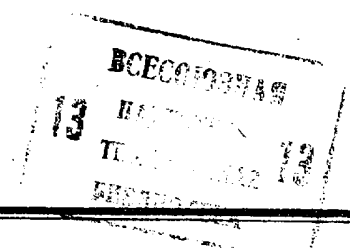




ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

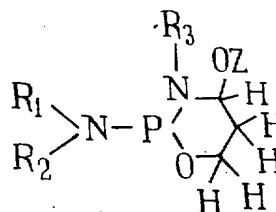
К ПАТЕНТУ



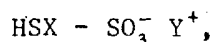
- (21) 3414100/23-04
- (22) 23.03.82
- (31) P 3111428.8
- (32) 24.03.81
- (33) DE
- (46) 15.06.87. Бюл. № 22
- (71) Аста-Верке АГ Хемисхе Фабрик (DE)
- (72) Герхард Шеффлер, Ульф Нимейер, Норберт Брок и Йёрг Поль (DE)
- (53) 547.341.07(088.8)
- (56) Патент Великобритании № 2021591, кл. C 07 F 9/24, 1979.
- Матковский М.Д. Лекарственные средства. Т.2, М.: Медицина, 1972, с.489.
- (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОКСАЗАФОСФОРИНО-4-ТИОАЛКАНСУЛЬФОКИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ
- (57) Способ получения оксазафосфорино-4-тиоалкансульфокислоты или ее нейтральных солей общей формулы

X - C₂-C₃ - алкилен или меркаптопропан;
 Y - циклогексиламмоний, натрий, аммоний или гуанидин,

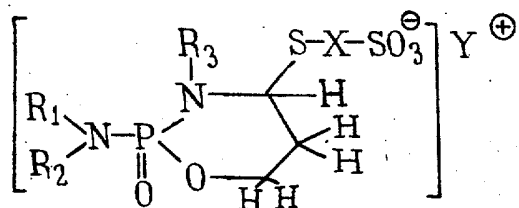
отличающийся тем, что 4-окси-оксазафосфорин или 4-алкокси-оксазафосфорин формулы



где R₁, R₂ и R₃ имеют указанные значения; Z-H водород или C₁-C₄-алкил, подвергают взаимодействию с соединением формулы



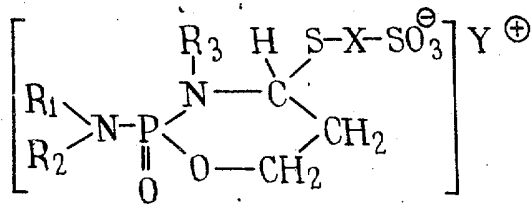
где X и Y имеют указанные значения в среде растворителя при температуре плюс 30°C - минус 25°C, при необходимости в среде трихлоруксусной кислоты с последующим выделением целевого продукта или с последующей нейтрализацией полученного продукта соответствующим основанием или переводом полученной аммонийной соли в соль щелочного металла на ионообменнике.



где R₁ и R₃ - водород или Cl-CH₂CH₂-;
 R₂ - Cl-CH₂CH₂-;

(19) SU (11) 1318167 A3

Изобретение относится к химии фосфорорганических соединений, а именно, к способу получения оксазафосфино-4-тиоалкансульфокислоты и ее нейтральных солей общей формулы



где R_1 и R_3 - водород или $Cl-CH_2CH_2$;

R_2 - $Cl-CH_2CH_2$;

X - C_2-C_3 -алкилен или меркаптопропан;

Y - циклогексиламмоний, натрий, аммоний или гуанидин,

которые обладают противоопухолевым действием и могут использоваться при лечении раковых заболеваний и для подавления иммунитета.

Целью изобретения является разработка способа получения оксазафосфино-4-тиоалкансульфокислоты и ее нейтральных солей, обладающих противоопухолевой активностью.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Циклогексиламмониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

5,6 г (20 ммоль) 4-оксициклофосфамида (т.е. 2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-4-окси-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксид) и 4,8 г (20 ммоль) циклогексиламмоний-2-меркаптоэтансульфоната растворяют в 100 мл дистиллированной воды, смешивают с небольшим количеством трихлоруксусной кислоты и оставляют стоять на 3 дня при $0^{\circ}C$ в холодильнике. После этого растворитель удаляют при высоком вакууме, остаток переносят в ацетон, снова испаряют, кристаллизуют из изопропанола. Выход 7,2 г (72% от теории), т.пл. $149-151^{\circ}C$ (цис-форма).

Пример 2. Циклогексиламмониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]этансульфокислоты.

2,9 г (10 ммоль) 2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-4-метокситетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида и 2,4 г (10 ммоль) циклогексиламмоний-

-2-меркаптоэтансульфоната растворяли с небольшим количеством трихлоруксусной кислоты и 10 мл диметилформамида, и выдерживали в течение 20 ч при

$-25^{\circ}C$. После дополнительного 3 ч выдерживания при $0^{\circ}C$ смешивали с эфиром до начинающегося помутнения, растирали, отсасывали кристаллизат после выдерживания в течение 20 ч при $0^{\circ}C$, промывали и высушивали.

Выход 4,7 г (94% от теории), т.пл. $145^{\circ}C$ (разл.). Перекристаллизовывали из смеси спирт/эфир, т.пл. $149-151^{\circ}C$ (цис-форма).

Пример 3. Циклогексиламмониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

1,4 г (5 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 1,2 г (5 ммоль) циклогексиламмоний-2-меркаптоэтансульфоната вместе с небольшим количеством (следы) трихлоруксусной кислоты растворяют в 25 мл метанола и оставляют стоять в течение ночи при $-25^{\circ}C$ в холодильнике. Непосредственно после этого реакционный раствор испаряют приблизительно до 5 мл, добавляют эфир до появления помутнения и растирают. Кристаллизат отсасывают после 20 ч стояния при $0^{\circ}C$, промывают и высушивают.

Выход 2,1 г (84% от теории), т.пл. $143-145^{\circ}C$ (цис-форма).

Пример 4. Натриевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

2,5 г (5 ммоль) циклогексиламмоний-2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-(4-ил)-тио-этансульфоната растворяют в 25 мл воды, свободной от растворенного кислорода, и пропускают через колонку с катионообменной смолой марки Мерк, наполненную ионами натрия. Элюат пропускают над азотом, высушивают вымораживанием и твердый остаток высушивают в вакууме над пентаоксидом фосфора.

Выход 1,9 г (91% от теории), т.пл. $78-83^{\circ}C$ (разл.), значение рефракции 0,61 (элюирующая жидкость: этилацетат/изопропанол) 1 н.уксусная кислота (5:3:2).

Пример 5. Аммониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-

-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

2,8 г (10 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 1,6 г (10 ммоль) аммоний-2-меркаптоэтансульфоната растворяют вместе с каталитическим количеством трихлоруксусной кислоты в 50 мл воды и оставляют стоять в течение 3 дней при 0°С в холодильнике. После этого воду отгоняют в высоком вакууме, остаток дважды вносят в ацетон и испаряют в вакууме. Перекристаллизовывают из смеси ацетон/эфир.

Выход 3,9 г (93% от теории), т.пл. 131-133°С (цис-форма).

Пример 6. Аммониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

2,8 г (10 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 1,6 г (10 ммоль) аммоний-2-меркаптоэтансульфоната с каталитическим количеством трихлоруксусной кислоты растворяют в 10 мл диметилформамида и выдерживают в холодильнике при -25°С в течение 20 ч. После дополнительного выдерживания в течение 5 ч при 0°С смешивают с эфиром до начала появления помутнения и растирают. Кристаллизат отсасывают через 1 день при 0°С, промывают, высушивают и перекристаллизовывают из н-пропанола.

Выход 3,2 г (77% от теории), цис-форма, т.пл. 132°С.

Пример 7. Натриевая соль 3-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-пропансульфокислоты.

5,4 г (20 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 5,2 г (20 ммоль) циклогексил-аммоний-3-меркаптопропансульфоната растворяют в 100 мл воды, смешивают с небольшим количеством трихлоруксусной кислоты и оставляют стоять в течение 1 дня при 0°С. После этого реакционную смесь испаряют в вакууме, концентрированный остаток пропускают через колонку катионообменную, наполненную ионами натрия, элюат испаряют в вакууме, остаток растворяют в сухом этаноле, фильтруют и осаждают эфиром.

Выход 5,5 г (63% от теории), т.пл. 75-79°С, значение рефракции 0,64 элюирующая жидкость: этилацетат-изо-пропанол:1 н.уксусная кислота (5:3:2).

Пример 8. Натриевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

1,6 г (5 ммоль) 2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-4-этокситетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида и 0,8 г (5 ммоль) натрий-2-меркаптоэтансульфоната в 10 мл диметилформамид смешивают со следами трихлоруксусной кислоты и оставляют стоять на ночь при -25°С. Непосредственно после этого и реакционной смеси добавляют 20 мл эфира. Остаток отсасывают после 20 ч стояния при 0°С, промывают и высушивают.

Выход 1,5 г (71% от теории), т.пл. 145-150°С (разл.), значение рефракции: 0,56.

Пример 9. 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислота.

0,8 г (3,0 ммоль) 4-оксициклофосфамида в 3 мл воды смешивают при охлаждении воды с льдом с 420 мг (3,0 ммоль) 2-меркаптоэтансульфокислоты. Через 1 ч испаряют в высоком вакууме и кристаллизуют.

Выход 1,1 г (92% от теории), т.пл. 75-78°С.

Пример 10. 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислота.

2,0 г (4 ммоль) циклогексил-аммоний-2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил]-тиоэтансульфоната растворяют в небольшом количестве воды и пропускают через катионообменную колонку, наполненную ионами водорода, при охлаждении до 4°С. Элюат непосредственно после этого осушают вымораживанием и перекристаллизовывают из смеси диметилформамид/хлороформ.

Выход 1,2 г (75% от теории), т.пл. 75-78°С, значение рефракции: 0,58 элюирующая жидкость: этилацетат-изо-пропанол:1 н.уксусная кислота (5:3:2).

Пример 11. Аммониевая соль 2-[2-(бис)-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

720 мг (1,8 ммоль) 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксотетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-

-этансульфо кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нейтрализуют аммиаком и смешивают с 4 мл ацетона. Реакционный раствор оставляют стоять в течение ночи при -25°C . Кристаллизат отсасывают и перекристаллизовывают из смеси метанол/ацетон.

Пример 12. Циклогексиламмониевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-6-метил-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфо кислоты.

1,45 г (5 ммоль) 2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-4-окси-6-метилтетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида и 1,2 г (5 ммоль) циклогексиламмоний-2-меркаптоэтансульфоната растворяют в 5 мл воды и 5 мл ацетона, подкисляют трихлоруксусной кислотой и оставляют стоять на 20 ч при 0°C . Непосредственно после этого фильтруют, фильтрат осторожно испаряют в вакууме, остаток дважды вносят в ацетон и испаряют. Снова остаток растворяют в ацетоне, охлаждают эфиром, промывают эфиром и высушивают.

Выход 1,4 г (56% от теории), т.пл. $120-125^{\circ}\text{C}$ (разл.), Rf 0,61.

Пример 13. Натриевая соль 3-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-2-метил-пропансульфо кислоты.

27 г (1 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 192 мг (1 ммоль) натрий-3-меркапто-2-метил-пропансульфоната растворяют в 4 мл воды, смешивают со следами трихлоруксусной кислоты и оставляют стоять 20 ч при 0°C . После испарения в вакууме остаток дважды растворяют в сухом этаноле и далее испаряют и затем осаждают в смеси спирт/эфир.

Выход 420 мг (86% от теории), Rf 0,61.

Пример 14. Натриевая соль 6-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-гексансульфо кислоты.

277 мг (1 ммоль) 1-оксициклофосфамида и 220 мг (1 ммоль) натрий-6-меркаптогексансульфоната вместе со следами трихлоруксусной кислоты растворяют в 4 мл воды и оставляют стоять 20 ч при 0°C . Непосредственно после этого реакционную смесь осторожно испаряют в вакууме, остаток дважды растворяют в сухом этаноле и

снова испаряют. Остаток вносят в спирт и осаждают эфиром.

Выход 350 мг (70% от теории), Rf 0,58.

Пример 15. Циклогексиламмониевая соль 2-[3-(2-хлорэтил)-2-(2-хлорэтиламино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфо кислоты.

277 мг (1 ммоль) 3-(2-хлорэтил)-2-(2-хлорэтиламино)-окситетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида и 240 мг (1 ммоль) циклогексиламмоний-2-меркаптоэтансульфоната растворяют в 4 мл воды, смешивают со следами трихлоруксусной кислоты и оставляют на 20 ч при 0°C . Реакционный раствор, упаренный в вакууме, дважды растворяют в этаноле и снова испаряют. Непосредственно после этого вносят в этанол и осаждают эфиром.

Выход 340 мг (68% от теории), т.пл. $115-120^{\circ}\text{C}$ (разл.), Rf 0,56.

Пример 16. Циклогексиламмониевая соль 2-[3-(2-хлорэтил)-2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксо-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфо кислоты.

340 мг (1 ммоль) 3-(2-хлорэтил)-2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-4-окси-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида и 240 мг (1 ммоль), циклогексиламмоний-2-меркаптоэтансульфоната в 2 мл диметилформамида смешивают со следами трихлоруксусной кислоты и выдерживают 2 дня при -25°C . Непосредственно после этого реакционную смесь обрабатывают 20-кратным количеством эфира, выпавший осадок промывают и высушивают.

Выход 400 мг (71% от теории), т.пл. $102-107^{\circ}\text{C}$ (разл.). Rf 0,63.

Пример 17. В соответствии с описанными примерами было получено соединение, где R_1 и R_2 -Cl- CH_2CH_2 ; R_3 -H; X- CH_2CH_2 , т.пл. $132-134^{\circ}\text{C}$.

Пример 18. Соль циклогексиламины 3-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксотетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-2-меркаптопропансульфо кислоты.

1,39 г (5 ммоль) 4-оксициклофосфамида и 1,44 г (5 ммоль) соли циклогексиламины 2,3-димеркаптопропансульфо кислоты растворяют в 10 мл этанола, подкисляют трихлоруксусной кислотой и оставляют на 2 дня при 0°C . После этого осаждают эфиром,

через 20 ч декантируют и оставшееся масло высушивают в высоком вакууме, Масло застывает.

Выход 1,8 г (77% от теории), т.пл. выше 70°C (разл.).

Пример 19. Цис-натриевая соль 2-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксотетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-этансульфокислоты.

2,8 г (10 ммоль) 4-оксициклофосфамида в 10 мл ацетона смешивают с 1,3 г (8 ммоль) натрий-2-меркаптоэтансульфоната в 2 мл воды и оставляют на 3 ч при 0°C. Непосредственно после этого реакционную смесь испаряют в вакууме при 25°C, остаток вносят в сухой ацетон и смешивают на холоду с сухим эфиром до начала помутнения. При испарении раствора в вакууме образуется осадок.

Выход 1,5 г (44% от теории) цис-изомера, т.пл. 83-85°C. В результате перекристаллизации из ацетона получают продукт, плохо растворяющийся в ацетоне.

Пример 20. Соль гуанидина 3-[2-(бис)-2-хлорэтил(амино)-2-оксотетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-4-ил-тио]-пропансульфокислоты.

14 г (50 ммоль) 2-оксициклофосфамида и 11 г (50 ммоль) 3-меркаптопропансульфокислоты соли гуанидина растворяют в 100 мл этанола, подкисляют трихлоруксусной кислотой и выдерживают при 0°C. Через 20 ч добавляют 50 мл эфира. Кристаллизат отсасывают еще через 20 ч, промывают и высушивают.

Выход 18,5 г (78% от теории), т.пл. 128-132°C (разл.).

Пример 21. Аналогично примеру 1 1,1 г (4 ммоль) 4-оксициклофосфамида в 15 мл ацетона смешивали с раствором 0,96 г (4 ммоль) 2-циклогексиламиносоли меркаптоэтансульфокислоты в 4 мл воды и со следом трихлоруксусной кислоты. В течение 2 ч нагревали до 30°C. Вслед за этим охлаждали до 4°C, отсасывали, взмучивали кристаллизат с небольшим количеством ацетона, отсасывали, дополнительно промывали эфиром и сушили при помощи фосфорного ангидрида в вакууме.

Выход 1,2 г (60% от теории), т.пл. 139-142°C (разложение).

Данные элементного анализа представлены в таблице.

Соединения в соответствии с предлагаемым способом могут применяться при лечении раковых заболеваний и для подавления иммунитета. Они обладают сильным противоопухолевым действием, обладают высокой активностью при парентеральном или при оральном введении, а также незначительной общей токсичностью. Они обладают *in vivo* высокой карциногенотоксичной селективностью и *in vitro* высокой цитотоксичной специфичностью.

Для установления карциногенотоксичного действия вещества были испытаны на животных в ряду опухолей различной хеморезистентности. Для оценки определяли с помощью пробит-анализа из отношения между логарифмом дозы и частотой вылеченных и выживших подопытных животных среднюю эффективно действующую дозу - [LC 50 (мг/кг)]. В качестве сравнительного вещества, которое по химическому строению близко к продуктам в соответствии с изобретением, было взято торговое соединение циклофосфамид.

В случае лимфатической лейкемии 1 5222 крыс (штамм В IX) эта средняя эффективная доза при однократном внутривенном введении на 5-ый день инокуляции лейкемии составляла для продуктов в соответствии с изобретением, также как и для циклофосфамида 1,5 мг/кг.

При хемосенситивной *Joshida Aszites Karzinosarkom* (линия АН 13) крыс (штамм *Spragne Dawley*) эта доза LC 50 для продуктов в соответствии с изобретением, а также для сравнительного вещества циклофосфамида составляла 1 мг/кг.

Для исследования цитотоксичной специфичности *in vitro* соответственно около $3 \cdot 10^7$ стерильно полученных клеток хеморезистентной *Joshida - Aszites - Karzinosarkoms* (линия АН 13, штамм АСТА) были инкубированы с увеличивающейся концентрацией продуктов в соответствии с изобретением при 37°C в течение 2 ч и после многократного промывания были имплантированы в брюшную полость испытуемых животных. Из отношения логарифмов концентраций и количества развившихся опухолей с помощью пробит-анализа были определены средние цитотоксичные дозы CE 50 (мг/мл). При этих условиях опыта CE 50 про-

дуктов в соответствии с изобретением
лежит между 5 и 5 мг/мл.

Определение внутривенной токсичности осуществляли на крысе в соответствии с международной постановкой опыта по Миллеру (Miller) и Тейнтеру (Tainter).

Токсичность указана как LD₅₀ в мг/кг. LD₅₀ является той дозой, при которой 50% подопытных животных погибают.

Результаты испытаний по примерам LD₅₀ следующие.

Пример № при внутривенном введении крысе

1	250
4	300
5	300
7	300

18	300
28	300
31	300
33	300

Циклофосфамид 185

10 Для продуктов, полученных согласно предлагаемому изобретению летальная доза LD₅₀ при однократном внутривенном введении, составляет около 300 мг/кг. Определенная для сравнения средняя летальная доза циклофосфамида при внутривенном введении составляет 185 мг/кг.

15 Таким образом, полученные продукты обладают приблизительно на 20% меньшей острой токсичностью или при таком же куративном действии соответственно большей терапевтической широтой.

Соединение, №	Рассчитано			Найдено		
	С	Н	N	С	Н	N
1	36,0	6,45	8,39	35,8	6,5	8,4
2	36,0	6,45	8,39	35,8	6,5	8,4
3	36,0	6,45	8,39	35,8	6,5	8,4
4	25,54	4,28	6,62	25,1	4,2	6,3
5	25,84	5,30	10,05	25,7	5,3	10,1
6	25,84	5,30	10,05	25,7	5,3	10,1
7	27,47	4,61	32,03	27,1	4,6	31,7
8	25,54	4,28	6,62	25,1	4,2	6,3
9	26,94	4,77	6,98	26,8	4,8	6,7
10	26,94	4,77	6,98	26,8	4,8	6,7
11	25,84	5,30	10,05	25,7	5,3	10,1
12	37,35	6,66	8,17	37,5	6,8	8,1
13	29,27	4,91	6,21	28,9	4,8	6,1
14	32,57	5,47	5,85	32,1	5,4	5,5
15	36,0	6,45	8,39	35,6	6,4	8,2

