



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8201227**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Oxazafosforine-4-thioalkaansulfonzuren, hun neutrale zouten, werkwijze voor het bereiden daarvan en deze stoffen bevattende farmaceutische preparaten.**

⑤1 Int.Cl.<sup>3</sup>: C07F9/24, C07F9/65, A61K31/66.

⑦1 Aanvrager: Asta-Werke Aktiengesellschaft Chemische Fabrik te Bielefeld, Bondsrepubliek Duitsland.

⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.  
Vereenigde Octrooibureaux  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8201227.

②2 Ingediend 24 maart 1982.

③2 Voorrang vanaf 24 maart 1981.

③3 Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: P 3111428 .

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 18 oktober 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Oxazafosforine-4-thioalkaansulfonzuren, hun neutrale zouten, werkwijze voor het bereiden daarvan en deze stoffen bevattende farmaceutische preparaten.

De uitvinding betreft de nieuwe oxazafosforine-4-thioalkaansulfonzuren en hun neutrale zouten met de algemene formule 1 van het formuleblad, waarin

5  $R_1$ ,  $R_2$  en  $R_3$  gelijk of verschillend kunnen zijn en waterstof, methyl, ethyl, 2-chloorethyl of 2-methaansulfonyloxyethyl voorstellen en daarbij tenminste twee van deze groepen 2-chloorethyl en/of 2-methaansulfonyloxyethyl zijn,

$R_4$  waterstof of methyl voorstelt,

10 X een rechte of vertakte  $C_{2-6}$ -alkyleengroep is, die een mercaptogroep aan het koolstofatoom op de 1-, 2-, 3-, 4- of 5-plaats van de alkyleenketen kan bevatten, en

15  $Y^{\oplus}$  een waterstofkation, een alkali- of aardalkalikation, een guanidinium-, morfolinium- of cyclohexylammoniumkation, of een kation dat is afgeleid van een amine met de formule  $NR_5R_6R_7$ , waarin de groepen  $R_5 - R_7$  gelijk of verschillend zijn en waterstof,  $C_1-C_2$ -alkyl of oxethylgroepen zijn, dan wel  $Y^{\oplus}$  het ethyleendiammoniumkation  $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2^{\oplus}-NH_3$  of het piperazoniumkation voorstelt, en

20 z is 1, indien  $Y^{\oplus}$  een eenbasisch kation is, of 2 is, indien  $Y^{\oplus}$  een tweebasisch kation of het kation van een verbinding met twee éénbasische kationen voorstelt.

Vanwege hun goede toegankelijkheid en goede eigenschappen verdienen daarbij die verbindingen met de formule 1 de voorkeur, waarin  $Y^{\oplus}$  het guanidinium-, morfolinium- of cyclohexylammoniumkation of een kation dat is afgeleid van een amine met de formule  $NR_5R_6R_7$  is, waarin 25  $R_5 - R_7$  gelijk of verschillend zijn en waterstof,  $C_1-C_2$ -alkylgroepen of oxyethylgroepen voorstellen, dan wel waarin  $Y^{\oplus}$  het ethyleendiammoniumkation  $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2^{\oplus}-NH_3$  of het piperazoniumkation is, en z is 1, indien  $Y^{\oplus}$  een eenbasisch kation, of 2 is, indien  $Y^{\oplus}$  een tweebasisch


kation of het anion van een verbinding met twee éénbasische kationen is.

5           Andere gunstige eigenschappen hebben ook de kalium- en aard-alkalimetaalzouten van de zuren met de formule 1 en ook deze verdienen derhalve voorkeur.

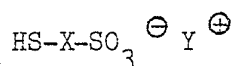
          Onder de met stikstofbasen geneutraliseerde zuren met de formule 1 verdienen bijzondere voorkeur de ammoniumzouten, waarin  $Y^{\oplus}$  het  $NH_4^{\oplus}$ -kation is, de cyclohexylammoniumzouten, waarin  $Y^{\oplus}$  het  $C_6H_{11}NH_3^{\oplus}$ -kation is, resp. de guanidiniumzouten, waarin  $Y^{\oplus}$  het  $NH_2=C(NH_2)^{\oplus}$ -kation is.

10           Van de onderhavige zouten is bijzonder gemakkelijk toegankelijk en dus een voorkeursverbinding het cis-natrium-2- $\int$ 2-(bis-(2-chloor-ethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl  $\int$ -thioëthaansulfonaat en het overeenkomstige ammonium-, cyclohexylammonium- en kaliumzout.

          De telling van de plaats van de mercaptogroep in de alkyleenketen X begint met het C-atoom direct naast de sulfonzuurgroep.

          Van bijzonder belang zijn die verbindingen met de formule 1, waarin  $R_1$  en  $R_2$  de 2-chloorethylgroep,  $R_3$  en  $R_4$  waterstof voorstellen, X een ethyleengroep en daarbij  $z = 1$  en  $Y^{\oplus} = NH_4^{\oplus}$ ,  $NH_3^{\oplus}$ - of  $NH_2=C(NH_2)^{\oplus}_2$  of  $X = (CH_2)_3$ ,  $z = 1$  en daarbij  $Y = NH_2=C(NH_2)_2$  is.

          De onderhavige oxazafosforine-4-thio-alkaansulfonzuren en hun neutrale zouten met de algemene formule 1 kunnen volgens de uitvinding b.v. worden bereid door een 4-hydroxy- of 4- $C_{1-4}$ -alkoxyoxazafosforine met de formule 2 waarin  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  en  $R_4$  dezelfde betekenis als bij formule 1 bezitten, en Z waterstof of  $C_{1-4}$ -alkyl is, met een verbinding met de formule 3



          waarin X en  $Y^{\oplus}$  de boven weergegeven betekenis bezitten, om te zetten en, indien  $Y^{\oplus}$  waterstof is, de verkregen oxazafosforine-4-thioalkaansulfonzuren met een base met een van de andere betekenissen van  $Y^{\oplus}$  te neutraliseren.

          Als geschikte oplosmiddelen komen water, alcoholen, speciaal alkanolen met 1 - 6 koolstofatomen als methanol, ethanol, propanol of isobutanol; alkylketonen met telkens 1 - 4 koolstofatomen zoals spe-

5        ciaal aceton, methylethylketon; dimethylformamide (DMF), hexamethyl-  
fosforzuurtriamide, gehalogeneerde koolwaterstoffen met 1 - 4 koolstof-  
atomen als chloroform, ethyleendichloride, tetrahydrofuran, diëthyl-  
ether of overeenkomstige oplosmiddelen of mengsels van enige van deze  
10        oplosmiddelen in aanmerking. De reactie wordt bij temperaturen tussen  
-60 en +80°C, bij voorkeur -30 tot +60°C en liefst bij -30 tot +40°C  
uitgevoerd, d.w.z. eventueel onder koelen, bij kamertemperatuur of on-  
der verwarmen. De omzetting kan bij aanwezigheid van een zure kataly-  
sator zoals een anorganisch of organisch zuur, zoals speciaal tri-  
10        chlorazijnzuur of een lewiszuur als AlCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub> of TiCl<sub>4</sub> worden uit-  
gevoerd.

      Het kation Y<sup>⊕</sup> van een sulfonaat volgens formule 1 kan tegen  
een ander kation worden uitgewisseld b.v. met een passend beladen ionen-  
uitwisselaar. Deze uitwisseling is in die gevallen gunstig, waar een  
15        zout met een bepaald kation Y<sup>⊕</sup> moeilijk volgens het eerder weergege-  
ven procédé kan worden bereid. Het gewenste zout kan zo uit een ander  
goed bereikbaar zout met hoge opbrengsten worden gewonnen.

      De nieuwe verbindingen met formule 1 worden door gebruikelijke  
opwerkingsmethoden voor dit soort produkten, speciaal door kristalli-  
20        satie, neerslaan of chromatografisch zuiveren, speciaal over Sephadex  
geïsoleerd. De structuurbevestiging vindt plaats door het smeltpunt,  
dunnelaagchromatografie, elementairanalyse of IR- en NMR-spectraal-  
analyse.

      De bij de onderhavige werkwijze als uitgangsmateriaal gebruik-  
25        te verbindingen zijn bekend, kunnen kristallijn of als ruw produkt  
worden toegepast en kunnen als volgt op een bekende wijze worden gesyn-  
thetiseerd:

4-hydroxy-oxazafosforinen worden door een reductie van 4-hydroxyper-  
oxyderivaten verkregen (zie b.v. J.Am.Chem.Soc. 95, 589 (1973) en  
30        Offenlegungsschrift 2.317.178).

4-alkoxy-oxazafosforinen vormen zich bij een zure katalyse uit de hy-  
droxyderivaten in de passende alcohol. De thiolen worden door een om-  
zetting van het overeenkomstige natriumbroomalkaansulfonaat met thio-  
ureum in het thiouroniumzout en een splitsing daarvan met ammoniak  
35        alsmede omzetting in het gewenste zout van het mercaptoalkaansulfonaat

gewonnen.

Indien  $Y^{\oplus}$  een alkalimetaalkation is, gaat het speciaal om het natrium- of kaliumzout; indien  $Y^{\oplus}$  een aardalkalimetaalkation is, gaat het speciaal om het neutrale calcium- of magnesiumzout; indien  $Y^{\oplus}$  een cyclohexylammoniumkation is gaat het om het kation  $C_6H_{11}NH_3^{\oplus}$ ; indien  $Y^{\oplus}$  een kation  $R_5R_6R_7N^{\oplus}$  is, is dit speciaal van de volgende aminen afgeleid: methylamine, ethylamine, dimethylamine, diëthylamine, trimethylamine, triëthylamine, methylethylamine, dimethylethylamine, diëthylmethylamine, 2-hydroxy-ethylamine, bis-(2-hydroxyethyl)-amine, tris-(2-hydroxyethyl)-amine, (2-hydroxyethyl)-methylamine, (2-hydroxyethyl)-dimethylamine, bis-(2-hydroxyethyl)-methylamine, (2-hydroxyethyl)-ethylamine, (2-hydroxyethyl)-diëthylamine, bis-(2-hydroxyethyl)-ethylamine of (2-hydroxyethyl)-methylethylamine.

Onder de onderhavige oxazafosforinoderivaten met de formule 1 worden alle vier mogelijke stereoisomeren, d.w.z. de beide racemische cis-isomeren (2rs, 4rs) en de beide racemische trans-isomeren (2rs, 4rs) en de vier gescheiden optisch actieve cis-isomeren (2r, 4s en 2s, 4r) alsmede de trans-isomeren (2r, 4r en 2s, 4s) alsmede mengsels daarvan verstaan. De cis/trans-mengsels kunnen op een bekende wijze, bij voorkeur door een gefractioneerde kristallisatie worden gescheiden. Optisch actieve verbindingen kunnen volgens de gebruikelijke methode van de racemaatsplitsing b.v. door een gefractioneerde kristallisatie van de diastereoïsomere zouten van het racemische sulfonzuur met de formule 1 met optisch actieve basen of eventueel door een toepassing van optisch actieve uitgangsmaterialen met de formule 2 bij de synthese worden verkregen.

Over het algemeen ontstaan bij de synthese cis/trans-mengsels. Daaruit verkrijgt men bij goed kristalliserende verbindingen cis- resp. trans-vorm, speciaal de cis-vorm, kristallijn. Voert men echter de omzetting in water vrije oplosmiddelen of in oplosmiddelen met een gering watergehalte uit, dan verkrijgt men uitsluitend of overwegend één enkele vorm, speciaal de cis-vorm. Zo kan men de zuivere cis-vorm van een niet of slecht kristalliserende verbinding volgens formule 1 b.v. bereiden door een acetoplossing van de verbinding met formule 2 aan een waterige oplossing van een verbinding met de formule 3 bij tem-

peraturen tussen  $-30$  en  $+20^{\circ}\text{C}$  toe te voegen en na afloop van de omzetting enige malen neer te slaan.

De uitgangsverbindingen met de formule 2 kunnen als racemische cis- en trans-isomeren (bereiding zie boven) als optisch actieve cis- en trans-vorm en als mengsels daarvan worden toegepast. Optisch actieve 5  
verbindingen met de formule 2 verkrijgt men b.v. uit de zouten van de optisch actieve sulfonzuren (bereiding zie boven), door ze tot de overeenkomstige optisch actieve 4-dioxyoxazafosforinen met de formule 2 te hydrolyseren (in water b.v. tussen  $0$  en  $50^{\circ}\text{C}$ , liefst  $5 - 30^{\circ}\text{C}$ ) en 10  
het vrijkomende thiol met de formule 3 tot disulfide te oxyderen (b.v. met jodium of waterstofperoxyde in water). Een verdere methode gaat b.v. uit van een gesplitst optisch actief cyclofosfamidederivaat volgens voorbeeld 16 resp. 33 van de Nederlandse octrooiaanvraag 8104093 en hydrolyseert deze verbinding tot optisch actief 4-hydroxy-cyclofosfamide. Bij een verdere werkwijze wordt b.v. optisch actief cyclofosfamide (Offenlegungsschrift 2.944.106) volgens een bekend procédé (Peter et al, Cancer Treatment Reports 60, 429 (1976)) in optisch actief 4-hydroxycyclofosfamide omgezet. 15

Voor de racemaatsplitsing komen b.v. als optisch actieve basen b.v. 1-fenylethylamine, brucine, chinidine, strychnine en cinchonine 20  
alsmede verdere basen en methoden in aanmerking, die in "Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds", deel 2, Paul Newman, 1981, van het Optical Resolution Information Center in Riverdale, Amerika, zijn beschreven. Deze optisch actieve basen kunnen ook bij de synthese onder omzetting van een verbinding met de formule 2 met een verbinding 25  
met de formule 3 in plaats van de reeds weergegeven betekenissen voor Y worden toegepast. In dit geval moet vervolgens deze optisch actieve base op een gebruikelijke wijze tegen waterstof of een andere base Y overeenkomstig de eerder weergegeven definitie van Y worden uitgewisseld. 30

Een verdere werkwijze voor het bereiden van de oxazafosforine-4-thio-alkaansulfonzuren en hun neutrale zouten vindt plaats door een verbinding met de formule 2, waarin  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  en  $R_4$  de boven weergegeven betekenis bezitten, en Z waterstof of  $C_1-C_4$ -alkyl is, met een verbinding met de formule 3 om te zetten, waarin  $Y^{\oplus}$  van een optisch ac- 35

tieve base is afgeleid, die niet met een reeds gegeven definitie van Y overeenkomt, en na deze omzetting deze andere optisch actieve base tegen waterstof of een base volgens de weergegeven definitie van Y uit te wisselen.

5 De onderhavige verbindingen kunnen bij het bestrijden van kanker en voor een immunosuppressie worden gebruikt. Ze bezitten een sterke antitumor-activiteit. Ze munten uit door een hoge activiteit bij parenterale en orale toediening, alsmede door geringe algemeen giftige verschijnselen. Ze bezitten in vivo een hoge carcinotoxische selectiviteit en in vitro een hoge cytotoxische specificiteit. Voor het vaststellen van de carcinotoxische activiteit werden de stoffen bij dierexperimenten op een reeks tumoren met verschillende chemoresistentie 10 onderzocht. Voor de beoordeling werden met behulp van een probiet-analyse uit het verband tussen de logaritme van de doses en de frequentie van genezen en overlevende proefdieren de gemiddelde curatief werkzame doses (DC 50 in mg/kg) bepaald. Als vergelijkingsstof, die de onderhavige produkten qua chemische opbouw het naast staat, fungeerde 15 de handelsverbinding cyclofosfamide.

Bij lymfatische leukemie L5222 bij de rat (stam BD IX) lag de 20 gemiddelde curatieve dosis, bij een eenmalige intraveneuze toediening op de 5e dag na enting met de leukemie, voor de onderhavige produkten evenals voor cyclofosfamide bij 1,5 mg/kg.

Bij het chemosensitieve Yoshida-ascites-carcinosarcoom (lijn AH 13) van de rat (stam Sprague-Dawley) lag deze DC 50 voor de onderhavige 25 produkten evenals voor de vergelijkingsstof cyclofosfamide bij 1 mg/kg.

Op analoge wijze werd de toxische activiteit onderzocht, waarbij uit een verband tussen de logaritme van de doses en de overlijdensfrequentie de gemiddelde letale dosis (DL 50 in mg/kg) werd bepaald.

30 Voor de onderhavige produkten lag deze DL 50 bij eenmalige intraveneuze toediening omstreeks 300 mg/kg. De vergelijkend bepaalde gemiddelde letale dosis van cyclofosfamide bij een eenmalige intraveneuze gift lag bij 244 mg/kg. De onderhavige produkten bezitten dus een ca. 20% geringere acute giftigheid resp. bij een gelijke curatieve 35 activiteit een overeenkomstig hogere therapeutische breedte.

Voor een onderzoek op de cytotoxische specificiteit in vitro werden telkens  $3 \times 10^7$  steriel gewonnen cellen van het chemoresistente Yoshida-ascites-carcinosarcoom (lijn AH 13, stam ASTA) met oplopende concentraties van de onderhavige produkten, 2 uren bij  $37^{\circ}\text{C}$  geïncubeerd en na enige malen uitwassen in de buikholte van onbehandelde proefdieren geïmplantéerd. Uit het verband tussen de logaritme van de concentraties en de frequentie van zich ontwikkelende tumoren werd met behulp van de probietanalyse de gemiddelde cytotoxische dosis (CE 50 in  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) bepaald. Onder deze proefvoorwaarden lag de CE 50 van de onderhavige produkten tussen 3 en  $5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ .

Omdat cyclofosfamide als eerst inactieve transportvormverbinding geen cytotoxische activiteit bezit, werd bij deze proeven als vergelijkingsstof de actieve primaire metabooliet 4-hydroxycyclofosfamide toegepast, die in het lichaam door een enzymatische activering, hoofdzakelijk in de lever, wordt gevormd. Voor deze vergelijkingsstof ligt de gemiddelde cytotoxische concentratie eveneens bij  $5 \text{ mg}/\text{dm}^3$ .

De onderhavige verbindingen zijn voor het bereiden van farmaceutische preparaten en bereidingsvormen geschikt. Deze farmaceutica resp. geneesmiddelen bevatten als actieve stof een of meer van de onderhavige verbindingen, eventueel gemengd met andere farmacologisch of farmaceutisch actieve stoffen. De bereiding van deze geneesmiddelen vindt op een bekende wijze plaats, waarbij de bekende en gebruikelijke farmaceutische hulpstoffen alsmede verdere gebruikelijke drager- en verdunningsmiddelen kunnen worden gebruikt.

Als dergelijke drager- en hulpstoffen komen b.v. die stoffen in aanmerking, die in de volgende literatuurplaatsen als hulpstoffen voor de farmacie, cosmetica en aangrenzende gebieden aanbevolen of aangewezen zijn: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, band 4 (1953), blz.1 - 39; Journal of Pharmaceutical Sciences, deel 52 (1963), blz.918 e.v., H.v.Czetsch-Lindenwald, Hilfsstoffe für Pharmazie und angrenzende Gebiete; Pharm. Ind., Heft 2, 1961, blz.72 e.v.; Dr.H.P.Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, Cantor KG, Aulendorf in Württemberg (1971).

Voorbeelden hiervoor zijn gelatine, natuurlijke suikers als rietsuiker of melksuiker, lecithine, pectine, zetmeel (b.v. maiszetmeel),



alginezuur, tylose, talk, lycopodium, kiezelzuur (b.v. colloïdaal),  
cellulose, cellulosederivaten (b.v. cellulose-ethers, waarbij de cellulose-hydroxylgroepen gedeeltelijk met lage verzadigde alifatische alcoholen en/of lage verzadigde alifatische hydroxyalcoholen zijn veretherd,  
5 b.v. methyloxypropylcellulose), stearaten, magnesium- en calciumzouten van vetzuren met 12 - 22 koolstofatomen, speciaal de verzadigde (b.v. stearaten), emulgatoren, olies en vetten, speciaal plantaardige (b.v. aardnotenolie, ricinusolie, olijfolie, sesamolie, katoenzaadolie, maisolie, tarwekiemolie, zonnebloemzaadolie, kabeljauwleverolie, mono-, di-  
10 en triglyceriden van verzadigde vetzuren  $C_{12}H_{24}O_2$  tot  $C_{18}H_{36}O_2$  en hun mengsels), farmaceutisch geschikte één- of meerwaardige alcoholen en polyglycolen als polyethyleenglycolen alsmede derivaten daarvan, esters van alifatische, verzadigde of onverzadigde vetzuren (2 - 22 koolstofatomen, liefst 10 - 18 koolstofatomen) met eenwaardige alifatische alcoholen (1 - 20 koolstofatomen) of polyvalente alcoholen als  
15 glycolen, glycerol, diëthyleenglycol, pentaerythritol, sorbitol, mannitol enz., die eventueel ook veretherd kunnen zijn, benzylbenzoesaat, di-oxolanen, glycerolformalen, tetrahydrofurfurylalcohol, polyglycolethers met  $C_1$ - $C_{12}$ -alcoholen, dimethylacetamide, lactamiden, lactaten, ethylcarbonaten, siliconen (speciaal de middelviskeuze dimethylpolysiloxanen), magnesiumcarbonaat en dergelijke.

Voor het bereiden van oplossingen komen b.v. water of fysiologisch geschikte organische oplosmiddelen in aanmerking, zoals ethanol,  
1,2-propyleenglycol, polyglycolen en hun derivaten, dimethylsulfoxyde,  
25 vetalcoholen, triglyceriden, deelesters van glycerol, paraffinen en dergelijke.

Bij de bereiding van de preparaten kunnen bekende en gebruikelijke oplosmiddelen of emulgatoren worden gebruikt. Als oplosmiddelen en emulgatoren komen b.v. in aanmerking polyvinylpyrrolidon,  
30 sorbitanvetzuresesters als sorbitantrioleaat, lecithine, arabische gom, tragacanth, gepolyoxyethyleerd sorbitanmonooleaat, gepolyoxyethyleerde vetten, gepolyoxyethyleerde oleotriglyceriden, gelinoliseerde oleotriglyceriden, polyethyleenoxyde-condensatieproducten van vetalcoholen, alkylfenolen of vetzuren of ook 1-methyl-3-(2-hydroxyethyl)-imidazolidon-(2). Gepolyoxyethyleerd betekent hierbij dat de betreffende stoffen  
35

polyoxyethyleenketens bevatten, waarvan de polymerisatiegraad over het algemeen tussen 2 en 40 en speciaal tussen 10 en 20 is gelegen.

Dergelijke gepolyoxyethyleerde stoffen kunnen b.v. door een omzetting van hydroxylgroepen houdende verbindingen (b.v. mono- of diglyceriden of onverzadigde verbindingen zoals die, die oliezuurresten bevatten) met ethyleenoxyde worden verkregen (b.v. 40 mol ethyleenoxyde per mol glyceride). Voorbeelden van oleotriglyceriden zijn olijfolie, aardnotenolie, ricinusolie, sesamolie, katoenzaadolie, maisolie (zie ook Dr.H.P.Fiedler "Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete" 1971, blz.191 - 195).

Bovendien is een toeslag van conserveermiddelen, stabilisatoren, bufferstoffen, b.v. calciumwaterstoffosfaat, colloïdaal aluminiumhydroxyde, smaakcorrigentia, antioxydantia en complexvormers (b.v. ethyleendiaminotetra-azijnzuur) en dergelijke mogelijk. Eventueel kan ter stabilisatie van het actieve stof molecuul met de fysiologisch geschikte zuren of buffers op een pH van 3 - 7 worden ingesteld. Over het algemeen geniet een zoveel mogelijk neutraal tot zwak zuur milieu (tot pH 5) de voorkeur.

Als antioxydantia komen b.v. natriummetabisulfit, ascorbinezuur, galluszuur, galluszuur-alkylesters, butylhydroxyanisool, nordihydroguajareetzuur, tocoferolen alsmede tocoferolen + synergisten (stoffen die zware metalen door complexvorming binden, b.v. lecithine, ascorbinezuur, fosforzuur) in aanmerking. De toevoeging van de synergisten verhoogt de antioxydatieve activiteit van de tocoferolen sterk. Als conserveermiddelen komen b.v. sorbinezuur, p-hydroxybenzoëzuurester (b.v. lage alkylesters), benzoëzuur, natriumbenzoaat, trichloorisobutylalcohol, fenol, kresol, benzethoniumchloride en formalinederivaten in aanmerking.

De farmaceutische en gallenische hantering van de onderhavige verbindingen vindt volgens gebruikelijke standaardmethoden plaats. B.v. worden actieve stof en hulp- resp. dragerstoffen door roeren of homogeniseren (b.v. met gebruikelijke mengapparaturen) goed gemengd, waarbij over het algemeen bij temperaturen tussen 20 en 30°C, liefst 20 - 50°C, in het bijzonder bij kamertemperatuur, wordt gewerkt. Overigens wordt naar het volgende standaardwerk verwezen: Sucker, Fuchs,

Speiser: Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart (1978).

De toediening van de actieve stoffen of geneesmiddelen kan op de huid of slijmvliezen of in het lichaam plaats vinden, b.v. oraal, enteraal, pulmonaal, rectaal, nasaal, vaginaal, linguaal, intraveneus, 5 intra-arterieel, intracardiaal, intramusculair, intraperitoneaal, intracutaan, subcutaan, intrapleuraal, intrathekaal, intracavitair.

In het bijzonder is ook een toevoeging van andere geneesmiddelen, vooral van uroprotectoren zoals het natriumzout van 2-mercaptoethaansulfonzuur of het dinatriumzout van het overeenkomstige disulfide met de formule  $\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ , maar ook van andere systemisch of regionaal detoxificerende actieve stoffen mogelijk resp. gunstig. 10

De onderhavige verbindingen vertonen bij intraveneuze, intraperitoneale of orale toediening bij verschillende experimentele tumoren bij de rat en de muis een goede cytostatische en curatieve activiteit.

Voorbeelden voor dit soort indicaties zijn: 15 leukemieën, lymfogranulomatose, lymfosarcoom, reticulosarcoom, plasmocytoom, M.Waldenström; tumoren met uitgezaaide groei, speciaal ovarieel-, mamma-, bronchiaalcarcinoom, neuroblastoom, teelbaltumoren, niercarcinomen, pancreascarcinomen, seminoom, Ewing-sarcoom; post- 20 operatieve hulpbehandelingen, speciaal bij chemosensibele tumoren, die vermoedelijk de lokale grenzen reeds overschreden en ondanks radicale operatie een slechte prognose hebben.

Voorts komen de onderhavige verbindingen in tegenstelling tot de bekende middelen cyclofosfamide en ifosfamide in het bijzonder 25 ook voor de volgende toepassingen in aanmerking:

- 1) voor een regionale perfusie in de extremiteiten en de grote lichaams-  
holten,
- 2) voor een in vitro-behandeling van het bottenmerg bij een extracorpore-  
rale behandeling van het bottenmerg van leukemiepatiënten;
- 3) voor pretherapeutische sensibilisatieproeven op tumoren in vitro. 30

B.v. werden de onderhavige verbindingen aan de rat 5 dagen na intraperitoneale implantatie van  $10^5$  cellen van leukemie L5222 met verschillende doses intraveneus, intraperitoneaal of oraal toegediend en afhankelijk van de dosis een curatief effect bereikt. Als heling 35 werd het recidief en metastasevrij overleven van de tumordragende die-

ren na 90 dagen beschouwd. Uit de met de verschillende doses verkregen frequenties van genezingen werd met de probietanalyse volgens R. Fisher als gemiddelde curatieve dosis (DC 50) die dosis berekend, waarmee 50% van de tumordragende dieren kan worden genezen.

5 B.v. werden de onderhavige verbindingen ook 1 dag na intraperitoneale implantatie van  $10^6$  cellen van Yoshida-ascites-sarcoom AH13 met verschillende doses intraveneus, intraperitoneaal of oraal toegediend en afhankelijk van de dosis een curatief effect bereikt. Ook hier wordt het curatieve effect als recidief en metastasevrij overleven  
10 van de tumordragende dieren gedurende meer dan 90 dagen gedefinieerd.

Op overeenkomstige wijze wordt met de probietanalyse volgens R. Fisher als gemiddelde curatieve dosis (DC 50) die dosis berekend, waarbij 50% van de tumordragende dieren kan worden genezen.

15 Voorts werden b.v. de onderhavige verbindingen een- of meer-malen (viermaal) op achtereenvolgende dagen na een intraperitoneale implantatie van  $10^6$  cellen van muizenleukemie L1210 met verschillende doses intraveneus, intraperitoneaal of oraal toegediend en een cytostatisch effect bereikt.

20 De cytostatische activiteit wordt gemeten als een verlenging van de mediane overlevingstijd van de tumordieren en wordt als dosisafhankelijke procentuele verlenging van de overlevingstijd, vergeleken met een onbehandelde controlegroep, uitgedrukt.

25 De gemiddelde curatieve dosis ligt bij de rattentumoren onafhankelijk van de toedieningsvorm tussen 0,1 en 10 mg/kg. Met dezelfde doses kan een verlenging van de mediane overlevingstijd van 100% bij muizenleukemie L1210 worden bereikt (zie N. Brock: Pharmakologische Grundlagen der Krebs-Chemotherapie In: A. Georgii (Hrsg), Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft Band 1, blz.15 - 42, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1978)).

30 Deze curatieve en cytostatische activiteit is met het effect van het bekende geneesmiddel cyclofosfamide (Ednoxan<sup>R</sup>) of ifosfamide (Holoxan<sup>R</sup>) vergelijkbaar. De laagste, reeds curatief of cytostatisch werkzame dosis bij de boven weergegeven dierproeven is b.v.

0,01 mg/kg oraal

35 0,01 mg/kg intraperitoneaal

8201227

0,01 mg/kg intraveneus.

Als algemeen dosistraject voor een curatief en cytostatisch effect (dierproeven zie boven) komt b.v. in aanmerking:

0,01 - 100 mg/kg oraal, liefst 0,1 - 10,0 mg/kg,

5 0,01 - 100 mg/kg intraperitoneaal, liefst 0,1 - 10 mg/kg,

0,01 - 100 mg/kg intraveneus, liefst 0,1 - 10 mg/kg.

Indicaties voor de onderhavige verbindingen zijn b.v.:  
maligne ziekten van mens en dier.

De farmaceutische preparaten bevatten over het algemeen tussen  
10 1 mg en 1 g, liefst 10 - 300 mg van de onderhavige actieve componenten.

De toediening kan b.v. in de vorm van tabletten, capsules,  
pillen, dragees, ouweltjes, zalven, geleien, crèmes of in vloeibare  
vorm plaatsvinden. Als vloeibare toepassingsvormen komen b.v. in aan-  
merking: olievormige of alcoholische resp. waterige oplossingen als-  
15 mede suspensies en emulsies. Voorkeurstoepassingsvormen zijn tabletten,  
die tussen 10 en 200 mg of oplossingen, die tussen 0,1 - 5% actieve  
stof bevatten.

De enkelvoudige dosis van de onderhavige actieve componenten  
kan b.v. liggen

20 a) bij orale geneesmiddelen tussen 1 en 100 mg/kg, liefst 10 - 60 mg  
per kg,

b) bij parenterale geneesmiddelen (b.v. intraveneus of intramusculair)  
tussen 1 en 100 mg/kg, liefst 10 - 60 mg/kg,

25 c) bij geneesmiddelen voor rectale of vaginale toediening tussen 1 en  
100 mg/kg, liefst tussen 10 en 60 mg/kg,

d) bij geneesmiddelen voor lokale toediening op de huid of slijmvlie-  
zen (b.v. als oplossingen, lotions, emulsies of zalven) tussen 1 en  
100 mg/kg, liefst 10 - 60 mg/kg.

- (De doses zijn telkens berekend op de vrije basis) -

30 B.v. kunnen één- tot driemaal daags 1 - 10 tabletten met 10 -  
300 mg actieve stof of bijvoorbeeld bij intraveneuze injectie één- tot  
tweemaal daags één of meer ampullen met 1 - 10 cm<sup>3</sup> inhoud en 10 - 250  
mg actieve stof worden aanbevolen. Bij orale toediening is de minimale  
dagelijkse dosis b.v. 200; de maximale dagelijkse dosis bij orale toe-  
35 diening liefst niet meer dan 5000 mg. Ook een langdurige infusie van

passende doses gedurende 12 en meer uren kan in sommige gevallen worden aanbevolen.

5 Voor de behandeling van honden en katten ligt de enkelvoudige orale dosis over het algemeen tussen ca. 10 en 60 mg/kg lichaamsgewicht; de parenterale dosis ongeveer tussen 10 en 60 mg/kg lichaamsgewicht.

Voor de behandeling van paarden en vee ligt de afzonderlijke orale dosis over het algemeen tussen ca. 10 en 60 mg/kg; de parenterale enkelvoudige dosis ongeveer tussen 10 en 60 mg/kg lichaamsgewicht.

10 De weergegeven doseringen betreffen ook een toepassing van de onderhavige verbindingen voor een immunosuppressie.

De acute giftigheid van de onderhavige verbindingen bij de muis (uitgedrukt als LD 50 in mg/kg volgens Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 57, 261 (1944)) bedraagt bij orale toediening tussen 100 en 1000 mg/kg, en soms zelfs meer dan 1000 mg/kg.

15 De geneesmiddelen kunnen bij mensen, dieren en bij de veeteelt op zichzelf of gemengd met andere farmacologisch actieve stoffen worden gebruikt.

De volgende voorbeelden lichten de uitvinding nader toe zonder deze te beperken.

20 Voorbeeld I

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout.

25 5,6 g (20 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide (= 2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-4-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde) en 4,8 g (20 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden in 100 cm<sup>3</sup> gedestilleerd water opgelost, hieraan enig trichloorazijnzuur toegevoegd en 3 dagen bij 0°C in de koelkast bewaard. Hierna werd het oplosmiddel in een hoog vacuum verwijderd, het residu in aceton opgenomen, opnieuw ingedampt, uit aceton gekristalliseerd en uit isopropanol herkristalliseerd. Opbrengst 7,2 g (72%); Smp. 149 - 151°C (cis-vorm).

30 Voorbeeld II

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout.

35 2,9 g (10 mmol) 2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-4-methoxy-tetra-

hydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde en 2,4 g (10 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met enig trichloorazijnzuur in 10 cm<sup>3</sup> dimethylformamide opgelost en 20 uren bij -25°C bewaard.

Na nog 3 uren staan bij 0°C werd met ether tot een beginnende troebeling gemengd, aangewreven, het kristallisaat na 20 uren staan bij 0°C afgezogen, gewassen en gedroogd. Opbrengst 4,7 g (94% van de theoretische), Smp. 145°C (ontl.). Herkristalliseren uit alcohol/ether; Smp. 149 - 151°C (cis-vorm).

Voorbeeld III

10 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout

1,4 g (5 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 1,2 g (5 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met een spoor trichloorazijnzuur in 25 cm<sup>3</sup> methanol opgelost en 1 nacht bij -25°C in een ijskast bewaard. Vervolgens werd de reactieoplossing tot ca. 5 cm<sup>3</sup> geconcentreerd, ether tot beginnende troebeling toegevoegd en aangewreven. Het kristallisaat werd na 20 uren staan bij 0°C afgezogen, gewassen en gedroogd. Opbrengst 2,1 g (84% van de theoretische); Smp. 143 - 145°C (cis-vorm).

20 Voorbeeld IV

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur natriumzout.

2,5 g (5 mmol) cyclohexylammonium-2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonaat werden in 25 cm<sup>3</sup> zuurstofvrij water opgelost en over een met natriumionen beladen kationenuitwisselende kolom van de firma Merck geleid. Het eluaat werd onder stikstof opgevangen, gevriesdroogd en het vaste residu boven fosforpentoxyde in vacuo gedroogd. Opbrengst 1,9 g (91%); Smp. 78 - 83°C (ontl.); Rf-waarde 0,61 (loopmiddel: ethylacetaat/isopropanol/1 n azijnzuur (5 : 3 : 2)).

Voorbeeld V

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur ammoniumzout.

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 1,6 g (10 mmol) ammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met een katalytische

hoeveelheid trichloorazijnzuur in 50 cm<sup>3</sup> water opgelost en 3 dagen bij 0°C in een ijskast bewaard. Hierna werd het water in een hoog vacuum afgedestilleerd, het residu tweemaal in aceton opgenomen en in vacuo geconcentreerd. Herkristalliseren uit aceton/ether leverde 3,9 g (93%) met Smp. 131 - 133°C (cis-vorm).

Voorbeeld VI

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-7-ethaansulfonzuur ammoniumzout.

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 1,6 g (10 mmol) ammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden met een katalytische hoeveelheid trichloorazijnzuur in 10 cm<sup>3</sup> dimethylformamide opgelost en 20 uren in een ijskast bij -25°C bewaard. Na nog 5 uren staan bij 0°C werd met ether tot beginnende troebeling gemengd en aangewreven. Het kristallisaat werd na 1 dag bij 0°C afgezogen, gewassen, gedroogd en uit n-propanol herkristalliseerd. Opbrengst 3,2 g (77%) van de cis-vorm; Smp. 132°C.

Voorbeeld VII

3-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-7-propaansulfonzuur natriumzout.

5,4 g (20 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 5,2 g (20 mmol) cyclohexylammonium-3-mercaptopropaansulfonaat werden in 100 cm<sup>3</sup> water opgelost, met enig trichloorazijnzuur gemengd en 1 dag bij 0°C bewaard. Hierna werd het reactiemengsel in vacuo geconcentreerd, het geconcentreerde residu over een met natriumionen beladen kationenuitwisselende kolom geleid, het eluaat in vacuo geconcentreerd, het residu in water-vrije ethanol opgelost, gefiltreerd en met ether neergeslagen. Opbrengst 5,5 g (63% van de theoretische); Smp. 75 - 79°C; Rf-waarde 0,64 (loopmiddel: ethylacetaat/isopropanol/1 n azijnzuur = 5 : 3 : 2).

Voorbeeld VIII

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-7-ethaansulfonzuur natriumzout.

1,6 g (5 mmol) 2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-4-ethoxytetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde en 0,3 g (5 mmol) natrium-2-mercaptoëthaansulfonaat in 10 cm<sup>3</sup> dimethylformamide werden met een spoor trichloorazijnzuur gemengd en 1 nacht bij -25°C bewaard. Vervolgens



werd aan de reactieoplossing 20 cm<sup>3</sup> ether toegevoegd. Het residu werd na 20 uren staan bij 0°C afgezogen, gewassen en gedroogd. Opbrengst 1,5 g (71%); Smp. 145 - 150°C (ontl.); Rf-waarde 0,56.

Voorbeeld IX

5 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur.

0,8 g (3,0 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide in 3 cm<sup>3</sup> water werd onder koelen met ijswater met 420 mg (3,0 mmol) 2-mercaptoëthaansulfonzuur gemengd. Na 1 uur werd in hoog vacuum geconcentreerd en gekristalliseerd; Opbrengst 1,1 g (92%) met Smp. 75 - 78°C.

Voorbeeld X

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur.

15 2,0 g (4 mmol) cyclohexylammonium-2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonaat werden in weinig water opgelost en over een met waterstofionen beladen kationenuitwisselende kolom onder koeling op 4°C geleid. Het eluaat werd vervolgens gevriesdroogd en uit dimethylformamide/chloroform herkristalliseerd. Opbrengst 1,2 g (75%) met Smp. 75 - 78°C; Rf = 0,58 (loopmiddel: ethylacetaat/isopropanol/1 n azijnzuur = 5 : 3 : 2).

Voorbeeld XI

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur ammoniumzout

25 720 mg (1,8 mmol) 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonzuur werden in weinig water opgelost, met ammoniak geneutraliseerd en met 4 cm<sup>3</sup> aceton gemengd. De reactieoplossing werd 1 nacht bij -25°C bewaard. Het kristallijne materiaal werd afgezogen en uit methanol/aceton herkristalliseerd. Opbrengst 530 mg (71% van de theoretische) met Smp. 133 - 134°C (cis-vorm).

Voorbeeld XII

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur lithiumzout.

35 540 mg (2 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 300 mg (2 mmol) li-

thium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met een spoor trichloor-  
azijnzuur in 7 cm<sup>3</sup> water opgelost en 20 uren bij 0°C bewaard. Het re-  
actiemengsel werd in vacuo ingedampt, het residu in aceton opgenomen  
en gefiltreerd. Vervolgens werd de oplossing geconcentreerd, het resi-  
du in ethanol opgelost, geconcentreerd, opnieuw in ethanol opgenomen,  
5 met ether neergeslagen en het neerslag afgezogen, gewassen en gedroogd.  
Opbrengst 500 mg (61%), Rf-waarde 0,56 (loopmiddel: ethylacetaat/iso-  
propanol/1 n azijnzuur = 5 : 3 : 2).

Voorbeeld XIII

10 Neutraal

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafos-  
forin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur magnesiumzout.

1,4 g (5 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 750 mg (2,5 mmol)  
magnesium-di-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met enig trichloor-  
15 azijnzuur in 15 cm<sup>3</sup> water opgelost en na 3 dagen bij 0°C in vacuo  
drooggedampt. Het residu werd in ethanol opgelost, dit geconcentreerd,  
opnieuw in ethanol opgenomen, met ether neergeslagen, afgezogen, ge-  
wassen en gedroogd. Opbrengst 1,3 g (63%) met Smp. 110 - 115°C (ontl.).  
Rf-waarde 0,56.

20 Voorbeeld XIV

Neutraal

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafos-  
forin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur calciumzout.

1,4 g (5 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 800 mg (2,5 mmol)  
25 calcium-di-2-mercaptoëthaansulfonaat werden samen met enig trichloor-  
azijnzuur in 15 cm<sup>3</sup> water opgelost, na 3 dagen bij 0°C in vacuo inge-  
dampt, tweemaal met ethanol gemengd, wederom ingedampt, in ethanol  
opgelost en met ether neergeslagen, afgezogen, gewassen en gedroogd.  
Opbrengst 1,3 g (62%) met Smp. 110 - 115°C (ontl.); Rf-waarde 0,56.

30 Voorbeeld XV

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-6-methyl-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-  
oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout.

1,45 g (5 mmol) 2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-4-hydroxy-6-me-  
thyl-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde en 1,2 g (5 mmol) cy-  
35 clohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden in 5 cm<sup>3</sup> water en 5

cm<sup>3</sup> aceton opgelost, met trichloorazijnzuur aangezuurd en 20 uren bij 0°C bewaard. Vervolgens werd gefiltreerd, het filtraat in vacuo voorzichtig ingedampt, het residu tweemaal in aceton opgenomen en geconcentreerd. Hierna werd het residu in aceton opgelost, met ether neergeslagen, met ether gewassen en gedroogd. Opbrengst 1,4 g (56%) met Smp. 120 - 125°C (ontl.); Rf-waarde 0,61.

Voorbeeld XVI

3-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-2-methyl-propaansulfonzuur natriumzout.

10 277 mg (1 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 192 mg (1 mmol) natrium-3-mercapto-2-methyl-propaansulfonaat werden in 4 cm<sup>3</sup> water opgelost, met een spoor trichloorazijnzuur gemengd en 20 uren bij 0°C bewaard. Na concentreren in vacuo werd het residu tweemaal in water vrije ethanol opgelost en opnieuw ingedampt en in alcohol/ether neergeslagen. 15 Opbrengst 420 mg (86%); Rf-waarde 0,61.

Voorbeeld XVII

6-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-hexaansulfonzuur natriumzout.

20 277 mg (1 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 220 mg (1 mmol) natrium-6-mercaptohexaansulfonaat werden samen met een spoor trichloorazijnzuur in 4 cm<sup>3</sup> water opgelost en 20 uren bij 0°C bewaard. Vervolgens werd het reactiemengsel in vacuo voorzichtig ingedampt, het residu tweemaal in water vrije ethanol opgelost en wederom geconcentreerd. Het residu werd in alcohol opgenomen en met ether neergeslagen. Op- 25 brengst 350 mg (70%); Rf-waarde 0,58.

Voorbeeld XVIII

2-[3-(2-chloorethyl)-2-(2-chloorethylamino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout.

30 277 mg (1 mmol) 3-(2-chloorethyl)-2-(2-chloorethylamino)-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde en 240 mg (1 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat werden in 4 cm<sup>3</sup> water opgelost, met een spoor trichloorazijnzuur gemengd en 20 uren bij 0°C bewaard. De in vacuo ingedampte reactieoplossing werd tweemaal in ethanol opgelost en weer ingedampt. Vervolgens werd in ethanol opgenomen 35 en met ether neergeslagen. Opbrengst 340 mg (68%) met Smp. 115 - 120°C

(ontl.). Rf-waarde 0,56.

Voorbeeld XIX

2-[3-(2-chloorethyl)-2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl-thio]-ethaansulfonzuur cyclohexylammonium-zout.

5

340 mg (1 mmol) 3-(2-chloorethyl)-2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-4-hydroxy-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-oxyde en 240 mg (1 mmol) cyclohexylammonium-2-mercaptoëthaansulfonaat in 2 cm<sup>3</sup> dimethylformamide werden met een spoor trichloorazijnzuur gemengd en 2 dagen bij -25°C bewaard. Vervolgens werd het reactiemengsel met een 20-voudige hoeveelheid ether neergeslagen. Het residu werd gewassen en gedroogd. Opbrengst 400 mg (71%); Smp. 102 - 107°C (ontl.); Rf-waarde 0,63.

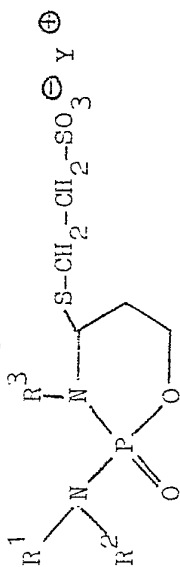
10

15

Overeenkomstig de voorgaande voorbeelden werden nog de volgende verbindingen bereid:

Voorbeelden XX - XXX

Oxazafoosforin-4-thio-alkaansulfonaten met de algemene formule



Voorbeeld No.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Y <sup>⊕</sup>	Smeltpunt of R <sub>f</sub> <sup>1)</sup>
XX	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	$\text{NH}_4^+$	121 - 125°C (ontl.)
XXI	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	$\text{NH}_4^+$	95 - 97°C (ontl.)
XXII	CH <sub>3</sub> -SO <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	$\text{H}^+$ $\text{NH}_3^+$	0,64
XXIII	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	K <sup>⊕</sup>	120 - 123°C (ontl.)
XXIV	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	G	$\text{O}^+$ $\text{NH}_2$	70 - 75°C (ontl.)
XXV	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$(\text{CH}_3-\text{CH}_2)_2\text{NH}_2^+$	0,61
XXVI	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	0,59
XXVII	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$(\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2^+$	0,59
XXVIII	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$\text{NH}_2-\text{C}=\text{NH}_2^+$ $\text{NH}_2$	132 - 134°C
XXIX	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	0,62
XXX	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	Cl-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	H	$(\text{H}_2\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2^+)^{1/2}$	0,61

1) Loopmiddel: ethylacetaat/isopropanol/1 n azijnzuur (5 : 3 : 2)  
Kleuring: onder andere met jodium.

Voorbeeld XXXI

3-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosfo-  
5 rin-4-yl-thio ]-2-mercaptopropaansulfonzuur cyclohexylaminezout.

1,39 g (5 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 1,44 g (5 mmol) 2,3-  
dimercaptopropaansulfonzuur-cyclohexylaminezout werden in 10 cm<sup>3</sup> etha-  
nol opgelost, met trichloorazijnzuur aangezuurd en 2 dagen bij 0°C be-  
waard. Hierna werd het ether neergeslagen, na 20 uren gedecanteerd en  
10 de achterblijvende olie in een hoog vacuum gedroogd. Deze olie stolde.  
Opbrengst 1,8 g (77%) met Smp. vanaf 70°C (ontl.).

Voorbeeld XXXII

2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosfo-  
15 rin-4-yl-thio ]ethaansulfonzuur cis-natriumzout.

2,8 g (10 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide in 10 cm<sup>3</sup> aceton werden  
met 1,3 g (8 mmol) natrium-2-mercaptoëthaansulfonaat in 2 cm<sup>3</sup> water  
gemengd en 3 uren bij 0°C bewaard. Vervolgens werd het reactiemengsel  
in vacuo bij 25°C ingedampt. Het residu werd in watervrije aceton op-  
genomen en in de koude met watervrije ether tot beginnende troebeling  
20 gemengd. Bij het concentreren van de oplossing in vacuo vormde zich  
een neerslag. Opbrengst 1,5 g (44%) van het cis-isomeer; Smp. 83 -  
85°C. Door herkristalliseren in aceton verkreeg men een in aceton  
slecht oplosbaar produkt.

Voorbeeld XXXIII

25 3-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosfo-  
rin-4-yl-thio ]-propaansulfonzuur guanidiniumzout.

14 g (50 mmol) 4-hydroxycyclofosfamide en 11 g (50 mmol) 3-mer-  
captopropaansulfonzuur guanidinezout werden in 100 cm<sup>3</sup> ethanol opge-  
lost, met trichloorazijnzuur gemengd en bij 0°C bewaard. Na 20 uren  
30 voegde men 50 cm<sup>3</sup> ether toe. Het kristallisaat werd na nog 20 uren af-  
gezogen, gewassen en gedroogd.

Opbrengst 18,5 g (78%); Smp. 123 - 132°C (ontl.).

Voorbeeld XXXIV

Preparaten, die als actieve stof 50 mg resp. 200 mg stof 23  
35 volgens volgend overzicht bevatten:

8201227

verbinding volgens voorbeeld XXIII	50 mg	200 mg
mannitol	230 mg	380 mg
water voor injectiedoeleinden tot	2 cm <sup>3</sup>	tot 4 cm <sup>3</sup>

De stof volgens voorbeeld XXIII en mannitol werden telkens onder  
5 begassen met stikstof en bescherming tegen licht in zoveel water opge-  
lost, dat een oplossing van 2 cm<sup>3</sup> resp. 4 cm<sup>3</sup> ontstond. Bij de berei-  
ding en de verdere verwerking werd zo te werk gegaan, dat de tempera-  
tuur van de oplossing niet boven 5°C kwam. De oplossingen werden op  
een bekende wijze steriel gefiltreerd, onder aseptische voorwaarden  
10 in bruine injectiekolfjes van 10 cm<sup>3</sup> voor 2 cm<sup>3</sup> resp. 4 cm<sup>3</sup> gedoseerd,  
van vriesdroogstoppen voorzien en in een vriesdrooginstallatie gelyofi-  
liseerd. Vervolgens werd deze installatie met droge stikstof belucht  
en de ampulflesjes in de installatie gesloten.

Het restant watergehalte van de kolfjes mag niet boven 0,5% lig-  
15 gen.

Voor de bereiding van een direct toepasbare injectieoplossing  
wordt de inhoud van de kolfjes met 50 mg actieve stof in 5 cm<sup>3</sup>, met  
200 mg actieve stof met 10 cm<sup>3</sup> water voor injectiedoeleinden opgelost.

Voorbeeld XXXV

20 Preparaten, die als actieve stof 50 mg resp. 200 mg actieve  
stof volgens voorbeeld XXXIII bevatten, kunnen volgens het volgende  
overzicht worden verkregen:

stof volgens voorbeeld XXXIII	50 mg	200 mg
mannitol	245 mg	430 mg
25 water voor injectiedoeleinden	tot 2 cm <sup>3</sup>	tot 4 cm <sup>3</sup>

De stof van voorbeeld XXXIII en mannitol werden telkens onder  
begassen met stikstof en beschermen tegen licht in zoveel water opge-  
lost, dat een oplossing van 2 cm<sup>3</sup> resp. 4 cm<sup>3</sup> ontstond. Bij de berei-  
ding en de verdere verwerking werd zo te werk gegaan, dat de tempera-  
30 tuur van de oplossing de 5°C niet overschreed. De oplossingen werden  
op een bekende wijze steriel gefiltreerd, onder aseptische voorwaarden  
in bruine injectieflesjes van 10 cm<sup>3</sup> voor 2 cm<sup>3</sup> resp. 4 cm<sup>3</sup> gedoseerd,  
van vriesdroogstoppen voorzien en in een vriesdrooginstallatie gelyo-  
filiseerd. Vervolgens werd de installatie met droge stikstof belucht  
35 en de ampullen in de installatie gesloten.

Het restant watergehalte van de kolfinhoud mag niet boven 0,5% zijn gelegen.

Voor de bereiding van direct toedienbare injectieoplossingen wordt de inhoud van de kolfjes met 50 mg actieve stof in 5 cm<sup>3</sup> en die met 200 mg actieve stof in 10 cm<sup>3</sup> water voor injectiedoeleinden opgelost.

8201227



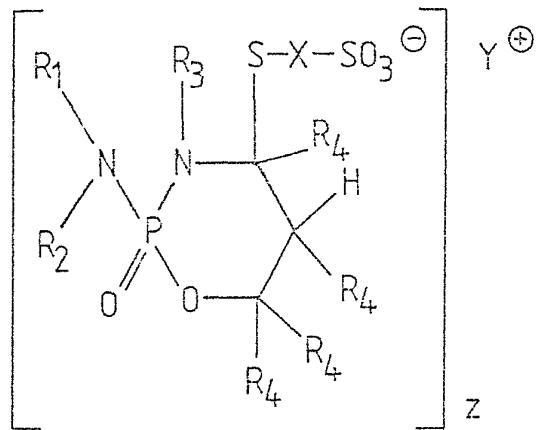
C o n c l u s i e s :

=====

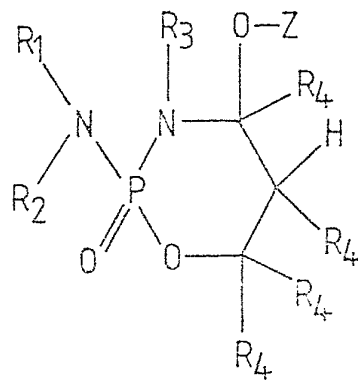
1. Oxazafosforin-4-thioalkaansulfonzuren en hun neutrale zouten met de formule 1, waarin  $R_1$ ,  $R_2$  en  $R_3$  gelijk of verschillend kunnen zijn en waterstof, methyl, ethyl, 2-chloorethyl of 2-methaansulfonyloxyethyl voorstellen en daar-  
5 bij tenminste twee van deze groepen 2-chloorethyl en/of 2-methaansulfonyloxyethyl zijn;  
 $R_4$  waterstof of methyl is;  
X een rechte of vertakte  $C_{2-6}$ -alkyleengroep is, die aan het koolstofatoom op de 1-, 2-, 3-, 4- of 5-plaats van de alkyleenketen een mer-  
10 captogroep kan dragen; en  
 $Y^{\oplus}$  een waterstofkation, een alkalimetaal of aardalkalimetaalkation, het guanidinium-, morfolinium- of cyclohexylammoniumkation of een kation dat is afgeleid van een amine met de formule  $NR_5R_6R_7$  voorstelt, waarbij de groepen  $R_5 - R_7$  gelijk of verschillend zijn en waterstof,  
15  $C_1-C_2$ -alkylgroepen of oxethylgroepen voorstellen, dan wel waarin  $Y^{\oplus}$  het ethyleendiammoniumkation  $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2^{\oplus}-NH_3$  of het piperazoniumkation is en z 1 is, indien  $Y^{\oplus}$  een eenbasisch kation is, of 2 is, indien  $Y^{\oplus}$  een tweebasisch kation is, of het kation van een verbinding met twee eenbasische kationen.
- 20 2. Verbindingen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat in formule 1  $Y^{\oplus}$  een waterstofkation is, een guanidinium-, morfolinium- of cyclohexylammoniumkation of het kation dat is afgeleid van een amine met de formule  $NR_5R_6R_7$ , waarin  $R_5 - R_7$  gelijk of verschillend zijn en waterstof,  $C_1-C_2$ -alkylgroepen of oxyethylgroepen voorstellen, of waar-  
25 in  $Y^{\oplus}$  het ethyleendiammoniumkation  $H_3N^{\oplus}-CH_2CH_2^{\oplus}-NH_3$  of het piperazoniumkation is, en z 1 is, indien  $Y^{\oplus}$  een eenbasisch kation is, of 2 is wanneer  $Y^{\oplus}$  een tweebasisch kation is, of het kation van een verbinding met twee eenbasische kationen.
3. Verbindingen volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat in formule 1  $Y^{\oplus}$  een kalium- of aardalkalimetaalkation is.  
30
4. Verbindingen volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat in formule 1  $Y^{\oplus}$  het cyclohexylammoniumkation is.

5. Verbindingen volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat in formule 1  $Y^{\oplus}$  het guanidiniumkation is.
6. 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonzuur ammoniumzout
- 5 7. 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonzuur cis-natriumzout.
8. 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonzuur cyclohexylammoniumzout.
9. 2-[2-(bis-(2-chloorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazafosforin-4-yl]-thioëthaansulfonzuur kaliumzout.
- 10 10. Werkwijze voor het bereiden van de oxazafosforin-4-thioalkaansulfonzuren en hun neutrale zouten volgens conclusies 1 - 9, met het kenmerk, dat men een 4-hydroxy- of 4-C<sub>1-4</sub>-alkoxy-oxazafosforine met de formule 2, waarin R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> en R<sub>4</sub> de boven weergegeven betekenis bezitten, en Z waterstof of C<sub>1-4</sub>-alkyl is, met een verbinding met de algemene formule 3
- $$HS-X-SO_3^{\ominus} Y^{\oplus}$$
- 15 waarin X en Y<sup>⊕</sup> de boven weergegeven betekenis bezitten, omzet en indien Y<sup>⊕</sup> waterstof is, het verkregen oxazafosforin-4-thioalkaansulfonzuur met een base neutraliseert, die overeenkomt met een van de andere betekenissen voor Y<sup>⊕</sup>.
- 20 11. Werkwijze voor het bereiden van oxazafosforine-4-thioalkaansulfonzuren en hun neutrale zouten volgens conclusies 1 - 10, met het kenmerk, dat men een verbinding met de formule 2, waarin R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> en R<sub>4</sub> dezelfde betekenis hebben als in conclusie 1 en Z waterstof of C<sub>1-4</sub>-alkyl is, met een verbinding met de formule 3 omzet, waarin Y<sup>⊕</sup> van een optisch actieve base is afgeleid, die niet met een gegeven definitie van Y overeenkomt, en na deze omzetting deze andere optisch actieve base tegen waterstof of een base volgens een van de definities voor Y
- 30 uitwisselt.
12. Werkwijze volgens conclusie 10 of 11, met het kenmerk, dat men het kation Y<sup>⊕</sup> van een oxazafosforine-4-thioalkaansulfonaat over een ionenuitwisselaar tegen een ander kation Y<sup>⊕</sup> uitwisselt.
- 35 13. Farmaceutische preparaten met daarin als actieve stof een verbinding volgens conclusies 1 - 9, naast gebruikelijke fysiologisch geschikte dragerstoffen en/of verdunningsmiddelen.

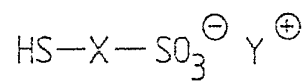
1



2



3



8201227