikaans octrooi- 25 schrift 4.009.163).

De uitgangsverbindingen met de formule 3 kunnen volgens bekende methoden worden bereid.

De verkregen verbindingen kunnen met anorganische of organische zuren tot farmaceutisch aanvaardbare zouten 30 worden omgezet. Voorkeurszuren voor de zoutvorming zijn chloorwaterstofzuur, broomwaterstofzuur, zwavelzuur, fosforzuur, mierenzuur, melkzuur, citroenzuur en maleïnezuur.

De verbindingen met de formule 1 bezitten anti-

8520077

tumor- en anti-parasitaire immunostimulerende eigenschappen. De sterkte en richting van de aktiviteit alsook de toxiciteit hangen van de substituenten in het molekuul af.

Het is bekend, dat bij testen van het met de
5 verbindingen met de formule 1 structureel verwante gutimine als anti-hypoxiaal middel (C.A. 66 452.929 (1972); Pathol. Phys. Exp. Ther. 10 (6)) bij farmacologische en klinische onderzoeken mikrocirculatiestoornissen veroorzaakt (Gematol. Transfusiol. (1984), 29 (1), 49-52).

10 Gevonden is, dat de verbindingen met de formule 1 de verminderde werking van het immuunsysteem van organismen kan herstellen tot normaal of zelfs kan verhogen tot boven normaal.

Dierlijke organismen bezitten een imuunsysteem (bijvoorbeeld tumoreliminerend systeem). Wanneer de aktiviteit van
15 het immuunsysteem daalt of tot stilstand komt, kunnen verschillende aandoeningen optreden en tumoren verschijnen. De verbindingen met de formule 1 aktiveren het natuurlijk immuunsysteem en zijn daarom bruikbaar in die gevallen, waarin het gewenst is om de verminderde aktiviteit van het immuunsysteem te herstellen of de normale akti-
20 viteit te verhogen.

De verbindingen met de formule 1 vertonen nog andere bruikbare biologische werkingen, bijvoorbeeld genezing van mikrocirculatiestoornissen, onschadelijk maken van voor de gezondheid schadelijke radikalen, en verbetering van de funktie en levens-
25 duur van cellen met een tekort aan zuurstof.

Van de verschillende biologische werkingen van de zeer aktieve verbindingen met de formule 1 worden er enkele, niet alle, met de onderstaande proeven toegelicht.

Immunologische proeven

30 Lymfocyten. Lymfocyten werden op Ficoll-Uromiro (Böyum 1968) gradiënt afgescheiden uit veneus bloed van gezonde donors en patiënten met respektievelijk maligne lymfoom en metastatische vaste tumoren. Bij het selekteren van de patiënten uit laatstgenoemde groep werd

8520077

de verminderde ADCC en NK-aktiviteit in aanmerking genomen. De fagocyten werden door behandelen met ijzerpoeder en met behulp van een magneet verwijderd.

ADCC. ADCC werd bepaald volgens de methode van Perlmann en Perlmann (1970) onder toepassing van geringe wijzigingen (Láng et al., 1981). Kippe-erythrocyten gemerkt met 10^5 ^{51}Cr en bedekt met anti-kippe-erythrocyt konijneserum werden met de lymfocyten 4 uren bij 37°C geïncubeerd. Toen de reactie was beëindigd werd de activiteit van de vloeistof boven de afgecentrifugeerde cellen gemeten met een γ -teller. De snelheid, waarmee het chroom werd afgegeven, werd uitgedrukt als cytotoxiciteitsindex (CI %). De waarde daarvan werd berekend zoals beschreven in onze eerdere publikaties (Láng et al., 1980) (zie tabel A).

NK. NK-aktiviteit werd bepaald volgens de methode van Jondal en Pross (1975) onder toepassing van geringe wijzigingen (Láng et al., 1981). Met ^{51}Cr gemerkte K-562 tumorcellen werden met effektorcellen geïncubeerd in een TC 199 vloeibaar voedingsmedium, dat 10% gedekompleteerd kalfsserum bevatte. Toen de reactie was beëindigd werd de radioactiviteit van de vloeistof boven de afgecentrifugeerde cellen (chroomafgifte) geteld met een γ -teller. De sterfte van de doelcellen (cytotoxiciteitsindex %) werd uitgedrukt als het verschil tussen de testafgifte en spontane afgifte.

Statistische berekeningen werden uitgevoerd door middel van een mono-monsterbepaling. Verschillende verbindingen met de formule 1 vertonen buitengewone immunostimulerende werking (bijvoorbeeld de verbindingen uit de voorbeelden XI, XII en XVI). Deze verbindingen zijn in staat om de normale en sterke daling in NK en K-celaktiviteit significant te herstellen en zelfs tot boven normaal te brengen. De werking kan zelfs zo sterk zijn, dat een tot een tiende van de oorspronkelijke waarde gedaalde cytotoxische aktiviteit weer tot de oorspronkelijke waarde kan worden teruggebracht (tabel B).

In een dosis overeenkomend met de verwachte

8520077

humane plasmaconcentratie versterken de verbindingen met de formule 1 de NK- en K-celaktiviteit van humane lymfocyten en verhogen de NCMC- en ADCC-reaktie met een dosisafhankelijke snelheid. Blijkens eerder verkregen resultaten bij andere immunologische proeven doen
5 de verbindingen blastulatransformatie en -migratie toenemen.

Bij substitutie aan de stikstofatomen neemt de met de toxiciteit gerelateerde molair evenredige immunostimulerende werking in het algemeen af.

Omdat de cytotoxische aktiviteit van tumor-
10 patiënten evenredig met het ziektestadium daalt en bovendien door gebruikelijke cytostatische behandelingen nog verder afneemt, is het van groot belang, dat de verbindingen met de formule 1 sterke immunostimulerende werking hebben en geen immunodepressoren zijn. Dit is van grote betekenis met het oog op reconvalescentie.

15 Migratie van leucocyten

De spontane (willekeurige) migratie van leucocyten werd gemeten aan agarose mikrodruppels volgens de methode van McCoy et al. (1977) onder geringe wijzigingen (Kalmár en Gergely, 1982).

20 2 Ml agarosedruppeltjes (0,2%) werden aangebracht op migratieplaten (Greiner, West-Duitsland). TC 199 vloeibaar voedingsmedium werd toegevoegd en de platen werden luchtdicht afgesloten. Na 24 uren werd het migratiegebied gemeten onder een stereomikroskoop. Het migratiegebied werd uitgedrukt in mm².

25 Migratie van leucocyten

De rechtstreekse (willekeurige) migratie van polymorfonucleaire cellen van gezonde donors werd verhoogd met de verbindingen uit de voorbeelden XI, XII en XIV. De optimale dosis bedroeg 1,0 µg/ml. Bij een hogere dosis (10 µg/ml) was het effect
30 minder uitgesproken (tabel C).

Mitogen-geïnduceerde blastula-omzetting

Lymfocyten werden gekweekt in een TC 199 vloeibaar voedingsmedium aangevuld met 10% gedekompleteerd kalfs-serum,

8520077

anti-biotika en 25mM Hepes (Serva). 200 μ l celsuspensie, die $2,10^5$ lymfocyten bevatte, werd opgebracht op een mikroplaat (Sterilin, Groot-Brittannië). Vijf paralleltests werden uitgevoerd.

Aan de kultures werden respectievelijk 2 en

- 5 10 μ g/ml fytohemagglutinine (Leucoagglutinine afkomstig van Pharmacie Zweden) en 25 μ g/ml Concanavaline A (Carbiochem) toegevoegd; deze hoeveelheden hebben betrekking op de eindconcentratie. De kultures werden 72 uren bij 37° C gekweekt. Acht uren voor het eind van de afloop van de kweektijd werd 0,5 μ Ci 3 H thymidine
- 10 (Chemapol, Tsjechoslowakije) aan de monsters toegevoegd. De opname werd gestopt door de kultures te bevriezen. Na smelten werden de monsters gefiltreerd op een automatische oogstinrichting (Dynatech). De radioactiviteit van de monsters werd gemeten met een scintillatieteller. De activiteit werd uitgedrukt in cpm (tabellen D en E).

15 Statistische analyse

De significantie werd bepaald door middel van een monomoster 2T2-test. De resultaten met de verbinding uit voorbeeld XI zijn vermeld in de tabellen A, B en C.

- Voorafgaande snelle test voor het bepalen van de anti-tumor- en
- 20 immunostimulerende werking.

Deze methode werd in onze laboratoria uitgewerkt voor het snel testen van een groot aantal monsters. CFLP-mannetjesmuizen (gemiddeld lichaamsgewicht 30 g) werden intraperitoneaal geënt met 4.000.000 ascites lymfomacellen.

- 25 Alleen die dieren werden gebruikt, waarbij zich op de vierde dag een gemakkelijk waarneembare tumor (ascites) had ontwikkeld. Elke groep bevatte ten minste 10 muizen en de muizen werden oraal behandeld met 1/10 van de LD₅₀-waarde.

- 30 24 Uren na de orale behandeling werden de resultaten geëvalueerd door Giemsa-kleuring van ascites-uitstrijkjes op basis van cytologische analyse. De controlegroep bevatte evenveel muizen als de behandelde groep.

De aantasting van de tumorcellen, aktivering

8520077

van het organisme en eventuele toxische werkingen werden onderzocht.

Voor de anti-tumorwerking werd de procentuele verhouding gedode en intacte tumorcellen bepaald. De resultaten werden als volgt uitgedrukt:

5	<u>Percentage gedode tumorcellen</u>	<u>Werking</u>
	0 - 30 %	geen
	30 - 70 %	middelmatig
	70 - 100 %	sterk (inhibitie)

De verhoging van het immuunsysteem van het
10 organisme werd beoordeeld op grond van het aantal en de activiteit
van neutrofiele granulocyten, lymfocyten en makrofagen, die onder
de ascites tumorcellen verschijnen en aan het immuunsysteem deel-
nemen. De activiteit van het immuunsysteem manifesteert zich ook
bij de rat, waarin voornoemde cellen in de ascites een plasmabrug
15 met de tumorcellen vormen. Volgens deze waardebeoordeling kan niet van
een verhoging ten opzichte van de controle worden gesproken wanneer
er geen verschil is in aantal en activiteit van de cellen. De
werking wordt als middelmatig aangemerkt wanneer de toename in het
aantal cellen of van de activiteit ten opzichte van de controle ten
20 minste 20% bedraagt. Bij meer dan 20% toename in celaantal en akti-
viteit van het immuunsysteem ten opzichte van de controle is er
sprake van een sterke werking (tabel G).

De toxiciteit werd bepaald door de morfologi-
sche veranderingen in neutrofiele granulocyten en lymfocyten,
25 plasmavasculisatie, kernfragmentatie en vorming van polysegmenten
en toxische granulatie te beoordelen. De toxiciteit werd als volgt
uitgedrukt:

	<u>Beoordeling</u>	<u>Toxiciteit</u>
	Geen veranderingen zoals voornoemd in eigen cellen	Geen
30	20% veranderingen	Middelmatig
	> 20% veranderingen	Hoog

Anti-tumortest

1) In vitro

8520077

Kultures van K-562 humane erythroleukemiecellen en P-388 muizelymfomacellen werden behandeld met 1-100 μ g/ml proefverbinding.

2) In vivo

5 a) NK-ly-asciteslymfoom

Een miljoen Németh-Kellner asciteslymfomacellen werden intraperitoneaal getransplanteerd in 20 CFLP mannetjesmuizen (gemiddeld lichaamsgewicht 30 g); (om te screenen werd een nieuwe muizeascitestumor gebruikt; Neoplasma 8, 337 (1961)).

- 10 De helft van de muizen diende als controle en de andere helft werd behandeld met verschillende verbindingen met de formule 1 in een dosis van 1/10 van de LD₅₀-waarde, respectievelijk een dag per oraal en vijf achtereenvolgende dagen intraperitoneaal (wanneer 1/10 van de LD₅₀-waarde werkzaam was, werd een lagere dosis gebruikt). Bij de groep, die een enkele keer was behandeld, werd de
15 cytomorfologische verandering aan het ascitesstrijkje na 24 uren bepaald en werd het percentage aangetaste en gedode cellen berekend. Voor de groep, die vijf achtereenvolgende dagen was behandeld, werd het overlevingspercentage bepaald.

20 b) L₁₂₁₀-tumor

10⁶ L₁₂₁₀-tumorcellen werden intraperitoneaal getransplanteerd in 20 BDF₁-vrouwtjesmuizen (lichaamsgewicht 20 g). 24 Uren later werd met de behandeling begonnen en 8 dagen voortgezet. Elke groep bestond uit 5 dieren; dosis: 5, 50 en 500 mg/kg
25 p.o. daags. De controlegroep bestond eveneens uit 5 dieren. Het overlevingspercentage werd bepaald.

c) Lewis-longtumor

- Groepen van elk 6 dieren werden gebruikt; dosis: 5 en 50 mg/kg. De controlegroep bestond eveneens uit 6 dieren. Voor
30 de proef werden C₅₇Bl-vrouwtjesmuizen (lichaamsgewicht 20 g) gebruikt.

De tumor werd subcutaan in de spier van de rechterpoot getransplanteerd. Na 10 dagen werd de poot afgezet, en

8520077

werd met de orale behandeling begonnen, die 10 dagen werd voortgezet. De dieren werden gedood en de metastases werden onder de stereomikroskoop geteld.

d) Honden van verschillend ras en met spontane borsttumor (ductus cc.) werden 4 weken oraal behandeld met de proefverbindingen in doses van 1-10 mg/kg. Uitgesneden weefselmonsters werden verzameld voor histologisch onderzoek.

De verbindingen uit de voorbeelden XI, XIII, XIV, XV, XXVII, XVIII, XXXIV, XXXV, XXXVI en XXXVIII vertonen buitengewone anti-tumorwerking. Zo worden de K-562 humane erythroleukemiecellen in een weefselcultuur met de verbinding uit voorbeeld XI in een concentratie van 4 μ g/ml geremd. Anderzijds remt deze verbinding de proliferatie van P-388-cellen alleen in een concentratie van 4 μ g/ml en wordt de activiteit niet sterker wanneer de concentratie wordt verhoogd tot 400 μ g/ml. Verbindingen met een hoge activiteit vertonen een dosisafhankelijke werking in een concentratiereeks van 0,5-5 μ g/ml, terwijl verbindingen met een lage activiteit niet dosisafhankelijk zijn. Blijkens in-vivo-tests zijn verbindingen uit deze groep tegen L₁₂₁₀ in het geheel niet of slechts in geringe mate werkzaam.

De verbindingen doen het aantal longmetastases in Lewis-longtumor significant dalen. De verbindingen XI, XIII, XIV, XV, XXII, XXVII, XXVIII en XLV zijn in een dosis lager dan 1/10 van de LD₅₀-waarde werkzaam. De verbinding uit voorbeeld XIV doet al in een dosis van 5 mg/kg het aantal longmetastases met 50% afnemen en dit is bijzonder significant gelet op het feit, dat de LD₅₀-waarde 2380 mg/kg bedraagt.

Gebleken is, dat door de behandeling te herhalen de werking meer kan worden versterkt dan door de dosis te verhogen.

De verbindingen uit de voorbeelden XI, XIII, XIV, XX, XXII, XXVII en XLV bleken werkzaam tegen Nk-ly-ascitestumor in een concentratie lager dan 1/10 van de LD₅₀-waarde. Met laatstgenoemde verbindingen wordt dosisafhankelijk de sterfte ver-

8520077

laagd en de levensduur verlengd. Deze verbindingen vertonen in kleine doses immunostimulerende werking, terwijl in hogere doses de direkte anti-tumorwerking zich ook manifesteert. Zo vertonen de verbindingen uit voorbeeld XI en XXII immunostimulerende werking
5 in doses van respectievelijk 25 en 20 mg/kg. De verbindingen uit voorbeeld XI en XXII zijn cytotoxisch in een dosistrajekt van respectievelijk 250-500 en 40-160 mg/kg. S-allyl-, S-1-chloor-2-hydroxypropyl- of S-1-broom-2-hydroxypropyl-gesubstitueerde verbindingen met de formule 1 zijn zeer werkzaam tegen spontane borst-
10 tumoren bij honden. Bij biopsie uitgevoerd na 3-4 weken behandelen, werd invasieve celinfiltratie in tumoren (ductus cc.) bestaande uit lymfocyten en neutrofiele granulocyten, makrofagen en zo nu en dan eozinifiele granulocyten waargenomen. Bij de tumorcellen werden degeneratieve veranderingen en sterke ontleding gekonstateerd.

15 NK-cellen vormen plasmabruggen met tumorcellen en dit veroorzaakt vakuolaire degeneratie van het plasma in de tumorcellen en grote verdunning in de DNS-stand van de nucleus. De nucleus-plasmarelatie verandert, de nucleus zwelt sterk op en de basofiliteit van het plasma neemt af.

20 In ongeveer 25% van alle gevallen is de leucocyteninfiltratie in de tumor verwaarloosbaar; anderzijds zwellen de tumorcellen op en worden gehyaliniseerd. In de intercellulaire stand zet zich een zeer grote hoeveelheid gekleurd hyalinemateriaal af.

25 Bij orale toediening van de verbinding uit voorbeeld XI in orale dagelijkse doses van 30-120 mg (0,5-2 mg/kg) gedurende 6-12 maanden werd een significante verbetering in of reconvalescentie van humane botmetastase van borsttumoren, ovariële tumoren en pancreastumoren waargenomen.

30 Proef op anti-tumorwerking in combinaties

a) Kombinaties met bekende cytostatica

Verschillende cytostatica met biologisch alkyl-
lerende werking werden samen met verbindingen met de formule 1 toe-

8520077

gediend aan CFLP-muizen met NK-ly-ascitestumor. De cytostatica werden oraal, intraperitoneaal of intraveneus toegediend in een dosis overeenkomend met 1/5 of 1/10 van de LD₅₀-waarde, of in de meest werkzame dosis volgens de stand der techniek. De verbindingen met de formule 1 werden 48 uren na toediening van het cytostaticum een of meerdere keren oraal toegediend in een dosis van 1/10 of 1/20 van de LD₅₀-waarde. De combinaties bestonden uit enerzijds cyclofosfamide, carnomustine, degranol, dibroomdulcitol en dibroommannitol, en anderzijds de verbindingen uit de voorbeelden XI, XIII, XIV, XV, XVI, XXVII, XXVIII en XLV. Vergeleken met de controlegroep, die alleen met het bekende cytostaticum was behandeld, werd de anti-tumorwerking verhoogd en de immunoaktiviteitsdaling verminderd.

2) Kombinatie met bekende vitaminen

De isothiuroniumzouten met de formule 1 kunnen doeltreffend worden gekombineerd met middelmatige doses vitamine A en D₃ en hoge doses vitamine C. Zowel bij farmacologische proeven als bij klinische proeven op mensen werden goede resultaten geboekt.

3) Kombinatie met bekende hormonen

Voor het behandelen van hormoonafhankelijke tumoren bleek zo'n combinatie zowel bij farmacologische proeven als bij klinische proeven op mensen bruikbaar.

4) Toepassing bij operaties

De verbindingen met de formule 1 werden met goed gevolg toegepast bij farmacologische proeven in het geval van vaste tumoren bij behandeling voor en na een operatie (NK-ly-vast, Yosida). Op grond van farmacologische proefresultaten mag worden gesteld, dat de verbindingen met de formule 1 waarschijnlijk ook geschikt zijn voor toepassing bij operaties op mensen voor en na de ingreep.

Proef op anti-parasitaire werking

Verbindingen met de formule 1 werden gedurende

8520077

3 dagen oraal toegediend aan honden geïnfecteerd met teken (Ixodes ricinus). Zo werd bijvoorbeeld N-aminoiminomethyl-S-allylisoniumhydrochloride oraal toegediend in een dosis van 1-2 mg/kg.

68 Uren later waren alle teken dood.

5 Onschadelijk maken van vrije radicalen

De verbindingen uit de voorbeelden IX, X, XI, XVI, XXIII en XXIX brengen een significante verlaging teweeg in de toxiciteit (LD_{50}) van waterstofperoxyde, organische peroxyden en biologische alkyleringsmiddelen (die vrije radicalen vormen). Uit 10 de gunstige resultaten met betrekking tot de toxiciteit blijkt, dat de verbindingen met de formule 1 meer geschikt zijn om vrije radicalen te binden en bescherming te bieden tegen straling dan de bekende isothiuroniumderivaten verkregen uit de overeenkomstige thiuroniumverbindingen. Zo is bijvoorbeeld de therapeutische wer- 15 king van de verbinding uit voorbeeld XXIII beter dan die van β -aminoethyl-isothiuroniumhydrochloride.

Cardiobeschermende werking bij isoprenaline-necrose

Aan mannetjes CFY-ratten (lichaamsgewicht 250-300 g) werd 5 mg/kg isoproterenol intraperitoneaal toegediend. Elke 20 groep bevatte tien dieren. Een deel van de dieren diende als controle en het andere deel werd behandeld met de verbinding uit voorbeeld XIV in een dosis van respectievelijk 1-5 mg/kg i.p. en 10-50 mg/kg p.o.. Twee weken later werden de harten histologisch onderzocht. De verhouding afgestorven en intact hartspierweefselgebied werd 25 bepaald. Daarbij bleek, dat in alle gevallen met N-aminoiminomethyl-S-allyl-isothiuroniumhydrochloride (formule 1) een significante daling in necrose optrad. Dit kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan binding van door neutrofiele granulocyten gevormd waterstofperoxyde door de proefverbinding. Andere vrije radicalenbinden- 30 de verbindingen en anti-oxydantia vertonen bij deze proef een soortgelijke werking.

Invloed op de bloedcirculatie en ademhaling

De verbinding uit voorbeeld XI vertoont geen

8520077

aanmerkelijke invloed op de hemodynamische parameters en ademhalingsfunctie van katten met gesloten en geopende borstkas bij intraveneuze toediening in een dosis van 10 mg/kg. De volgende parameters werden bepaald: ventriculaire en perifere druk; hart-
5 frekwentie (werking) ECG, vol./min.; contractiliteit; respiratoir volume; respiratoire snelheid en weerstand. Bij intraveneuze toediening van meer dan 10 mg/kg namen de linker ventriculaire druk en frekwentie af. Bij toediening in een dosis van 50 mg/kg waren deze effecten significant en langdurig. Bij intraveneuze toediening
10 in een dosis van 100 mg/kg werden sterke hemodynamische veranderingen gekonstateerd, maar de katten bleven leven.

In de onderstaande tabellen A-E zijn de resultaten van bovenbeschreven proeven met N-aminoiminomethyl-S-allyl-isothiuroniumhalogenide (verbinding A) vermeld.

8520077

Tabel A

Werking op ADCC-aktiviteit; cytotoxiciteitsindex (%).
 Verhouding effektorcellen en doelcellen = 5:1; incubatietijd 4 uren.
 Gemiddelde waarden: $\pm$ S.E.

Groep (aantal)	Kontrole	Behandeling		
		Verbinding A	(moleculair gewicht 194,7)	
		$6,7 \times 10^{-10}$ mol	$6,7 \times 10^{-9}$ mol	$6,7 \times 10^{-8}$ mol
Normale ADCC (10)	$42,0 \pm 5,0$	$58,5 \pm 5,2$ + 39%	$64 \pm 5,8$ + 52%	$68,2 \pm 5,3^*$ + 62%
Verlaagde ADCC (10)	$2,8 \pm 0,8$	$6,35 \pm 1,7$ + 126%	$7,7 \pm 1,9$ + 175%	$10,2 \pm 2,7^*$ + 264%

* significantie ($p < 0,05$)

8520077

Tabel B

Werking op NK-aktiviteit.

Verhouding effektorcellen en doelcellen = 50:1; incubatietijd 4 uren.

Cytotoxiciteitsindex (%); gemiddelde waarden: $\pm$ S.E.

Groep (aantal)	Kontrole	Behandeling (mol/ml)		
		Verbinding A $6,7 \times 10^{-10}$ mol	(moleculair gewicht 194,7) $6,7 \times 10^{-9}$ mol	$6,7 \times 10^{-8}$ mol
Normale NK (8)	$32,9 \pm 2,5$	$41 \pm 2,9$ + 25%	$43,4 \pm 2,7$ + 32%	$47,6 \pm 1,4$ + 45%
Verlaagde NK (7)	$15,1 \pm 2,4$	$21,6 \pm 3,0$ + 43%	$25,3 \pm 3,2$ + 68%	$32,2 \pm 3,2^*$ + 113%

* Signifikantie ($p < 0,05$)

Tabel C

In vitro werking op direkte (willekeurige)migratie van humane poly-morfonucleaire leucocyten; migratiegebied (mm²); gemiddelde waarden bij 7 gezonde kontroledieren: $\pm$ S.E.M.

Behandeling	Dosis (/ug/ml)		
	Kontrole	0,1	1,0
Verbinding 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) niet significant

2) significant ($p < 0,01$)

3) significant ($p < 0,05$)

8520077

Tabel D

In vitro werking op blastulaverandering van humane lymfocyten
gestimuleerd door PHA en Con A; gezonde kontroledieren met
normale reactiviteit; n = 6; gemiddelde c.p.m. $\pm$ S.E.M.

Mytogene verbinding	Dosis (/ug/ml)		
	0,1	1,0	10,0
PHA 2 /ug/ml	22233 $\pm$ 3688	23156 $\pm$ 2737	25404 $\pm$ 2860
PHA 10 /ug/ml	29969 $\pm$ 3557	33826 $\pm$ 3638	33790 $\pm$ 5203
Con A 25 /ug/ml	10564 $\pm$ 3764	14089 $\pm$ 2602	17038 $\pm$ 3202
Kontrole	21166 $\pm$ 3774	29959 $\pm$ 4051	10545 $\pm$ 3414

8520077

Tabel E

In vitro werking op blastulaverandering van humane lymfocyten
gestimuleerd door PHA en Con A; patiënten met verlaagde reakti-
viteit (tumor en SLE); n = 6. gemiddelde c.p.m. $\pm$ S.E.M.

Mytogene verbinding	Kontrole	Dosis (μ g/ml)		
		0,1	1,0	10,0
1. Verbinding 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

Tabel F

24 Uurs akute toxiciteit van verbindingen met de formule 1

Verbinding uit voorbeeld	R ₂	R ₁	LD ₅₀ (mg/kg)	
			p.o.	i.p.
5				
IX	H	methyl	2320 ± 220	
XXIII	H	ethyl	3080 ± 290	
X	H	propyl	2800 ± 160	
XXV	H	butyl	2700 ± 310	
10				
XXIV	H	i-propyl	2260 ± 210	
XXVI	H	i-amyl	2260 ± 241	
XIII	H	2-chloorethyl	1120 ± 140	
XXVII	H	2-broomethyl	1050 ± 280	
15				
XIV	H	1-chloor-2-OH-propyl	1240 ± 160	
XV	H	3-chloorpropyl	1210 ± 180	
XXVIII	H	3-broompropyl	980 ± 640	
XVI	H	2-hydroxyethyl	3280 ± 460	1680 ± 210
XXIX	H	1-oxypropyl	2860 ± 180	
20				
XI	H	allyl	2380 ± 320	320 ± 30
XLIV	H	methallyl	1640 ± 210	
XVIII	H	benzyl	2420 ± 260	
XVII	H	propargyl	90 ± 7,6	
XX	methyl	allyl	600 ± 54	75 ± 6,3
25				
XXXIV	ethyl	allyl	780 ± 62	84 ± 7,6
XXII	cyclohexyl	allyl	450 ± 51	65 ± 5,1
XXI	isopropyl	allyl	280 ± 26	32 ± 4
XLV	allyl	allyl	380 ± 41	36 ± 4
XXII	cyclohexyl	allyl	400 ± 38	40 ± 6

8520077

Tabel G

Verbinding uit voorbeeld	Anti-tumor- werking	Immunostimulerende werking	Toxiciteit
IX	middelmatig	middelmatig	middelmatig
XXIII	middelmatig	sterk	0
X	middelmatig	middelmatig	0
XXV	middelmatig	middelmatig	0
XXIV	middelmatig	middelmatig	0
XXVI	middelmatig	middelmatig	0
XIII	sterk	zwak	0
XXVII	sterk	zwak	0
XIV	sterk	zwak	0
XV	sterk	zwak	0
XXVIII	sterk	zwak	0
XVI	middelmatig	sterk	0
XXIX	middelmatig	middelmatig	0
XI	sterk	sterk	0
XLIV	middelmatig	middelmatig	0
XVIII	verhogend	0	0
XVII	zwak	zwak	middelmatig
XX	sterk	zwak	0
XXXIV	middelmatig	middelmatig	0
XXII	sterk	zwak	0
XXI	sterk	zwak	0
XLV	sterk	zwak	0
XXII	zwak	zwak	0

8520077

De uitvinding heeft voorts betrekking op farmaceutische preparaten, die als werkzaam bestanddeel ten minste een verbinding met de formule 1 bevatten, waarin

R_1 C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-6} cyclo-
5 alkyl, aralkyl of aryl, welke groepen eventueel door een of meer hydroxygroepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen gesubstitueerd kunnen zijn, voorstelt,

R_2 waterstof, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl
of C_{3-6} cycloalkyl voorstelt, en

10 X een anorganisch of organisch anion voorstelt.

De farmaceutische preparaten volgens de uitvinding kunnen op gebruikelijke wijze worden bereid of vervaardigd. De werkzame bestanddelen met de formule 1 kunnen bij voorkeur in de vorm van capsules worden gebracht, samen met gebruikelijke hulp-
15 middelen, glijmiddelen, etc.. De capsules kunnen met een automatische encapsuleerinrichting worden vervaardigd. De farmaceutische preparaten kunnen ook in de vorm worden gebracht van poederampulles, parenterale oplossingen voor injectie en infusie, alles op gebruikelijke wijze. Als oplosmiddel kan gedestilleerd water of een fysiolo-
20 gische zoutoplossing worden gebruikt.

Een andere vorm van de farmaceutische preparaten met als werkzaam bestanddeel een verbinding met de formule 1, is een zalf en in het bijzonder een lyofiele zalf.

Verbindingen met de formule 1 met een sterke
25 geur worden bij voorkeur gemikro-encapsuleerd, bijvoorbeeld door vorming van cyclodextrineclathraten.

Behalve een verbinding met de formule 1 kunnen de farmaceutische preparaten volgens de uitvinding nog een of meer bekende farmaca bevatten.

30 De farmaceutische preparaten volgens de uitvinding kunnen worden toegepast voor therapeutische behandeling van mens en dier. Toegepast als immunostimulans bedraagt de orale of rectale dosis bij voorkeur ongeveer 0,5-25 mg/kg. Voor topische

8520077

toepassing worden bij voorkeur hogere doses gebruikt.

Voor wat de toepassing op het gebied van de nijverheid betreft, de uitvinding heeft betrekking op hoofdzakelijk nieuwe verbinding met anti-tumor- en immunostimulerende werking.

- 5 De hiernavolgende voorbeelden dienen uitsluitend ter toelichting op de uitvinding zonder de conclusies te beperken.

Uitgangsverbindingen

Voorbeeld I

- 10 N-aminoiminomethyl-thioureumcarbonaat

In een autoclaaf worden 84,0 g (1,0 mol) dicyaandiamide en 300 ml water gebracht. Na sluiting wordt 34,0 g (1 mol) gasvormig waterstofsulfide als volgt in de autoclaaf geleid: een zodanige hoeveelheid gasvormig waterstofsulfide wordt bij
15 een temperatuur van 20° C ingeleid, dat de druk in de autoclaaf 150 kPa wordt. Het gasinleiden wordt dan beëindigd en de autoclaaf wordt langzaam verwarmd tot 80° C. Intussen wordt weer gasvormig waterstofsulfide in een zodanige hoeveelheid ingeleid, dat de druk in de autoclaaf permanent op 150 kPa blijft. Als al het waterstofsulfidegas is ingeleid wordt de temperatuur in de autoclaaf op
20 80° C gehouden totdat de druk daalt tot 30-40 kPa. Na afkoelen van het reaktiemengsel tot 20° C wordt gespoeld met stikstof en gefiltreerd. Het heldere filtraat wordt afgekoeld tot 0° C en kooldioxydegas wordt ingeleid. Het uitgekristalliseerde, witte N-aminoiminomethylthioureumcarbonaat wordt afgefiltreerd, gewassen met koud
25 water en gedroogd bij 60-80° C. Aldus wordt 100 g (67% opbrengst) van de titelverbinding met een smeltpunt van 127-129° C verkregen.

Het IR-spektrum van de verkregen verbinding is vergeleken met dat van een standaardmonster.

- 30 Voorbeeld II

N-aminoiminomethyl-N'-methylthioureumcarbonaat

Aan een oplossing van 5,9 g (0,1 mol) guanidinebase in 30 ml aceton wordt een oplossing van 7,3 g (0,1 mol) methyl-

8520077

isothiocyanaat in 10 ml aceton toegevoegd. De isothiocyanaatoplossing wordt met een zodanige snelheid aan de guanidineoplossing toegevoegd, dat de temperatuur van het mengsel niet boven 40° C komt. Na 4 uren staan bij 40° C wordt het oplosmiddel in vakuo verwijderd.

- 5 De achtergebleven lichtgele olie wordt geëmulgeerd in water, waarop een opale oplossing ontstaat. Daarin wordt kooldioxydegas geleid, waarop de titelverbinding precipiteert als witte kristallen. Opbrengst: 12,0 g (73,5%)
Smeltpunt: 132-134° C.

10 Voorbeelden III-VIII

Tewerkgaande volgens voorbeeld II worden de volgende verbindingen bereid:

- III. N-aminoiminomethyl-N'-ethylthioureumcarbonaat.
IV. N-aminoiminomethyl-N'-n-propylthioureumcarbonaat.
15 V. N-aminoiminomethyl-N'-isopropylthioureumcarbonaat.
VI. N-aminoiminomethyl-N'-n-butylthioureumcarbonaat.
VII. N-aminoiminomethyl-N'-allylthioureumcarbonaat.
VIII. N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexylthioureumcarbonaat.

- De hiernavolgende voorbeelden hebben betrekking
20 op de bereiding van verbindingen met de formule 1 zelf.

Voorbeeld IX

N-aminoiminomethyl-S-methylisothiuroniumjodide

- 14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureumcarbonaat wordt gesuspenseerd in 50 ml absolute ethanol. Aan de
25 gevormde suspensie wordt 17,0 g (0,12 mol) methyljodide toegevoegd. Het mengsel wordt langzaam verwarmd tot koken onder ontwikkeling van kooldioxyde. Na 30 minuten koken laat men het reaktiemengsel afkoelen tot omgevingstemperatuur. Het reaktiemengsel wordt gefiltreerd om eventueel kristallijn neerslag te verwijderen. Het heldere
30 filtraat wordt in vakuo ingedampt en de achtergebleven olie wordt omgekristalliseerd uit ethylacetaat. De gele kristallen worden afgefiltreerd en gedroogd bij 40-50° C. Aldus wordt 22,1 g (85% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 124-125° C verkregen.

8520077

Voorbeeld X

N-aminoiminomethyl-S-n-propylisothiuroniumbromide

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthiourem-carbonaat wordt gesuspenderd in 50 ml absolute ethanol. Aan de
5 suspensie wordt 14,8 g (0,12 mol) n-propylbromide toegevoegd. Het
mengsel wordt langzaam verwarmd onder roeren tot koken onder ont-
wikkeling van kooldioxyde. Na 45 minuten koken laat men het reaktie-
mengsel afkoelen tot omgevingstemperatuur. Het reaktiemengsel wordt
dan gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het
10 heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige resi-
du wordt gekristalliseerd uit ethylacetaat. De witte kristallen
worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 19.5 g
(opbrengst 81%) titelverbinding met een smeltpunt van 122-124° C
verkregen.

15 Voorbeeld XI

N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuroniumbromide

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthiourem-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de ge-
vormde suspensie wordt 14,5 g (0,12 mol) allylbromide toegevoegd.
20 Het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot
koken. Na 30 minuten refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld
tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neer-
slag te verwijderen. Het filtraat wordt in vakuo ingedampt en het
olieachtige residu wordt gekristalliseerd uit ethylacetaat. De
25 kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus
wordt 19,6 g (opbrengst 82%) titelverbinding met een smeltpunt van
123-125° C verkregen.

Voorbeeld XII

N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuroniumchloride

30 14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthiourem-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de ge-
vormde suspensie wordt 9,18 g (0,12 mol) allylchloride toegevoegd.
Het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken

8520077

en 1 uur gefluxt. Na afkoelen tot kamertemperatuur wordt het reaktiemengsel gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt gekristalliseerd uit ethylacetaat. De kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 15,7 g (81% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 125-127° C verkregen.

Voorbeeld XIII

N-aminoiminomethyl-S-(2-chloorethyl)-isothiuroniumbromide.

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 17,2 g (0,12 mol) 1-broom-2-chloorethaan toegevoegd en het mengsel wordt onder heftigroeren verwarmd tot koken. Na 90 minuten refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt. Het olieachtige residu wordt gekristalliseerd uit ethylacetaat. De witte kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 17,2 g (66% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 142-143° C verkregen.

Voorbeeld XIV

N-aminoiminomethyl-S-(1-chloor-2-hydroxypropyl)-isothiuroniumbromide.

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 20,8 g (0,12 mol) 1-broom-2-hydroxy-3-chloorpropaan toegevoegd. Het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 90 minuten refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt uit ethylacetaat gekristalliseerd. De lichtcrème gekleurde kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 17,8 g (61% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 118-119° C verkregen.

Voorbeeld XV

8520077

N-aminoiminomethyl-S-(3-chloorpropyl)-isothiuroniumbromide.

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 80 ml acetonitril. Aan de aldus gevormde suspensie wordt 18,9 g (0,12 mol) 1-broom-3-chloorpropaan
5 toegevoegd en het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 90 minuten refluxen wordt het reaktiemengsel heet gefiltreerd om vaste stof te verwijderen, waarna men het filtraat laat afkoelen tot omgevingstemperatuur. Witte kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 17,3 g
10 (65% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 129-131° C verkregen.

Voorbeeld XVI

N-aminoiminomethyl-S-(2-hydroxyethyl)-isothiuroniumchloride.

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 9,7 g (0,12 mol) ethyleenchloorhydrin toegevoegd en het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 90 minuten refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt uit ethylacetaat gekristalliseerd. De kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 13,5 g (68% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 134-136° C verkregen.

25 Voorbeeld XVII

N-aminoiminomethyl-S-glycidylisothiuroniumbromide.

14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 80 ml acetonitril. Aan de aldus gevormde suspensie wordt 16,5 g (0,12 mol) epibroomhydrin toegevoegd
30 en het mengsel wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 2 uren refluxen wordt het reaktiemengsel heet gefiltreerd. Het heldere filtraat laat men afkoelen tot omgevingstemperatuur om daarna de gevormde witte kristallen af te filtreren en bij 40-50° C

8520077

te drogen. Aldus wordt 13,5 g (53% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 138-139° C verkregen.

Voorbeeld XVIII

N-aminoiminomethyl-S-benzylthiuroniumchloride.

5 14,9 g (0,05 mol) N-aminoiminomethylthioureum-carbonaat wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 15,2 g (0,2 mol) benzylchloride toegevoegd en het mengsel wordt onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 1 uur refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevings-
10 temperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt uit ethylacetaat gekristalliseerd. De witte kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 19,1 g (78% opbrengst) titelverbinding met een smelt-
15 punt van 159-161° C verkregen.

Voorbeeld XIX

De in de voorbeeld IX-XVIII bereide isothiuroniumzouten kunnen desgewenst als volgt worden omgekristalliseerd. Zo wordt bijvoorbeeld N-aminoiminomethyl-S-allylisoniuroniumchloride omgekristalliseerd door 10 g daarvan toe te voegen aan 60 ml
20 van een 5:1 mengsel van ethanol en methanol. Het hete mengsel wordt gefiltreerd om een weinig onopgeloste kristallen te verwijderen en het filtraat wordt, indien nodig, opgehelderd met geactiveerde kool. Hierna laat men het heldere filtraat afkoelen tot omgevingstemperatuur, waarbij witte kristallen neerslaan. Het mengsel wordt gekoeld
25 tot 0.5° C en na 1 uur staan bij deze temperatuur gefiltreerd. De kristallen worden gewassen met ijskoude ethanol en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 8,1 g (81% opbrengst) van de gewenste verbinding verkregen.

30 Voorbeeld XX

N-aminoiminomethyl-N'-methyl-S-allylisoniuroniumchloride.

16,3 g (0,05 mol) N-aminoiminomethyl-N'-methylthioureumcarbonaat, bereid volgens voorbeeld II, wordt toegevoegd

8520077

aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 9,18 g (0,12 mol) allylchloride toegevoegd en het mengsel wordt onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 1 uur refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt gekristalliseerd uit ethylacetaat. De witte kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 13,6 g (61% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 137-139° C verkregen.

10 Voorbeeld XXI

N-aminoiminomethyl-N'-isopropyl-S-allylisoniuroniumchloride.

19,1 g (0,05 mol) N-aminoiminomethyl-N'-isopropylthioureumcarbonaat, bereid volgens voorbeeld V, wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de gevormde suspensie wordt 9,18 g (0,12 mol) allylchloride toegevoegd en het mengsel wordt onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 1 uur refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt uit ethylacetaat gekristalliseerd. De witte kristallen worden afgefiltreerd en bij 40-50° C gedroogd. Aldus wordt 13,3 g (56% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 134-135° C verkregen.

Voorbeeld XXII

N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexyl-S-allylisoniuroniumchloride.

23,1 g (0,05 mol) N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexylthioureumcarbonaat, bereid volgens voorbeeld VIII, wordt toegevoegd aan 50 ml absolute ethanol. Aan de suspensie wordt 9,18 g (0,12 mol) allylchloride toegevoegd en het mengsel wordt onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 1 uur refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstemperatuur en gefiltreerd om eventueel gevormd neerslag te verwijderen. Het heldere filtraat wordt in vakuo ingedampt en het olieachtige residu wordt uit ethylacetaat gekristalliseerd. De witte kristallen worden gefiltreerd en bij

8520077

40-50° C gedroogd. Aldus wordt 20,85 g (85% opbrengst) titelverbinding met een smeltpunt van 129-130° C verkregen.

Voorbeelden XXIII-XXXI

- Tewerkgaande volgens voorbeeld XII worden de
- 5 volgende isothiuroniumverbindingen met de formule 1 bereid:
- XXIII. N-aminoiminomethyl-S-ethylisothiuroniumbromide;
smpt.: 123-124° C.
- XXIV. N-aminoiminomethyl-S-isopropylisothiuroniumbromide;
smpt.: 120-122° C
- 10 XXV. N-aminoiminomethyl-S-n-butylisothiuroniumbromide;
smpt.: 116-118° C.
- XXVI. N-aminoiminomethyl-S-isoamylisothiuroniumbromide;
smpt.: 111-113° C.
- XXVII. N-aminoiminomethyl-S-(2-broomethyl)-isothiuroniumbromide;
15 smpt.: 129-131° C.
- XXVIII. N-aminoiminomethyl-S-(3-broompropyl)-isothiuroniumbromide;
smpt.: 127-129° C.
- XXIX. N-aminoiminomethyl-S-(3-hydroxypropyl)-isothiuroniumbromide;
smpt.: 132-135° C.
- 20 XXX. N-aminoiminomethyl-S-(3-mercaptopropyl)-isothiuroniumbromide;
smpt.: 141-142° C.
- XXXI. N-aminoiminomethyl-S-propargylisothiuroniumbromide;
smpt.: 131-133° C.

Voorbeelden XXXII-XL

- 25 Tewerkgaande volgens voorbeeld XX worden de
volgende verbindingen bereid:
- XXXII. N-aminoiminomethyl-N'-methyl-S-(2-hydroxyethyl)-isothiuroniumbromide; smpt.: 147-148° C.
- XXXIII. N-aminoiminomethyl-N'-ethyl-S-(2-chloorethyl)-isothiuroniumbromide; smpt.: 143-144° C.
- 30 XXXIV. N-aminoiminomethyl-N'-ethyl-S-allylisothiuroniumchloride;
smpt.: 138-139° C.
- XXXV. N-aminoiminomethyl-N'-isopropyl-S-(3-chloorpropyl)isothiuroniumbromide;

8520077

roniumbromide; smpt.: 140-142° C.

XXXVI. N-aminoiminomethyl-N'-isopropyl-S-methallylisothiuronium-chloride; smpt.: 138-139° C.

5 XXXVII. N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexyl-S-n-propylisothiuronium-bromide; smpt.: 133-135° C.

XXXVIII. N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexyl-S-methallylisothiuronium-chloride; smpt.: 130-132° C.

IXL. N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexyl-S-glycidylisothiuronium-bromide; smpt.: 143-145° C.

10 XL. N-aminoiminomethyl-N'-cyclohexyl-S-benzylisothiuronium-chloride; smpt.: 147-149° C.

De smeltpunten en IR-spektra van de verbindingen met de formule 1 zijn in onderstaande tabel H vermeld.

Tabel H

	R ₂	R ₁	X	Smpt. ° C	Karakteristieke pieken in het IR-spektrum
15	H	methyl	J	124-125	3300, 3120, 1685, 1570
	H	n-propyl	Br	122-124	3300, 3120, 2925, 2850, 1685, 1570, 730
20	H	allyl	Br of Cl	123-125	3290, 3260, 3160, 3105, 1640, 1605, 1550, 1375, 1090, 980, 910, 705, 650
25	H	2-chloorethyl	Br	142-143	3300, 3110, 2925, 1640, 920, 720
	H	1-chloor-2-hydroxy-propyl	Br	118-119	3300, 3110, 3000, 2850, 1685, 1610, 720
	H	3-chloorpropyl	Br	129-131	3300, 3275, 3165, 3105, 2900, 2825, 1680, 695
30	H	2-hydroxyethyl	Cl	134-136	3310, 3280, 3110, 3000, 2990, 1675, 1610
	H	glycidyl	Br	138-139	3300, 3275, 3110, 3000, 1690, 1600, 865
35	H	benzyl	Cl	159-161	3290, 3280, 3115, 3005, 1680, 1590, 1485, 755

8520077

Tabel H (vervolg)

	R ₂	R ₁	X	Smpt. °C	Karakteristieke pieken in het IR-spektrum
	H	ethyl	Br	123-124	3300, 3120, 1685, 1570
5	H	isopropyl	Br	120-122	3300, 3120, 1680, 1380, 1365
	H	n-butyl	Br	116-118	3315, 3300, 3210, 3180, 2850, 1690, 1450
10	H	isoamyl	Br	111-113	3305, 3300, 3205, 3175, 2960, 2845, 1695, 1470
	H	2-broomethyl	Br	129-131	3300, 3205, 2910, 1670, 1090, 715
15	H	3-broompropyl	Br	127-129	3305, 3215, 2920, 1665
	H	3-mercaptopropyl	Br	141-142	3320, 3305, 3210, 3180, 2920, 2570, 1690
20	H	propargyl	Br	131-133	3310, 3300, 3200, 2180, 1680
	methyl	allyl	Cl	137-139	3305, 3290, 2960, 2690, 1640
	methyl	2-hydroxyethyl	Br	147-148	3585, 3300, 3285, 1680, 1375, 1360
25	ethyl	2-chloorethyl	Br	143-144	3305, 3285, 2965, 1660, 765
	ethyl	allyl	Cl	138-139	3310, 3300, 3210, 3180, 1650, 990, 905
30	iso-propyl	allyl	Cl	134-135	3305, 3295, 3200, 3170, 1655, 985, 895
	iso-propyl	methallyl	Cl	138-139	3305, 3295, 3200, 3175, 1650, 890
	iso-propyl	3-chloorpropyl	Br	140-142	3320, 3300, 3195, 3160, 1690, 775
35	cyclo-hexyl	allyl	Cl	129-130	3315, 3305, 3200, 3170, 2830, 1695, 985, 900
	H	3-hydroxypropyl	Br	132-135	3590, 3300, 3220, 2925, 1680

8520077

Tabel H (vervolg)

	R ₂	R ₁	X	Smpt. ° C	Karakteristieke pieken in het IR-spektrum
5	cyclo- hexyl	n-propyl	Br	133-135	3320, 3300, 3210, 3175, 2925
	cyclo- hexyl	methallyl	Cl	130-132	3315, 3300, 3215, 3180, 885
10	cyclo- hexyl	glycidyl	Br	143-145	3325, 3315, 3210, 3190, 1690, 870
	cyclo- hexyl	benzyl	Cl	147-149	3300, 3275, 3120, 3000, 1675, 1590, 750.

Voorbeeld XLI

Vervaardiging van tabletten en dragees

- 15 Tabletten en dragees worden vervaardigd in een persmachine voorzien van een automatische toevoer. De werkzame verbinding wordt tevoren gegraneleerd met geschikte hulpmiddelen volgens een droge of natte methode. Nat gegraneleerd worden de korrels bij voorkeur in vakuo gedroogd. Om tabletten of drageekernen te
- 20 vervaardigen worden de korrels door een passende metaalvrije zeef gedwongen. Om de korrels te verkrijgen wordt bij voorkeur granulatumsimplex (Pharmacopiea) of andere geschikte samenstelling gebruikt. 30 mg werkzaam bestanddeel bevattende tabletten en drageekernen worden vervaardigd en 70 mg drager (bijvoorbeeld granulatumsimplex)
- 25 wordt toegevoegd.

Voorbeeld XLII

Vervaardiging van capsules

- Voor het vervaardigen van capsules wordt bij voorkeur een automatische afvulmachine gebruikt. Het werkzaam be-
- 30 standdeel wordt met geschikte hulpmiddelen (bijvoorbeeld granulum simplex) of een of andere andere inerte toevoeging gegraneleerd. De korrels worden tot een passende deeltjesgrootte verkleind, gezeefd en capsules worden ermee afgevuld. De capsules bevatten 30 mg

8520077

werkzaam bestanddeel.

Voorbeeld XLIII

Vervaardiging van poederampulles

Voor het vervaardigen van poederampulles worden
5 geen afzonderlijke hulpmiddelen gebruikt. Het gehalte werkzaam
bestanddeel in poederampulles bedraagt tot 10 of 20 mg. Oplosmiddel-
ampulles bevatten 1 of 2 ml gedestilleerd water of een fysiologische
zoutoplossing. Het verdient de voorkeur om te verdunnen met ten
minste 100 ml infuus en om de inhoud van de ampulles meteen na het
10 oplossen te gebruiken.

Voorbeeld XLIV

N-aminoiminomethyl-S-methallylisothiuroniumbromide

14,9 g N-aminoiminomethyl-thioureumcarbonaat
wordt gesuspenderd in 50 ml absolute ethanol. Aan de suspensie
15 wordt 16,1 g methallylbromide toegevoegd en het reaktiemengsel
wordt 30 minuten gerefluxt. Na filtreren wordt het oplosmiddel in
vakuo afgedestilleerd. Aldus wordt 21 g van een honingachtig pro-
dukt verkregen, dat bij staan kristalliseert.

Voorbeeld XLV

20 N-aminoiminomethyl-N'-allyl-S-allylisothiuroniumbromide

17,6 g N-aminoiminomethyl-N'-allylthioureum-
carbonaat wordt gesuspenderd in 50 ml absolute ethanol. Aan de sus-
pensie wordt 14,5 g allylbromide toegevoegd en het mengsel wordt
1 uur onder heftig roeren gerefluxt. Het reaktiemengsel wordt dan
25 afgefiltreerd en het oplosmiddel wordt in vakuo verwijderd. Aldus
wordt 23 g viskeus olieachtig produkt verkregen.

Voorbeeld XLVI

N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuroniumchloride

Een mengsel van 4,2 g dicyaandiamide, 20 ml
30 met chloorwaterstofzuur verzadigde ethanol en 3,7 g allylmercaptan
wordt langzaam en onder heftig roeren verwarmd tot koken. Na 3 uren
refluxen wordt het reaktiemengsel afgekoeld tot omgevingstempla-
tuur. De gevormde kristallen worden afgefiltreerd en met ethanol

8520077

gewassen. Aldus wordt 7 g titelverbinding met een smeltpunt van 125-127° C verkregen.

8520077

Conclusies

1. Werkwijze voor het bereiden van verbindingen en zouten met de formule 1 op het formuleblad, waarin
- 5 R_1 C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-6} cycloalkyl, aralkyl of aryl voorstelt, welke groepen eventueel door een of meer hydroxygroepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen gesubstitueerd zijn,
- R_2 waterstof, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl of C_{3-6} cycloalkyl voorstelt, en
- 10 X een anorganisch of organisch anion voorstelt, door
- a) reactie van een verbinding met de formule 2, waarin R_2 de bovenaangegeven betekenis heeft, of een geschikt zout daarvan, met een alkyleringsmiddel, waarmee de groep R_1 ingevoerd kan worden, bij
- 15 voorkeur een verbinding met de formule R_1-Y , waarin R_1 de bovenaangegeven betekenis heeft en Y een verwijderbare groep, bij voorkeur een halogeenatoom, voorstelt, of
- b) reactie van een verbinding met de formule 3 met een thioalkohol met de formule R_1-SH , waarin R_1 de bovenaangegeven betekenis heeft
- 20 en desgewenst omzetting van een verbinding met de formule 1 in een zout door reactie met een zuur met de formule HX, waarin X de bovenaangegeven betekenis heeft.
2. Werkwijze volgens conclusie 1a), waarbij als uitgangsverbinding met de formule 2 een zout daarvan, bij voorkeur
- 25 een carbonaat, wordt gebruikt.
3. Werkwijze volgens conclusie 1a) of 2, waarbij als alkyleringsmiddel een alkylhalogenide of dialkylsulfaat wordt gebruikt.
4. Werkwijze volgens conclusie 1a), 2 of 3,
- 30 waarbij de reactie wordt uitgevoerd in een organisch oplosmiddel, bij voorkeur een alcohol, alifatisch keton, nitril en/of ether.
5. Werkwijze volgens conclusie 1b) voor het bereiden van verbindingen met de formule 4, waarin R_1 de in conclu-

8520077

sie 1 aangegeven betekenis heeft, waarbij de reaktanten in equimoleculaire hoeveelheid worden gebruikt of de thioalkohol met de formule R_1-SH in overmaat wordt gebruikt.

6. Farmaceutische preparaten, die als werkzaam bestanddeel ten minste een verbinding of zout daarvan met de formule 1, waarin

R_1 C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-6} cycloalkyl, aralkyl of aryl voorstelt, welke groepen eventueel door een of meer hydroxygroepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen zijn gesubstitueerd,

R_2 waterstof, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl of C_{3-6} cycloalkyl voorstelt, en

X een anorganisch of organisch anion voorstelt, in de vorm van de vrije base of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan bevatten, samen met geschikte, inerte farmaceutische dragers en/of excipiëntia.

7. Farmaceutische preparaten met immunostimulerende werking volgens conclusie 6, die als werkzaam bestanddeel ten minste een verbinding of zout met de formule 1, waarin R_1 , R_2 en X de in conclusie 6 aangegeven betekenis hebben, in de vorm van de vrije base of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan, bevatten.

8. Farmaceutische preparaten met cytostatische werking volgens conclusie 6, die als werkzaam bestanddeel ten minste een verbinding of zout met de formule 1, waarin R_1 , R_2 en X de in conclusie 6 aangegeven betekenis hebben, in de vorm van de vrije base of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan, bevatten.

9. Farmaceutische preparaten volgens een der conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-allylisoathiuroniumzout bevatten.

10. Farmaceutische preparaten volgens een der conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-(2-halogeeneethyl)-isoathiuroniumzout bevatten.

11. Farmaceutische preparaten volgens een der

8520077

conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-methylisothiuroniumzout of N-aminomethyl-S-ethylisothiuroniumzout bevatten.

12. Farmaceutisch preparaten volgens een der
5 conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-propylisothiuroniumzout bevatten.

13. Farmaceutische preparaten volgens een der
conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuroniumhalogenide bevatten.

10 14. Farmaceutische preparaten volgens een der
conclusies 6-8, die als werkzaam bestanddeel een N-aminoiminomethyl-S-(2-chloorethyl)-isothiuroniumhalogenide bevatten.

15. Verbindingen en zouten met de formule 1,
waarin

15 R_1 een C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-6} -
cycloalkyl, aralkyl of aryl voorstelt, welke groepen eventueel door
een of meer hydroxygroepen, mercaptogroepen en/of halogeenatomen
zijn gesubstitueerd,

R_2 waterstof, C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl
20 of C_{3-6} cycloalkyl voorstelt, en

X een anorganisch of organisch anion voorstelt,
met dien verstande, dat wanneer R_2 waterstof voorstelt R_1 geen
methyl, ethyl of benzyl voorstelt.

25 16. N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuronium-
zouten.

17. N-aminoiminomethyl-S-(2-halogeeneethyl)-iso-
thiuroniumzouten.

18. N-aminoiminomethyl-S-propylisothiuronium-
zouten.

30 19. N-aminoiminomethyl-S-allylisothiuronium-
halogeniden.

20. N-aminoiminomethyl-S-(2-chloorethyl)-iso-
thiuroniumhalogeniden.

8520077

21. N-aminoiminomethyl-S-(1-chloor-2-hydroxypropyl)-isothiuroniumzouten.
22. N-aminoiminomethyl-S-(3-chloorpropyl)-isothiuroniumzouten.
- 5 23. N-aminoiminomethyl-S-(2-hydroxyethyl)-isothiuroniumzouten.
24. N-aminoiminomethyl-S-glycidylisothiuroniumzouten.
- 10 25. N-aminoiminomethyl-N'-alkyl-S-allylisothiuroniumzouten.
26. Verbindingen met de formule 1, bereid volgens de werkwijze volgens een der conclusies 1-5.
27. Werkwijze zoals beschreven in de beschrijving en voorbeelden.

8520077

