



Ausschlusspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

201 799

Int.Cl.³

3(51) C 07 F 9/65

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 07 F/ 2383 746
(31) P3111428.8

(22) 23.03.82
(32) 24.03.81

(44) 10.08.83
(33) DE

- (71) siehe (73)
(72) SCHEFFLER, GERHARD, DR. DIPL.-CHEM.; NIEMYER, ULF, DR. DIPL.-CHEM.; BROCK, NORBERT, PROF. DR. DR.; POHL, JOERG, DR. DE
(73) ASTA-WERKE, BIELEFELD, DE
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN) 60 549/12/20 1020 BERLIN WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON OXAZAPHOSPHORIN-4-THIOALKANSULFONSAEUREN UND IHRER NEUTRALEN SALZE

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I.

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und ihrer neutralen Salze mit guter Antitumorwirkung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Von den bekannten Verbindungen sind die 4-Hydroxy- sowie die 4-Hydroperoxy-oxazaphosphorine nicht als Arzneimittelwirkstoffe geeignet, während bekannte Oxazaphosphorinwirkstoffe wie Cyclophosphamid oder Trofosfamid erst nach einer metabolischen Aktivierung in der Leber wirksam sind. Demgegenüber benötigen die erfindungsgemäßen Verbindungen keine derartige metabolische Aktivierung und sind daher beispielsweise genauer dosierbar.

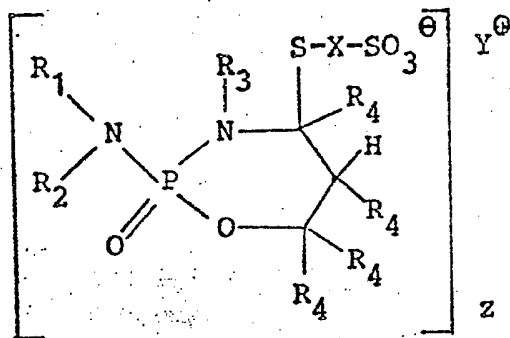
Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist die Schaffung neuer Oxazaphosphorin-Derivate mit hoher Antitumorwirksamkeit und einer verbesserten Verträglichkeit.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

23.MRZ.1982*998370

Die vorliegende Erfindung betrifft die neuen Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I



I

worin

R_1 , R_2 und R_3 , die gleich oder verschieden voneinander sein können, Wasserstoff, Methyl, Ethyl, 2-Chlorethyl oder 2-Methansulfonyloxyethyl darstellen und dabei mindestens zwei dieser Reste 2-Chlorethyl und/oder 2-Methansulfonyloxyethyl sind,

R_4 Wasserstoff oder Methyl ist,

X ein gerad- oder verzweigtkettiges C_{2-6} -Alkylen ist, das eine Mercaptogruppe an dem 1-, 2-, 3-, 4- oder 5-ständigen Kohlenstoffatom der Alkylenkette haben kann,

und

Y^{\oplus} das Wasserstoffkation, ein Alkali- oder Erdalkaliumkation, das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel $NR_5R_6R_7$ ableitet, worin die Reste R_5 bis R_7 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C_1 - C_2 -Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder

worin Y^{\oplus} das Ethylendiammoniumkation $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2-NH_3^{\oplus}$ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y^{\oplus} ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y^{\oplus} ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist.

Aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit und guten Eigenschaften sind dabei diejenigen Verbindungen der Formel I bevorzugt, in der Y^{\oplus} das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel $NR_5R_6R_7$ ableitet, worin die Kette R_5 bis R_7 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C_1 - C_2 -Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder worin Y^{\oplus} das Ethylendiammoniumkation $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2-NH_3^{\oplus}$ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y^{\oplus} ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y^{\oplus} ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist.

Andere günstige Eigenschaften haben auch die Kalium- und Erdalkalisalze der Säuren der Formel I und sind daher bevorzugt.

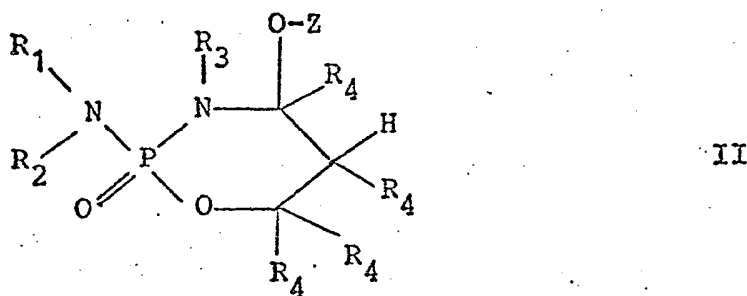
Unter den mit Stickstoffbasen neutralisierten Säuren der Formel I sind ganz besonders bevorzugt die Ammoniumsalze, in denen Y^{\oplus} das NH_4^{\oplus} -Kation ist, die Cyclohexylammoniumsalze, in denen Y^{\oplus} das $C_6H_{11}NH_3^{\oplus}$ -Kation ist, bzw. die Guanidiniumsalze, in denen Y^{\oplus} das $NH_2=C(NH_2)^{\oplus}$ -Kation ist.

Unter den erfindungsgemäßen Salzen ist besonders leicht zugänglich und daher bevorzugt das cis-Natrium-2- $\overline{2}$ -(bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonat und das entsprechende Ammonium-, Cyclohexylammonium- und Kaliumsalz.

Zählung der Stellung der Mercaptogruppe in der Alkylengruppe X beginnt mit dem die Sulfonsäuregruppe tragenden C-Atom.

Von besonderer Bedeutung sind diejenigen Verbindungen der Formel I, in denen R_1 und R_2 die 2-Chlorethylgruppe, R_3 und R_4 Wasserstoff darstellen, X die Ethylengruppe und dabei $z = 1$ und $Y^\oplus = NH_4^\oplus$, $NH_3^\oplus - \text{C}_6\text{H}_5$ oder $NH_2^\oplus = C(NH_2)_2$ oder $X = (CH_2)_3$, $z = 1$, und dabei $Y = NH_2^\oplus = C(NH_2)_2$ ist.

Die erfindungsgemäßen Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I werden erfindungsgemäß dadurch erhalten, daß man ein 4-Hydroxy- oder 4- C_{1-4} -Alkoxy-oxazaphosphorin der allgemeinen Formel II



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C_{1-4} -Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



worin X und Y^\oplus die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben, umgesetzt und, falls Y^\oplus Wasserstoff ist, die erhaltene Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäure mit einer der der anderen Bedeutung von Y^\oplus entsprechenden Base neutralisiert.

Als geeignete Lösungsmittel kommen Wasser, Alkohole, insbesondere Alkanole mit 1-6 C-Atomen wie Methanol, Ethanol, Propanol oder Isobutanol, Alkylketone mit jeweils 1-4 C-Atomen wie insbesondere Aceton, Methyl-ethylketon, Dimethylformamid (DMF), Hexamethylphosphorsäuretriamid, halogenierte Kohlenwasserstoffe mit 1-3 C-Atomen wie Chloroform, Ethylendichlorid, Tetrahydrofuran, Diethylether oder ähnliche Lösungsmittel bzw. Gemische aus mehreren solcher Lösungsmittel in Betracht. Die Reaktion wird bei Temperaturen im Bereich von -60°C und $+80^{\circ}\text{C}$, vorzugsweise -30°C bis $+60^{\circ}\text{C}$, insbesondere bei -30°C bis $+40^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, d.h. gegebenenfalls unter Kühlen, bei Raumtemperatur oder unter Erwärmen. Die Umsetzung kann in Anwesenheit eines sauren Katalysators wie einer anorganischen oder organischen Säure, wie insbesondere Trichloressigsäure oder einer Lewissäure wie AlCl_3 , ZnCl_2 oder TiCl_4 durchgeführt werden.

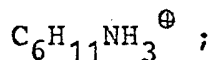
Das Kation Y^{\oplus} eines Sulfonats gemäß Formel I kann gegen ein anderes Kation ausgetauscht werden, z.B. an einem entsprechend beladenen Ionenaustauscher. Dieser Austausch empfiehlt sich in solchen Fällen, wo ein Salz mit einem bestimmten Kation Y^{\oplus} sich schlecht nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellen läßt. Das gewünschte Salz kann so aus einem anderen gut herstellbaren Salz mit hoher Ausbeute gewonnen werden.

Die neuen Verbindungen der Formel I werden durch übliche Aufarbeitungsverfahren für derartige Produkte, insbesondere durch Kristallisation, Fällung oder chromatographische Reinigung wie insbesondere an Sephadex isoliert. Die Struktursicherung erfolgt durch Schmelzpunkt, Dünnschichtchromatographie, Elementaranalyse oder IR- und NMR-Spektralanalyse.

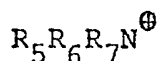
Die im erfindungsgemäßen Verfahren als Ausgangsmaterial verwendeten Verbindungen sind bekannt, können kristallin oder als Rohprodukt eingesetzt werden und lassen sich wie folgt in bekannter Weise synthetisieren:

4-Hydroxy-oxazaphosphorine werden durch Reduktion der 4-Hydroperoxy-Derivate erhalten (z.B. A. Takamizawa u.a., J. Amer. Chem. So. 95, 589 (1973) und DE-OS 2 317 178). 4-Alkoxy-oxazaphosphorin bilden sich unter saurer Katalyse aus den Hydroxyderivaten in dem entsprechenden Alkohol. Die Thiole werden durch die Umsetzung des entsprechenden Natriumbromalkansulfonats mit Thioharnstoff zum Thiuroniumsalz und dessen Spaltung mit Ammoniak und Überführung in das gewünschte Salz des Mercaptoalkansulfonats gewonnen.

Falls Y^{\oplus} ein Alkalikation ist, handelt es sich insbesondere um das Natrium- oder Kaliumsalz; falls Y^{\oplus} ein Erdalkalikation ist, handelt es sich insbesondere um das neutrale Kalzium- oder Magnesiumsalz; falls Y^{\oplus} ein Cyclohexylammoniumkation ist, handelt es sich um das folgende Kation:



falls Y^{\oplus} das Kation



ist, leitet sich dieses insbesondere von folgenden Aminen ab: Methylamin, Ethylamin, Dimethylamin, Diethylamin, Trimethylamin, Triethylamin, Methylethylamin, Dimethylethylamin, Diethylmethylamin, 2-Hydroxy-ethylamin, Bis-(2-hydroxy-ethyl)-amin, Tris-(2-hydroxy-ethyl)-amin, (2-Hydroxy-ethyl)-methylamin, (2-Hydroxy-ethyl)-dimethylamin, Bis-(2-hydroxy-ethyl)-methylamin, (2-Hydroxy-ethyl)-ethylamin, (2-Hydroxy-ethyl)-diethylamin,

238374 b

Bis-(2-hydroxy-ethyl)-ethylamin, (2-Hydroxy-ethyl)-methyl-ethylamin.

Unter den erfindungsgemäßen Oxazaphosphorin-Derivaten der Formel I werden alle vier möglichen Stereoisomere, d.h. die beiden racemischen cis-Isomere (2rs, 4rs) und die beiden racemischen trans-Isomere (2rs, 4rs), und die vier getrennten optisch aktiven cis-Isomere (2r, 4s und 2s, 4r) und die trans-Isomere (2r,4r und 2s, 4s) und Mischungen davon verstanden. Die cis/trans-Gemische können in bekannter Weise vorzugsweise durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden. Optisch aktive Verbindungen können nach den üblichen Methoden der Racematspaltung beispielsweise durch fraktionierte Kristallisation der diastereomeren Salze der racemischen Sulfonsäure der Formel I mit optisch aktiven Basen oder gegebenenfalls durch Verwendung optisch aktiver Ausgangsprodukte nach Formel II bei der Synthese erhalten werden.

Im allgemeinen entstehen bei der Synthese cis/trans-Gemische. Daraus erhält man bei gut kristallisierenden Verbindungen die cis- bzw. die trans-Form, insbesondere die cis-Form, kristallisiert. Führt man jedoch die Umsetzung in wasserfreien Lösungsmitteln oder in Lösungsmitteln mit geringem Wasseranteil durch, erhält man ausschließlich oder ganz überwiegend eine einzige Form, insbesondere die cis-Form. So kann man die reine cis-Form einer nicht oder schlecht kristallisierenden Verbindung nach Formel I beispielsweise herstellen, indem eine acetonische Lösung der Verbindung nach Formel II zu einer wässrigen Lösung der Verbindung nach Formel III bei Temperaturen zwischen -30 und $+20^{\circ}\text{C}$ gegeben wird und nach beendeter Umsetzung mehrmals umgefällt wird.

Die Ausgangsverbindungen nach Formel II können als racemische cis- und trans-Isomere (Darstellung siehe oben) als optisch aktive cis- und trans-Form und als Mischungen

davon eingesetzt werden. Optisch aktive Verbindungen nach Formel II erhält man beispielsweise aus den Salzen der optisch aktiven Sulfonsäuren (Darstellung siehe oben), indem sie zu den entsprechenden optisch aktiven 4-Hydroxy-oxazaphosphorinen der Formel II hydrolysiert (in Wasser beispielsweise zwischen 0 und 50°C, insbesondere 5 bis 30°C) und das frei werdende Thiol der Formel III zu Disulfiden oxidiert (beispielsweise mittels Jod oder Wasserstoffperoxid in Wasser) werden. Ein weiteres Verfahren geht beispielsweise von einem getrennten optisch aktiven Cyclophosphamid-Derivat nach Beispiel Nr. 16 bzw. 33 der DDR-Patentanmeldung AP CO 7D/233132/5 aus und hydrolysiert diese Verbindung zu optisch aktivem 4-Hydroxy-cyclophosphamid. In einem weiteren Verfahren wird beispielsweise optisch aktives Cyclophosphamid (DE-OS 29 44 106) in einem beschriebenen Verfahren (Peter et al, Cancer Treatment Reports 60, 429 (1976)) zu optisch aktivem 4-Hydroxy-cyclophosphamid umgesetzt.

Zur Racematspaltung kommen beispielsweise als optisch aktive Basen zum Beispiel 1-Phenylethylamin, Brucin, Chinidin, Strychnin und Cinchonin sowie weitere Basen und Methoden in Frage, die in "Optical Resolution Procedures for Chemicals Compounds", Vol. 2, Paul Newman, 1981, Verlage Optical Resolution Information Center in Riverdale, USA, beschrieben sind. Diese optisch aktiven Basen können auch bei der Synthese gemäß der Umsetzung einer Verbindung der Formel II mit einer Verbindung der Formel III anstelle der bereits angegebenen Bedeutungen von Y eingesetzt werden. In diesem Fall ist anschließend diese optisch aktive Base in üblicher Weise gegen Wasserstoff oder eine andere Base Y entsprechend der bereits angegebenen Definition von Y auszutauschen.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der Formel II,

worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C_{1-4} -Alkyl ist, mit einer Verbindung der Formel III umgesetzt, worin Y^{\oplus} sich von einer optisch aktiven Base ableitet, die nicht der bereits angegebenen Definition von Y entspricht und nach der Umsetzung diese andere optisch aktive Base gegen Wasserstoff oder eine Base gemäß der bereits angegebenen Definition von Y austauscht.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können bei der Bekämpfung von Krebs und zur Immunsuppression verwendet werden. Sie besitzen eine starke Antitumor-Wirksamkeit. Sie zeichnen sich durch eine hohe Aktivität bei parenteraler und bei oraler Applikation sowie durch geringe allgemein toxische Erscheinungen aus. Sie besitzen in vivo eine hohe karzinotoxische Selektivität und in vitro eine hohe zytotoxische Spezifität.

Zur Feststellung der karzinotoxischen Wirkung wurden die Substanzen tierexperimentell an einer Reihe von Tumoren unterschiedlicher Chemoresistenz geprüft. Zur Auswertung wurden mit Hilfe der Probit-Analyse aus der Beziehung zwischen den Logarithmen der Dosen und den Häufigkeiten geheilter und überlebender Versuchstiere die mittleren kurativ wirksamen Dosen (DC 50 [mg/kg]) bestimmt. Als Vergleichssubstanz, welche den erfindungsgemäßen Produkten in der chemischen Konstitution nahesteht, diente die handelsübliche Verbindung Cyclophosphamid.

Im Falle der lymphatischen Leukämie L5222 der Ratte (Stamm: BD IX) lag diese mittlere kurative Dosis - bei einmaliger intravenöser Applikation am 5. Tag nach Inokulation der Leukämie - für die erfindungsgemäßen Produkte ebenso wie für Cyclophosphamid bei 1,5 mg/kg.

Beim chemosensitiven Yoshida-Aszites-Karzinom (Linie AH 13) der Ratte (Stamm: Sprague-Dawley) lag diese DC 50 für die erfindungsgemäßen Produkte ebenso wie für die Vergleichssubstanz Cyclophosphamid bei 1 mg/kg.

In analoger Weise wurde die toxische Wirkung geprüft, wobei aus der Beziehung der Logarithmen der Dosen und der Todeshäufigkeit die mittlere letale Dosis (DL 50 [mg/kg]) bestimmt wurde.

Für die erfindungsgemäßen Produkte liegt diese DL 50 bei einmaliger intravenöser Applikation um 300 mg/kg. Die vergleichend bestimmte mittlere letale Dosis von Cyclophosphamid bei einmaliger intravenöser Gabe liegt bei 244 mg/kg. Die erfindungsgemäßen Produkte besitzen demgemäß eine um rund 20 % geringere akute Toxizität bzw. bei gleicher kurativer Wirksamkeit eine entsprechend höhere therapeutische Breite.

Für die Untersuchung der zytotoxischen Spezifität in vitro wurden jeweils ca. $3 \cdot 10^7$ steril gewonnene Zellen des chemoresistenten Yoshida-Aszites-Karzinoms (Linie AH13, Stamm ASTA) mit steigenden Konzentrationen der erfindungsgemäßen Produkte für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und nach mehrmaligem Auswaschen in die Bauchhöhle unbehandelter Wirtstiere implantiert. Aus der Beziehung zwischen den Logarithmen der Konzentrationen und den Häufigkeiten sich entwickelnder Tumoren wurde mit Hilfe der Probit-Analyse die mittleren zytotoxischen Dosen (CE50 [$\mu\text{g/ml}$]) bestimmt. Unter diesen Versuchsbedingungen liegt die CE50 der erfindungsgemäßen Produkte zwischen 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$.

Da Cyclophosphamid als zunächst inaktive Transportform-Verbindung keine zytotoxische Aktivität aufweist, wurde in diesen Untersuchungen als Vergleichssubstanz der aktive

238374 6

- 8 -
11

Primär-Metabolit 4-Hydroxy-Cyclophosphamid eingesetzt, der im Körper durch enzymatische Aktivierung, vorwiegend in der Leber, gebildet wird. Für diese Vergleichssubstanz liegt die mittlere zytotoxische Konzentration gleichfalls bei 5 µg/ml.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der vorliegenden Erfindung, ohne sie hierauf zu beschränken.

238374 6

12

Beispiel 1

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Cyclohexylammoniumsalz

5,6 g (20 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid (d.h. 2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid) und 4,8 g (20 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, mit etwas Trichloressigsäure versetzt und 3 Tage bei 0°C im Kühlschrank stengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in Aceton aufgenommen, erneut eingeengt, aus Aceton kristallisiert und Isopropanol umkristallisiert.
Ausbeute: 7,2 g (72% d.Th.), Fp.: 149 - 151°C (cis-Form).

Beispiel 2

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Cyclohexylammoniumsalz

2,9 g (10 mmol) 2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-methoxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und 2,4 g (10 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit etwas Trichloressigsäure in 10 ml Dimethylformamid gelöst und 20 Std. bei -25°C aufbewahrt. Nach weiterem 3-stündigem Stehen bei 0°C wurde mit Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt, angerieben, das Kristallisat nach 20-stündigem Stehen bei 0°C abgesaugt, gewaschen und getrocknet.
Ausbeute: 4,7 g (94% d.Th.), Fp.: 145°C (Zers.)
Umkristallisation aus Alkohol/Ether, Fp.: 149 - 151°C (cis-Form).

238374 6

13

Beispiel 3

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Cyclohexylammoniumsalz

1,4 g (5 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 1,2 g (5 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit einer Spur Trichloressigsäure in 25 ml Methanol gelöst und über Nacht bei -25°C im Kühlschrank stehengelassen. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf etwa 5 ml eingeeengt, Ether bis zur beginnenden Trübung zugesetzt und angerieben. Das Kristallisat wurde nach 20-ständigem Stehen bei 0°C abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 2,1 g (84% d.Th.), Fp.: $143 - 145^{\circ}\text{C}$ (cis-Form).

Beispiel 4

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Natriumsalz

2,5 g (5 mmol) Cyclohexylammonium-2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonat wurden in 25 ml sauerstofffreiem Wasser gelöst und über eine mit Natriumionen beladene Kationenaustauschersäule der Fa. Merck gegeben. Das Eluat wurde über Stickstoff aufgefangen, gefriergetrocknet und der feste Rückstand über Phosphorpent-oxid im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,9 (91% d.Th.), Fp.: $78 - 83^{\circ}\text{C}$ (Zers.),
Rf-Wert: 0,61 (Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/1n Essigsäure (5:3:2)).

238374 6 14

Beispiel 5

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Ammoniumsalz

2,8 g (10 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 1,6 g (10 mmol) Ammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit einer katalytischen Menge Trichloressigsäure in 50 ml Wasser gelöst und 3 Tage bei 0°C im Kühlschrank stehen gelassen. Danach wurde das Wasser im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand zweimal in Aceton aufgenommen und im Vakuum eingeengt. Umkristallisation aus Aceton/Ether.

Ausbeute: 3,9 (93% d.Th.), Fp.: 131 - 133°C (cis-Form).

Beispiel 6

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Ammoniumsalz

2,8 g (10 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 1,6 g (10 mmol) Ammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden mit einer katalytischen Menge Trichloressigsäure in 10 ml Dimethylformamid gelöst und 20 Stunden im Kühlschrank bei -25°C aufbewahrt. Nach weiteren 5 Stunden bei 0°C wurde mit Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt und angerieben. Das Kristallisat wurde nach 1 Tag bei 0°C abgesaugt, gewaschen, getrocknet und aus n-Propanol umkristallisiert. Ausbeute: 3,2 g (77% d.Th.) der cis-Form, Fp.: 132°C.

Beispiel 7

3-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-propansulfonsäure Natriumsalz

5,4 g (20 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 5,2 g (20 mmol) Cyclohexylammonium-3-mercaptopropansulfonat wurden

238374 6

15

in 100 ml Wasser gelöst, mit etwas Trichloressigsäure versetzt und 1 Tag bei 0°C stehengelassen. Danach wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt, der konzentrierte Rückstand über eine mit Natriumionen beladene Kationenaustauschersäule gegeben, das Eluat im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in trockenem Ethanol gelöst, filtriert und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 5,5 g (63% d.Th.), Fp.: 75 - 79°C, Rf-Wert: 0,64 (Laufmittel: Essigester/iso-Propanol) in Essigsäure (5:3:2)).

Beispiel 8

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Natriumsalz

1,6 g (5 mmol) 2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-ethoxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und 0,8 g (5 mmol) Natrium-2-mercaptoethansulfonat in 10 ml Dimethylformamid wurden mit einer Spur Trichloressigsäure versetzt und über Nacht bei -25°C aufbewahrt. Anschließend wurde zur Reaktionslösung 20 ml Ether gegeben. Der Rückstand wurde nach 20-stündigem Stehen bei 0°C abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,5 g (71% d.Th.), Fp.: 145- 150°C (Zers.), Rf-Wert: 0,56.

Beispiel 9

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure

0,8 g (3,0 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid in 3 ml Wasser wurden unter Eiswasserkühlung mit 420 mg (3,0 mmol)

238374 6 16

2-Mercaptoethansulfonsäure versetzt. Nach 1 Stunde wurde im Hochvakuum eingeengt und kristallisiert.
Ausbeute: 1,1 g (92% d.Th.), Fp.: 75 - 78°C.

Beispiel 10

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure

2,0 g (4 mmol) Cyclohexylammonium-2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonat wurden in wenig Wasser gelöst und über eine mit Wasserstoffionen beladene Kationenaustauschersäule unter Kühlung auf 4°C gegeben. Das Eluat wurde anschließend gefriergetrocknet und aus Dimethylformamid/Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: 1,2 g (75% d.Th.), Fp.: 75 - 78°C, Rf-Wert: 0,58 (Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/1n Essigsäure (5:3:2)).

Beispiel 11

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Ammoniumsalz

720 mg (1,8 mmol) 2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsäure wurden in wenig Wasser gelöst, mit Ammoniak neutralisiert und mit 4 ml Aceton versetzt. Die Reaktionslösung stand über Nacht bei -25°C. Das Kristallisat wurde abgesaugt und aus Methanol/Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 530 mg (71% d.Th.), Fp.: 133 - 134°C. (cis-Form).

238374 6 17

Beispiel 12

2-[2-(Bis-(2-chloethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Lithiumsalz

540 mg (2 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 300 mg (2 mmol) Lithium-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit einer Spur Trichloressigsäure in 7 ml Wasser gelöst und 20 Stunden bei 0°C stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingeengt, der Rückstand in Aceton aufgenommen und filtriert. Anschließend wurde die Lösung eingeengt, der Rückstand in Ethanol gelöst, eingeengt, erneut in Ethanol aufgenommen, mit Ether gefällt und die Fällung abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 500 mg (61% d.Th.), Rf-Wert: 0,56 (Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/1n Essigsäure (5:3:2)).

Beispiel 13

Neutrales

2-[2-(Bis-(2-chloethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Magnesiumsalz

1,4 g (5 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 750 mg (2,5 mmol) Magnesium-di-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit etwas Trichloressigsäure in 15 ml Wasser gelöst und nach 3 Tagen bei 0°C im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethanol gelöst, eingeengt, erneut in Ethanol aufgenommen, mit Ether gefällt, abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,3 (63% d.Th.), Fp.: 110 - 115°C (Zers.), Rf-Wert: 0,56.

238374 6

18

Beispiel 14

Neutrales

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Calciumsalz

1,4 g (5 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 800 mg (2,5 mmol) Calcium-di-2-mercaptoethansulfonat wurden zusammen mit etwas Trichloressigsäure in 15 ml Wasser gelöst, nach 3 Tagen bei 0°C im Vakuum eingeengt, zweimal mit Ethanol versetzt, eingeengt, in Ethanol gelöst und mit Ether gefällt, abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 1,3 (62% d.Th.), Fp.: 110 - 115°C (Zers.), Rf-Wert: 0,56.

Beispiel 15

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-6-methyl-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure

Cyclohexylammoniumsalz

1,45 g (5 mmol) 2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und 1,2 g (5 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden in 5 ml Wasser und 5 ml Aceton gelöst, mit Trichloressigsäure angesäuert und 20 Stunden bei 0°C stengelassen. Anschließend wurde filtriert, das Filtrat im Vakuum schonend eingeengt, der Rückstand zweimal in Aceton aufgenommen und eingeengt. Nun wurde der Rückstand in Aceton gelöst, mit Ether gefällt, mit Ether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 1,4 (56% d.Th.), Fp.: 120 - 125°C (Zers.), Rf-Wert: 0,61

238374 6 19

Beispiel 16

3-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-2-methyl-propansulfonsäure

Natriumsalz

277 mg (1 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 192 mg (1 mmol) Natrium-3-mercapto-2-methyl-propansulfonat wurden in 4 ml Wasser gelöst, mit einer Spur Trichlor-essigsäure versetzt und 20 Stunden bei 0°C stengelassen. Nach dem Einengen im Vakuum wurde der Rückstand zweimal in trockenem Ethanol gelöst und wieder eingeengt und in Alkohol/Ether gefällt.

Ausbeute: 420 mg (86% d.Th.), Rf-Wert: 0,61.

Beispiel 17

6-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-hexansulfonsäure Natriumsalz

277 mg (1 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 220 mg (1 mmol) Natrium-6-mercaptohexansulfonat wurden zusammen mit einer Spur Trichloressigsäure in 4 ml Wasser gelöst und 20 Stunden bei 0°C stengelassen. Anschließend wurde die Reaktionsmischung im Vakuum schonend eingeengt, der Rückstand zweimal in trockenem Ethanol gelöst und wieder eingeengt. Der Rückstand wurde in Alkohol aufgenommen und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 350 mg (70% d.Th.), Rf-Wert: 0,58.

238374 6 20

Beispiel 18

2-[3-(2-Chlorethyl)-2-(2-chlorethylamino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure

Cyclohexylammoniumsalz

277 mg (1 mmol) 3-(2-Chlorethyl)-2-(2-chlorethylamino)-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und 240 mg (1 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat wurden in 4 ml Wasser gelöst, mit einer Spur Trichlor-essigsäure versetzt und 20 Stunden bei 0°C aufbewahrt. Die im Vakuum eingeengte Reaktionslösung wurde zweimal in Ethanol gelöst und wieder eingeengt. Anschließend wurde in Ethanol aufgenommen und mit Ether gefällt. Ausbeute: 340 mg (68% d.Th.), Fp.: 115 - 120°C (Zers.), Rf-Wert: 0,56.

Beispiel 19

2-[3-(2-Chlorethyl)-2-(bis-(2-chlor-ethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]-ethansulfonsäure Cyclohexylammoniumsalz

340 mg (1 mmol) 3-(2-Chlorethyl)-2-(bis-(2-chlorethyl)-amino)-4-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid und 240 mg (1 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat in 2 ml Dimethylformamid wurden mit einer Spur Trichloressigsäure versetzt und 2 Tage bei -25°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit der 20-fachen Menge Ether gefällt. Der Rückstand wurde gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 400 mg (71% d.Th.), Fp.: 102 - 107°C (Zers.), Rf-Wert: 0,63.

Entsprechend den vorstehenden Beispielen wurden noch die folgenden Verbindungen hergestellt:

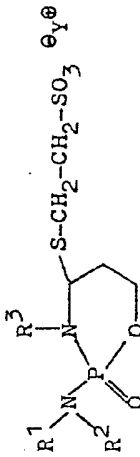
238374

6

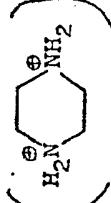
21

Beispiele 20 - 30

Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonate der allgemeinen Formel



Beispiel Nr.:	R ¹	R ²	R ³	Y [⊕]	Schmelzpunkt bzw. Rf-Wert
20	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	NH ₄ [⊕]	121 - 125°C (Zers.)
21	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₂ -CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	NH ₄ [⊕]	95-97°C (Zers.)
22	CH ₃ -SO ₃ -CH ₂ -CH ₂	CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂		0,64
23	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	K [⊕]	120 - 123°C (Zers.)
24	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H		70 - 75°C (Zers.)
25	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(CH ₃ -CH ₂) ₂ NH ₂ [⊕]	0,61
26	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	HO-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ [⊕]	0,59
27	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(HO-CH ₂ -CH ₂) ₂ NH ₂ [⊕]	0,59
28	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	NH ₂ -C(=NH ₂) [⊕] NH ₂	132 - 134°C

Beispiel Nr.:	R ¹	R ²	R ³	Y	Schmelzpunkt bzw. Rf-Wert ¹⁾
29	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(H ₃ N ⁺ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺) ^{1/2}	0,62
30	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	() ^{1/2}	0,61

1) Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/1n Essigsäure (5:3:2)

Anfärbung: u.a. mit Jod.

2300740

Beispiel 31

3-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphospherin-4-yl-thio]-2-mercaptopropansulfonsäure
Cyclohexylaminsalz

1,39 g (5 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 1,44 (5 mmol) 2,3-Dimercaptopropansulfonsäure-Cyclohexylaminsalz wurden in 10 ml Ethanol gelöst, mit Trichloressigsäure angesäuert und 2 Tage bei 0° C stehen gelassen. Danach wurde mit Ether gefällt, nach 20 Stunden dekantiert und das zurückbleibende Öl im Hochvakuum getrocknet. Das Öl erstarrte. Ausbeute: 1,8 g (77 % d. Th.), Fp.: ab 70° C (Zers.)

Beispiel 32

2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl-thio]ethansulfonsäure cis-Natriumsalz

2,8 g (10 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid in 10 ml Aceton wurden mit 1,3 g (8 mmol) Natrium-2-mercaptoethansulfonat in 2 ml Wasser versetzt und 3 Stunden bei 0° C aufbewahrt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum bei 25° C eingeengt, der Rückstand in trockenem Aceton aufgenommen und in der Kälte mit trockenem Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Einengen der Lösung im Vakuum bildete sich ein Niederschlag.

Ausbeute: 1,5 g (44 % d. Th.) des cis-Isomeren, Fp.: 83 - 85° C.

Durch Umkristallisation in Aceton erhielt man ein in Aceton schwerlösliches Produkt.

Beispiel 33

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

14 g (50 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 11 g (50 mmol)

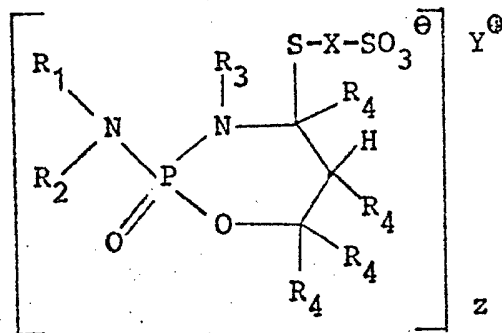
3-Mercaptopropansulfonsäure Guanidinsalz wurden in 100 ml Ethanol gelöst, mit Trichloressigsäure angesäuert und bei 0° C aufbewahrt.

Nach 20 Stunden setzte man 50 ml Ether zu. Das Kristallisat wurde nach weiteren 20 Stunden abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 18,5 g (78 % d. Th.), Fp.: 128 - 132° C (Zers.)

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I



I

worin

R_1 , R_2 und R_3 , die gleich oder verschieden voneinander sein können, Wasserstoff, Methyl, Ethyl, 2-Chlorethyl oder 2-Methansulfonyloxyethyl darstellen und dabei mindestens zwei dieser Reste 2-Chlorethyl und/oder 2-Methansulfonyloxyethyl sind,

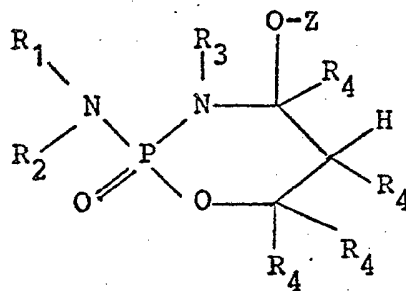
R_4 Wasserstoff oder Methyl ist,

X ein gerad- oder verzweigt-kettiges C_{2-6} -Alkylen ist, das eine Mercaptogruppe an dem 1-, 2-, 3-, 4- oder 5-ständigen Kohlenstoffatom der Alkylenkette haben kann,

und

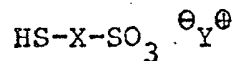
Y^{\ominus} das Wasserstoffkation, ein Alkali- oder Erdalkaliumkation, das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel $NR_5R_6R_7$ ableitet, worin die Reste R_5 bis R_7 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C_1 - C_2 -Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder

worin Y^{\oplus} das Ethylendiammoniumkation $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2-NH_3^{\oplus}$ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y^{\oplus} ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y^{\oplus} ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist, gekennzeichnet dadurch, daß man ein 4-Hydroxy- oder 4- C_{1-4} -Alkoxazaphosphorin der allgemeinen Formel II



II

worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C_{1-4} -Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



III

worin X und Y^{\oplus} die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben, umgesetzt und, falls Y^{\oplus} Wasserstoff ist, die erhaltene Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäure mit einer der der anderen Bedeutung von Y^{\oplus} entsprechenden Base neutralisiert.

2. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man, falls Y^{\oplus} Wasserstoff ist, mit solchen Basen der Formel Y neutralisiert, daß in Formel I Y^{\oplus} das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel $NR_5R_6R_7$ ableitet, worin die Kette R_5 bis R_7 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C_1-C_2-

238374 6 - ²⁷/₃ -

Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder worin Y^{\oplus} das Ethylendiammoniumkation $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2-NH_3^{\oplus}$ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y^{\oplus} ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y^{\oplus} ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist.

3. Verfahren gemäß Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man, falls Y^{\oplus} Wasserstoff ist, mit solchen Basen der Formel Y neutralisiert, daß in Formel I Y^{\oplus} ein Kalium- oder Erdalkalikation ist.
4. Verfahren gemäß Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß man, falls Y^{\oplus} Wasserstoff ist, mit solchen Basen der Formel Y neutralisiert, daß in Formel I Y^{\oplus} das Cyclohexylammoniumkation ist.
5. Verfahren gemäß Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß man, falls Y^{\oplus} Wasserstoff ist, mit Guanidin neutralisiert.
6. Verfahren zur Herstellung von Oxazaphosphorin-4-thioalkansulfonsäuren und deren neutrale Salze gemäß einem oder mehreren der Punkte 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß man eine Verbindung der Formel II, worin R_1, R_2, R_3 und R_4 die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C_{1-4} -Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III umsetzt, worin Y^{\oplus} sich von einer optisch aktiven Base ableitet, die nicht der bereits angegebenen Definition von Y entspricht und nach der Umsetzung diese andere optisch aktive Base gegen Wasserstoff oder eine Base gemäß der bereits angegebenen Definition von Y austauscht.
7. Verfahren gemäß einem der Punkte 1-6, gekennzeichnet dadurch, daß man das Kation Y^{\oplus} eines Oxazaphosphorin-4-thioalkansulfonats an einem Ionenaustauscher gegen ein anderes Kation Y^{\oplus} austauscht.