



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1298/82

(51) Int.Cl.6

C 07 F 9/6584

(22) Indleveringsdag: 23 mar 1982

(41) Alm. tilgængelig: 25 sep 1982

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 30 jun 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 24 mar 1981 DE 3111428

(73) Patenthaver: *ASTA Pharma Aktiengesellschaft; Weismüllerstrasse 45; D-W-6000 Frankfurt am Main 1, DE

(72) Opfinder: Gerhard *Scheffler; DE, Ulf *Niemeier; DE, Norbert *Brock; DE, Joerg *Pohl; DE

(74) Fuldmægtig: Ostenfeld Patentbureau A/S

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af oxazaphosphorin-4-thioalkansulfonsyrer og neutrale salte deraf

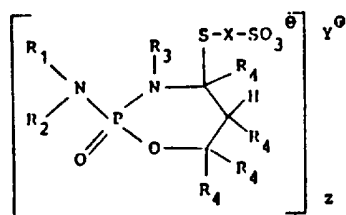
(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 4004/81

(57) Sammendrag:

1298 - 82

Oxazaphosphorinsyre-4-thio-alkansulfonsyrer og neutrale salte deraf med formlen (I)

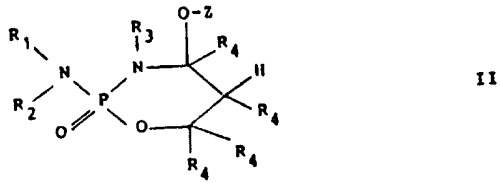


I

hvor R_1 , R_2 og R_3 , som kan være ens eller forskellige, betegner hydrogen, methyl, ethyl, 2-chlorethyl eller 2-methansulfonyloxyethyl, og hvor mindst to af disse grupper er 2-chlorethyl og/eller 2-methansulfonyloxyethyl, R_4 betegner hydrogen eller methyl, X betegner en ligekædet eller forgrenet C_{2-6} -alkylengruppe, som ved alkylenkædens 1-, 2-, 3- 4- eller 5-stillede carbonatom kan indeholde en mercapto-gruppe, og Y^+ betegner hydrogenkationen, en alkalimetall- eller jordalkalimetalkation, guanidinium-, morpholinium- eller cyclohexylammoniumkationen eller den kation, som afledes af en amin med formel $NR_5R_6R_7$, hvori grupperne R_5 til R_7 er ens eller forskellige og betegner hydrogen, C_{1-2} -alkylgrupper eller oxyethylgrupper, eller hvori Y^+ betegner ethylendiammoniumkationen $H_3N^+-CH_2CH_2-N^+H_3$ eller piperazoniumkationen, og z er 1, når Y^+ er en enbasiskation

fortsættes

eller 2, når Y^+ er en tobasis-kation eller kationen af en forbindelse med 2 enbasiske kationer, fremstilles ved, at en 4-hydroxy- eller 4-C₁₋₄-alkoxy-oxazaphosphorin med formel (II)



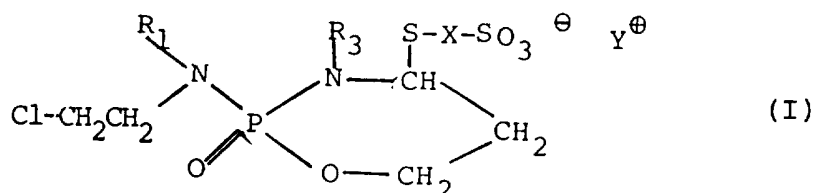
omsættes med en forbindelse med formel (III)



Forbindelserne (I) besidder interessante karcinogene virkninger.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af de hidtil ukendte oxazaphosphorin-4-thioalkansulfonsyrer og neutrale salte deraf med den almene formel

5



10

hvor R_1 og R_3 , som er ens eller forskellige, betegner hydrogen eller $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$,

X betegner en C_{2-3} -alkylengruppe, og

Y betegner hydrogen, cyclohexylammonium, natrium, ammonium eller

15 guadinium.

Analogifremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

Som egnede opløsningsmidler kommer vand, alkoholer, især alkanoler med 1-6 C-atomer såsom methanol, ethanol, propanol eller isobutanol, 20 alkylketoner med hver 1-4 C-atomer, såsom især acetone, methylethylketon, dimethylformamid (DMF), hexamethylphosphorsyretriamid, halogenerede carbonhydrider med 1-3 C-atomer, såsom chloroform, ethylendi- 25 chlorid, tetrahydrofuran, diethylether eller lignende opløsningsmidler eller blandinger af flere sådanne opløsningsmidler i betragtning. Reaktionen gennemføres fortrinsvis ved temperaturer i området fra -30°C til $+80^\circ\text{C}$, fortrinsvis -30°C til $+60^\circ\text{C}$, især ved -30°C til 40°C , dvs. eventuelt under afkøling, ved stuetemperatur eller under opvarmning. Omsætningen kan gennemføres i nærværelse af en sur katalysator, såsom en 30 Lewisyre, såsom AlCl_3 , ZnCl_2 eller TiCl_4 .

Kationen Y^+ af et sulfonat med formel (I) kan udbyttes mod en anden kation, f.eks. på en tilsvarende ladet ionbytter. Denne udbytning er fordelagtig i de tilfælde, hvor et salt med en bestemt kation Y^+ vanskeligt lader sig fremstille ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. 35 Det ønskede salt kan da udvindes af et andet, let fremstilleligt salt med højt udbytte.

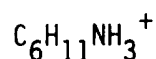
De hidtil ukendte forbindelser med formel (I) isoleres ved hjælp af sædvanlige oparbejdningsmetoder for sådanne produkter, især ved krystal-

lisation, fældning eller chromatografisk rensning, såsom især på Sephadex. Strukturbestemmelse sker ved hjælp af smeltepunkt, tyndtlagschromatografi, elementaranalyse eller IR- og NMR-spektroskopi.

De ved den omhandlede fremgangsmåde som udgangsmaterialer anvendte forbindelser er kendte, kan anvendes krystallinsk eller som råprodukter og kan, som følger, på kendt måde syntetiseres:

4-hydroxy-oxazaphosphoriner fås ved reduktion af 4-hydroperoxyderivaterne (f.eks. A. Takamizawa o.a., J.Amer.Chem.So.95, 589 (1973) og DE-OS 2 317 178). 4-alkoxy-oxazaphosphorin dannes under sur katalyse fra hydroxyderivaterne i den tilsvarende alkohol. Thiolerne vindes ved omsætning af det tilsvarende natriumbromalkansulfonat med thiourinstof til thiuroniumsaltet og dets spaltning med ammoniak samt overføring i det ønskede salt af mercaptoalkansulfonatet.

Såfremt Y^+ er en cyclohexylammoniumkation, drejer det sig om følgende kation:



Blandt de omhandlede oxazaphosphorin-derivater med formel (I) skal forstås alle fire mulige stereoisomere, d.v.s. de to racemiske cis-isomere (2rs, 4rs) og de to racemiske trans-isomere (2rs, 4rs) og de fire adskilte optisk aktive cis-isomere (2 r, 4s og 2s, 4r) samt trans-isomerene (2r, 4r og 2s, 4s) og blandinger deraf. Cis/trans-blandingerne kan på kendt måde, fortrinsvis ved fraktioneret krystallisation, adskilles. Optisk aktive forbindelser kan opnås ved hjælp af sædvanlige metoder til racematspaltning, eksempelvis ved fraktioneret krystallisation af de diastereomere salte af den racemiske sulfonsyre med formel (I) med optisk aktive baser eller eventuelt ved anvendelse af optisk aktive udgangsprodukter med formel (II) ved syntesen.

I almindelighed opstår ved syntesen cis/trans-blandinger. Heraf opnår man ved godt krystalliserende forbindelser cis- eller trans-formen, især cis-formen, krystalliseret. Gennemfører man imidlertid omsætningen i vandfrie opløsningsmidler eller i opløsningsmidler med ringe vandindhold, opnår man udelukkende eller ganske overvejende en enkelt form, især cis-formen. Således kan man eksempelvis fremstille den rene cis-form af en ikke- eller dårligt-krystalliserende forbindelse med formel (I) ved, at der sættes en acetone-opløsning af forbindelsen med formel (II) til en vandig opløsning af forbindelsen med formel (III) ved

temperaturer mellem -30 og + 20°C, og efter endt omsætning omkrystalliseres flere gange.

Udgangsforbindelserne med formel (II) kan tilsættes som racemiske cis- og trans-isomere (fremstilling se ovenfor), som optisk aktiv cis- og trans-form og som blandinger deraf. Optisk aktive forbindelser med formel (II) får man eksempelvis fra saltene af de optisk aktive sulfonsyrer (fremstilling se ovenfor), idet de hydrolyseres til de tilsvarende optisk aktive 4-hydroxy-oxazaphosphoriner med formel (II) (i vand, eksempelvis mellem 0 og 50°C, især 5 til 30°C), og den frigjorte thiol med formel (III) oxideres til disulfider (eksempelvis ved hjælp af iod eller hydrogenperoxid i vand). En yderligere fremgangsmåde går eksempelvis ud fra et isoleret optisk aktivt cyclophosphamid-derivat ifølge eksempel 16 eller 33 til dansk patentansøgning nr. 4004/81 og hydrolyserer denne forbindelse til optisk aktivt 4-hydroxy-cyclophosphamid. Ved en yderligere fremgangsmåde omsættes eksempelvis optisk aktivt cyclophosphamid (DE-OS 29 44 106) ved en beskrevet fremgangsmåde (Peter et al, Cancer Treatment Reports 60, 429 (1976) til optisk aktivt 4-hydroxy-cyclophosphamid.

Til racematspaltningen kommer eksempelvis som optisk aktive baser f.eks. 1-phenylethylamin, brucin, chinidin, stryknin og cinchonin samt yderlige baser og metoder på tale, som er beskrevet i "Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds", Vol. 2, Paul Newman, 1981, Verlage Optical Resolution Information Center i Riverdale, USA. Disse optisk aktive baser kan også anvendes ved analogifremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvor en forbindelse med formel (II) omsættes med en forbindelse med formel (III), hvori Y er den optisk aktive base. I dette tilfælde skal denne optisk aktive base på sædvanlig måde udbyttes mod hydrogen eller en anden til basen Y svarende blandt de allerede angivne definitioner af Y.

Forbindelserne med formlen I kan anvendes til bekæmpelse af cancer og til immunsuppression. De besidder en stærk antitumor-virkning. De udmærker sig ved en høj aktivitet ved parenteral og ved oral applikation samt ved ringe almene toksiske virkninger. De besidder in vivo en høj karcinotoxisk selektivitet og in vitro en høj cytotoxisk specificitet.

Til bestemmelse af den carcinotoxiske virkning afprøvedes forbindelserne dyreeksperimentelt over for en række tumorer af forskellig chemoresistens. Til vurderingen bestemtes de gennemsnitlige kurativt virksomme doser (DC 50 [mg/kg] ved hjælp af Probit-analysen af forholdet

mellem logaritmerne til doserne og hyppigheden af helbredte og overlevende forsøgsdyr. Som sammenligningsstof, der i kemisk struktur står de omhandlede forbindelser nær, tjente den i handelen forekommende forbindelse cyclophosphamid.

5 I tilfælde af den lymfatiske leukæmi L5222 hos rotten (stamme: BD IX) lå den gennemsnitlige kurative dosis - ved én gang intravenøs applikation på 5. dagen efter inpodning af leukæmien - for forbindelserne med formlen I ligesom for cyclophosphamid på 1,5 mg pr. kg.

Ved det chemosensitive Yoshida-Ascites-Karcinosarkom (Linie AH 13) 10 i rotten (stamme; Sprague-Dawley) lå denne DC50 for forbindelserne med formlen I ligesom for sammenligningsforbindelsen cyclophosphamid på 1 mg/kg.

På analog måde undersøgte den toksiske virkning, hvorved der ud fra forholdet mellem logaritmerne til doserne og dødshyppigheden bestemtes 15 en gennemsnitlig letal dosis (DL 50 [mg/kg]).

For forbindelserne med formlen I ligger denne DL50 ved en enkelt gangs intravenøs applikation på 300 mg/kg. Den til sammenligning bestemte gennemsnitlige letale dosis for cyclophosphamid ved en enkelt gangs intravenøs indgivelse ligger på 244 mg/kg. Forbindelserne med formlen I 20 besidder derfor en stort set 20% ringere akut toxicitet eller ved samme kurative virkning en tilsvarende større terapeutisk bredde.

Til undersøgelse af den cytotoxiske specificitet in vitro inkuberes i hvert tilfælde ca. 3 gange 10^7 sterilt vundne celler af den chemoresistente Yoshida-ascites-carcinosarkom (Linie AH 13, stamme ASTA) med 25 stigende koncentrationer af forbindelserne med formlen I i to timer ved 37°C, og efter flere ganges udvanding implanteret i bughulen på ubehandlede værtsdyr. Af forholdet mellem logaritmerne til koncentrationerne og hyppigheden af udviklede tumorer bestemtes ved hjælp af Probit-analysen de gennemsnitlige cytotoxiske doser (CE 50 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]). Under disse forsøgs- 30 betingelser ligger CE50 for forbindelsen ifølge eksempel 1 på ca. 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ifølge eksempel 4 på 3-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ifølge eksempel 5 på 3-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ og ifølge eksempel 7 på ca. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Da cyclophosphamid som nærmest inaktivt transportform-forbindelse ikke udviser nogen cytotoxisk aktivitet, anvendtes til disse undersøgelser som sammenligningsforbindelse den aktive primær-metabolit 4-hydroxycyclophosphamid, der dannes i kroppen under en enzymatisk aktivering, 35 overvejende i leveren. For denne sammenligningsforbindelse ligger den gennemsnitlige cytotoxiske koncentration på 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel 1

5 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

5,6 g (20 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid (d.v.s. 2-(bis-(2-chlor-ethyl)-amino)-4-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid) og 4,8 g (20 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat opløstes i 100 ml destilleret vand, tilsattes noget trichloreddikesyre og henstod
10 3 dage ved 0°C i køleskab. Derefter fjernedes opløsningsmidlet i høj-
vakuum, remanensen optoges i acetone, indampedes på ny, udkrystalli-
seredes fra acetone og omkrystalliseredes fra isopropanol.

Udbytte: 7,2 g (72% af det teoretiske), smeltepunkt: 149-151°C
(cis-form).

15

Eksempel 2

2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

2,9 g (10 mmol) 2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-methoxy-tetrahydro-
20 2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid og 2,4 g (10 mmol) cyclohexylammonium-2-
mercaptoethansulfonat opløstes sammen med noget trichloreddikesyre i 10
ml dimethylformamid og opbevaredes 20 timer ved -25°C. Efter yderligere
3 timers henstand ved 0°C tilsattes ether til begyndende uklarhed, pro-
duktet blev udrevet, krystalliseret blev efter 20 timers henstand ved
25 0°C suget fra, udvasket og tørret.

Udbytte: 4,7 g (94% af det teoretiske), smeltepunkt 145°C (dek.)
Omkrystallisation fra alkohol/ether, smeltepunkt 149-151°C (cisform).

Eksempel 3

30 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

1,4 g (5 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 1,2 g (5 mmol) cyclo-
hexylammonium-2-mercaptoethansulfonat opløstes sammen med et spor af
trichloreddikesyre i 25 ml methanol og henstod natten over ved -25°C i
35 køleskab. Dernæst indampedes reaktionsopløsningen til ca. 5 ml, ether
tilsattes til begyndende uklarhed, og der blev udrevet. Krystalliseret
sugedes fra efter 20 timers henstand ved 0°C, blev udvasket og tørret.

Udbytte: 2,1 g (84% af det teoretiske), smeltepunkt: 143-145⁰C
(cis-form).

Eksempel 4

5 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, natriumsalt

2,5 g (5 mmol) cyclohexylammonium-2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-
2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thio-ethansulfonat op-
løstes i 25 ml oxygenfrit vand og tilsattes over en med natriumioner
10 ladet kationbyttersøjle fra fa. Merck. Eluatet blev opsamlet over
nitrogen, frysetørret og den faste remanens tørret over phosphorpentoxid
i vakuum.

Udbytte: 1,9 g (91% af det teoretiske), smeltepunkt: 78-83⁰C
(dek.), rf-værdi: 0,61 (elueringsmiddel: eddikeester/isopropanol/1n
15 eddikesyre (5:3:2)).

Eksempel 5

20 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, ammoniumsalt

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 1,6 g (10 mmol) ammo-
nium-2-mercaptoethansulfonat opløstes sammen med en katalytisk mængde
trichloreddikesyre i 50 ml vand og henstod 3 dage ved 0⁰C i køleskab.
Dernæst afdestilleredes vandet i højvakuum, remanensen opsamledes 2
gange i acetone og inddampedes i vakuum. Omkrystallisation fra acetone/-
25 ether.

Udbytte: 3,9 g (93% af det teoretiske), smeltepunkt: 131-133⁰C
(cisform).

Eksempel 6

30 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-
phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, ammoniumsalt

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 1,6 g (10 mmol) ammo-
nium-2-mercaptoethansulfonat opløstes med en katalytisk mængde tri-
chloreddikesyre i 10 ml dimethylformamid og opbevarede 20 timer i køle-
35 skab ved -25⁰C. Efter yderligere 5 timer ved 0⁰C tilsattes ether til
begyndende uklarhed og produktet blev udrevet. Krystalliseret sugedes
fra efter 1 dag ved 0⁰C, udvaskedes, tørredes og omkrystalliseredes fra
n-propanol.

Udbytte: 3,2 g (77% af det teoretiske) af cis-formen, smeltepunkt: 132⁰C.

Eksempel 7

5 3-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]-propansulfonsyre, natriumsalt

5,4 g (20 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 5,2 g (20 mmol) cyclohexylammonium-3-mercaptopropansulfonat opløstes i 100 ml vand, tilsattes noget trichloreddikesyre og henstod 1 dag ved 0⁰C. Dernæst indampedes reaktionsblandingen i vakuum, den koncentrerede remanens sattes til en med natriumioner ladet kationbyttersøjle, eluatet indampedes i vakuum, remanensen opløstes i tør ethanol, filtreredes og fældedes med ether.

Udbytte: 5,5 g (63% af det teoretiske), smeltepunkt: 75-79⁰C,
15 rf-værdi: 0,64 (elueringsmiddel: eddikester/isopropanol)ln eddikesyre (5:3:2)).

Eksempel 8

20 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, natriumsalt

1,6 g (5 mmol) 2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-ethoxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid og 0,8 g (5 mmol) natrium-2-mercaptoethansulfonat i 10 ml dimethylformamid tilsattes et spor trichloreddikesyre og opbevaredes natten over ved -25⁰C. Dernæst sattes 20 ml ether til reaktionsopløsningen. Remanensen sugedes efter 20 timers henstand ved 0⁰C fra, vaskedes og tørredes.

Udbytte: 1,5 g (71% af det teoretiske), smeltepunkt: 145-150⁰C (dek.), rf-værdi: 0,56.

30 Eksempel 9

2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre

0,8 g (3,0 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid i 3 ml vand tilsattes under isvandafkøling 420 mg (3,0 mmol) 2-mercaptoethansulfonsyre. Efter 35 1 time indampedes i højvakuum og krystalliseredes.

Udbytte: 1,1 g (92% af det teoretiske), smeltepunkt: 75-78⁰C.

Eksempel 102-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre

2,0 g (4 mmol) cyclohexylammonium-2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-
 5 2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonat opløses
 i en smule vand og tilsættes over en med hydrogenioner ladet kation-
 byttersøjle under afkøling til 4⁰C. Eluatet frysetørredes dernæst og
 omkrystalliseredes fra dimethylformamid/chloroform.

Udbytte: 1,2 g (75% af det teoretiske), smeltepunkt: 75-78⁰C,
 10 rf-værdi: 0,58 (elueringsmiddel: eddikeester/isopropanol/1n eddike-
 syre (5:3:2)).

Eksempel 112-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, ammoniumsalt

720 mg (1,8 mmol) 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-
 2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsyre opløstes i en smule
 vand, neutraliseredes med ammoniak og tilsættes 4 ml acetone. Reaktions-
 opløsningen henstod natten over ved -25⁰C. Krystalliseredes fra og
 20 omkrystalliseredes fra methanol/acetone.

Udbytte: 530 mg (71% af det teoretiske), smeltepunkt: 133-134⁰C
 (cis-form).

Eksempel 122-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-6-methyl-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

1,45 g (5 mmol) 2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-hydroxy-6-methyl-
 tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid og 1,2 g (5 mmol) cyclohexyl-
 ammonium-2-mercaptoethansulfonat opløstes i 5 ml vand og 5 ml acetone,
 30 gjordes sur med trichloreddikesyre og henstod 20 timer ved 0⁰C. Dernæst
 filtreredes, filtratet inddampedes skånsomt i vakuum, reanensen opsam-
 ledes og inddampedes to gange i acetone. Dernæst opløstes reanensen i
 acetone, fældedes med ether, vaskedes med ether og tørredes.

Udbytte: 1,4 g (56% af det teoretiske), smeltepunkt: 120-125⁰C
 35 (dek.), rf-værdi: 0,61.

Eksempel 13

3-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]-2-methyl-propansulfonsyre, natriumsalt

277 mg (1 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 192 mg (1 mmol) natrium-3-mercapto-2-methyl-propansulfonat opløstes i 4 ml vand, tilsattes et spor trichloreddikesyre og henstod 20 timer ved 0°C. Efter inddampning i vakuum opløstes remanensen to gange i tør ethanol og inddampedes på ny og fældedes i alkohol/ether.

Udbytte: 420 mg (86% af det teoretiske), rf-værdi: 0,61.

10

Eksempel 14

2-[3-(2-chlorethyl)-2-(2-chlorethylamino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

277 mg (1 mmol) 3-(2-chlorethyl)-2-(2-chlorethylamino)-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid og 240 mg (1 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat opløstes i 4 ml vand, tilsattes et spor trichloreddikesyre og opbevarede 20 timer ved 0°C. Den i vakuum inddampede reaktionsopløsning opløstes to gange i ethanol og inddampedes igen. Dernæst opsamledes i ethanol og fældedes med ether.

Udbytte: 340 mg (68% af det teoretiske), smeltepunkt: 115-120°C (dek.), rf-værdi: 0,56.

20

Eksempel 15

2-[3-(2-chlorethyl)-2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsyre, cyclohexylammoniumsalt

340 mg (1 mmol) 3-(2-chlorethyl)-2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-hydroxytetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid og 240 mg (1 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat i 2 ml dimethylformamid tilsattes et spor af trichloreddikesyre og opbevarede 2 dage ved -25°C. Dernæst fældedes reaktionsblandingen med 20 gange mængden af ether. Remanensen vaskedes og tørredes.

30

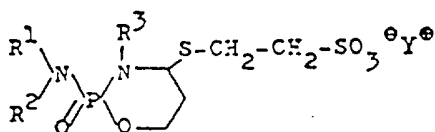
Udbytte: 400 mg (71% af det teoretiske), smeltepunkt: 102-107°C (dek.), rf-værdi: 0,63.

Analogt med de foregående eksempler fremstilledes yderligere følgende forbindelse

35

Eksempel 16

5



10

R ¹	R ²	R ³	Y ⁺	Smeltepunkt
Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	$\begin{array}{c} \text{NH}_2-\text{C}-\text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	132-134°C

15

Eksempel 17

20 2-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]ethansulfonsyre, cis-natriumsalt

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid i 10 ml acetone tilsattes 1,3 g (8 mmol) natrium-2-mercaptoethansulfonat i 2 ml vand og opbevare-des 3 timer ved 0°C. Dernæst inddampedes reaktionsblandingen i vakuum
25 ved 25°C, remanensen opsamledes i tør acetone og tilsattes koldt tør ether til begyndende uklarhed. Ved inddampning af opløsningen i vakuum dannedes et bundfald.

Udbytte: 1,5 g (44% af det teoretiske) af cis-isomeren, smeltepunkt: 83-85°C.

30 Ved omkrystallisation i acetone fås et i acetone tungt opløseligt produkt.

Eksempel 18

35 3-[2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxaza-phosphorin-4-yl-thio]-propansulfonsyre, guanidiniumsalt

14 g (50 mmol) 4-hydroxycyclophosphamid og 11 g (50 mmol) 3-mer-captopropansulfonsyre, guanidinsalt opløstes i 100 ml ethanol, gjordes sur med trichloreddikesyre og opbevaredes ved 0°C. Efter 20 timer til-

sattes 50 ml ether. Krystalliset sugedes fra efter yderligere 20 timer, udvaskedes og tørredes.

Udbytte: 18,5 g (78% af det teoretiske), smeltepunkt: 128-132°C (dek.).

5

Eksempel 19

Biologisk aktivitet

De ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser besidder en stærk
10 antitumor virkning. De udmærker sig en høj aktivitet ved parenteral og ved oral indgivelse såvel som ved ubetydelige alment toksiske symptomer. In vivo besidder de en høj carcinotoxisk selektivitet.

Til bestemmelse af antitumor virkningen blev stofferne dyre-
eksperimentelt afprøvet på den kemosensitive Yoshida-ascites carcino-
15 sarkom (linie AH 13) hos rotter af Sprague-Dawley-stammen. Til vurdering bestemtes som tidligere anført de gennemsnitlige kurativt virksomme doser (DC50 (mg/kg)) ved hjælp af probit-analyse af forholdet mellem logaritmerne til doser og hyppigheden af helbredte og overlevende forsøgsdyr. Som sammenligningsforbindelse anvendtes ved afprøvningen forbin-
20 delsen ifølge eksempel 1 i dansk patentansøgning nr. 4004/81.

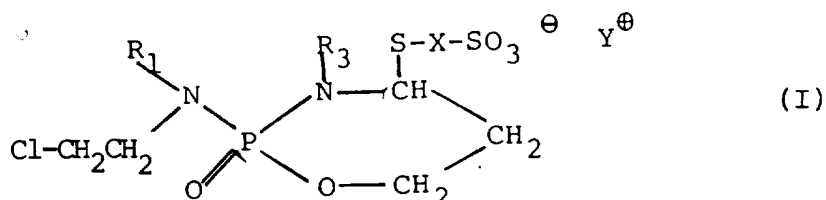
Ved det kemosensitive Yoshida-ascites-carcinosarkom (linie AH 13) hos rotter af Sprague-Dawley-stammen lå DC50 for de i eksempel 1, 4, 5 og 7 omhandlede og ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser på ca. 1 mg/kg.

25 For forbindelsen ifølge eksempel 1 i dansk patentansøgning nr. 4004/81 lå den tilsvarende DC50-værdi på ca. 1,5, hvilket viser, at sammenligningsforbindelsen har en svagere virkning.

PATENTKRAV

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af oxazaphosphorin-4-thio-
alkansulfonsyrer og neutrale salte deraf med den almene formel (I)

5



10

hvor R_1 og R_3 , som er ens eller forskellige, betegner hydrogen eller $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$

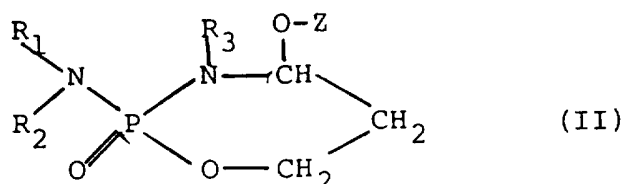
X betegner en C_{2-3} -alkylengruppe,

15 Y betegner hydrogen, cyclohexylammonium, natrium, ammonium eller guanidinium,

KENDETEGNET ved, at man

a) omsætter en 4-hydroxy- eller 4- C_{1-4} -alkoxyoxazaphosphorin med den almene formel (II)

20



25

hvor R_1 , R_2 og R_3 har den samme betydning som i formel (I), og Z betegner hydrogen eller C_{1-4} -alkyl, med en forbindelse med den almene formel (III)

30



hvor X og Y har samme betydning som i formel (I), eller

b) omsætter en forbindelse med formel (II), hvor R_1 , R_2 og R_3 har
35 samme betydning som i formel (I), og Z er hydrogen eller C_{1-4} -alkyl, med en forbindelse med den almene formel (III), hvor X har samme betydning som i formel I, og Y er afledt af en optisk aktiv base, som ikke svarer til den allerede angivne definition af Y , og efter omsætning udbytter

denne anden optisk aktive base med hydrogen eller en base ifølge den allerede angivne definition af Y, hvorefter man om nødvendigt neutraliserer en opnået forbindelse, hvor Y er hydrogen, med en optisk aktiv base, som svarer til den allerede angivne definition af Y.

5 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man, såfremt Y er hydrogen, om ønsket neutraliserer med en sådan ammoniumbase, at Y i produktet med formel (I) betegner ammonium.

 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man, såfremt Y er hydrogen, om ønsket neutraliserer med en sådan natriumbase, at Y i
10 produktet med formel (I) betegner natrium.

 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man, såfremt Y er hydrogen, om ønsket neutraliserer med cyclohexylamin.

 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man, såfremt Y er hydrogen, om ønsket neutraliserer med guanidin.

15 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, at man udbytter kationen Y^+ for et oxazaphosphorin 4-thio-alkansulfonat på en ionbytter med en anden kation Y^+ .