



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 648 852 A5

⑤ Int. Cl. 4: C 07 F 9/65
A 61 K 31/675

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (A 61 K 31/675, 31:665, 31:185)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑲ Gesuchsnummer: 1390/82

⑲ Inhaber:
Asta-Werke Aktiengesellschaft Chemische Fabrik,
Bielefeld 14 (DE)

⑳ Anmeldungsdatum: 08.03.1982

㉓ Priorität(en): 24.03.1981 DE 3111428

⑳ Erfinder:
Scheffler, Gerhard, Dr., Bielefeld 12 (DE)
Niemeyer, Ulf, Dr., Bielefeld 1 (DE)
Brock, Norbert, Prof. Dr. Dr., Bielefeld 1 (DE)
Pohl, Jörg, Dr., Halle (DE)

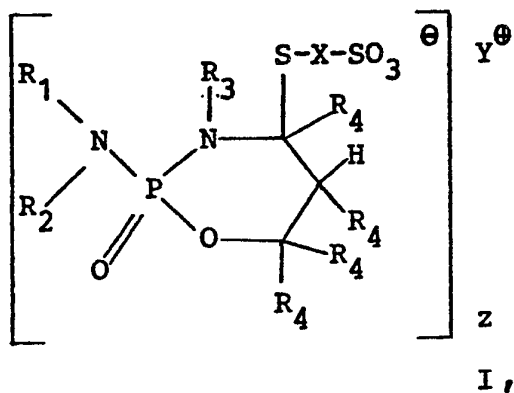
㉔ Patent erteilt: 15.04.1985

㉕ Patentschrift
veröffentlicht: 15.04.1985

㉔ Vertreter:
Dietlin, Mohnhaupt & Cie, Genève

⑤④ Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren, ihre neutralen Salze, Verfahren zur Herstellung derselben und diese enthaltenden pharmazeutischen Präparate.

⑤⑦ Neue Oxaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I

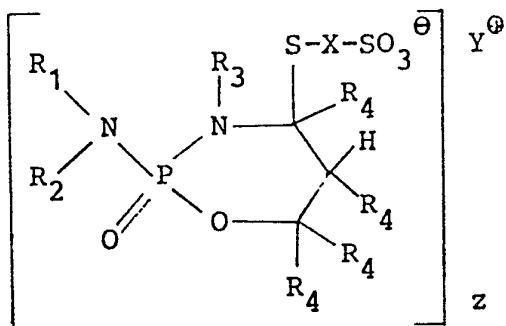


Verfahren zu ihrer Herstellung und diese enthaltende pharmazeutische Zubereitung. Die Bedeutung der in Formel I verwendeten Symbole ist im Patentanspruch 1 definiert.

Die Verbindungen (I) eignen sich insbesondere als Mittel gegen Krebs und zur Immunsuppression.

PATENTANSPRÜCHE

1. Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I



worin

R₁, R₂ und R₃, 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,

R₄ Wasserstoff oder Methyl ist,

X ein gerad- oder verzweigt-kettiges C₂₋₆-Alkylen ist, das eine Mercaptogruppe an dem 1-, 2-, 3-, 4- oder 5-ständigen Kohlenstoffatom der Alkylkette haben kann, und Y[⊕] das Wasserstoffkation, ein Alkali- oder Erdalkaliumkation, das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel NR₅R₆R₇ ableitet, worin die Reste R₅ bis R₇ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C₁₋₂-Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder worin Y[⊕] das Ethylen-diammoniumkation H₃N[⊕]-CH₂CH₂-N[⊕]H₃ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y[⊕] ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y[⊕] ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist.

2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Formel I Y[⊕] ein Kalium- oder Erdalkaliumkation ist.

3. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Formel I Y[⊕] das Cyclohexylammoniumkation ist.

4. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Formel I Y[⊕] das Guanidiniumkation ist.

5. 2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsäure cis-Natriumsalz gemäss Anspruch 1.

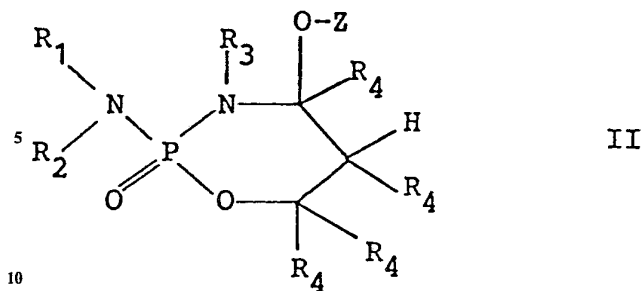
6. 2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsäure Ammoniumsalz gemäss Anspruch 1.

7. 2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsäure Cyclohexylammoniumsalz gemäss Anspruch 1.

8. 2-[2-(Bis-(2-chlorethyl)-amino)-2-oxo-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-4-yl]-thioethansulfonsäure Kaliumsalz gemäss Anspruch 1.

9. Verfahren zur Herstellung der Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutralen Salze der Formel I gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein 4-Hydroxy- oder 4-C₁₋₄-Alkoxyoxazaphosphorin der allgemeinen Formel II

2



worin R₁, R₂, R₃ und R₄ die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C₁₋₄-Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



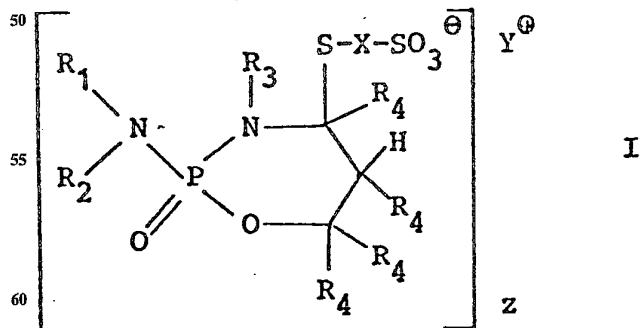
worin X und Y[⊕] die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben, umgesetzt und gegebenenfalls, falls Y[⊕] Wasserstoff ist, die erhaltene Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäure mit einer der den anderen Bedeutungen von Y[⊕] entsprechenden Base neutralisiert.

10. Verfahren zur Herstellung von Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonsäuren und deren neutralen Salzen der Formel I gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel II, definiert im Anspruch 9, worin R₁, R₂, R₃ und R₄ die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C₁₋₄-Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III, definiert im Anspruch 9, umsetzt, worin Y[⊕] sich von einer optisch aktiven Base ableitet, die nicht der im Anspruch 1 angegebenen Definition von Y entspricht, und nach der Umsetzung diese andere optische aktive Base gegen Wasserstoff oder eine Base gemäss der im Anspruch 1 angegebenen Definition von Y austauscht.

11. Verfahren gemäss Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass man das Kation Y[⊕] eines Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonats an einem Ionenaustauscher gegen ein anderes Kation Y[⊕] austauscht.

12. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend als Wirkstoff eine Verbindung gemäss Anspruch 1 neben physiologisch verträglichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln.

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



worin

R₁, R₂ und R₃, 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,

R₄ Wasserstoff oder Methyl ist, X ein gerad- oder verzweigtketziges C₂₋₆-Alkylen ist, das eine Mercaptogruppe an dem 1-, 2-, 3-, 4- oder 5ständigen Kohlenstoffatom der Alkylkette haben kann, und Y[⊕] das Wasserstoffkation, ein Alkali- oder Erdalkalikation, das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel NR₅R₆R₇ ableitet, worin die Reste R₅ bis R₇ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C₁-C₂-Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder worin Y[⊕] das Ethylendiammoniumkation H₃N[⊕]-CH₂CH₂-N[⊕]H₃ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y[⊕] ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y[⊕] 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[⊕] das Guanidinium-, Morpholinium- oder Cyclohexylammoniumkation oder das Kation, welches sich von einem Amin der Formel NR₅R₆R₇ ableitet, worin die Reste R₅ bis R₇ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, C₁-C₂-Alkylgruppen oder Oxyethylgruppen bedeuten, oder worin Y[⊕] das Ethylendiammoniumkation H₃N[⊕]-CH₂CH₂-N[⊕]H₃ oder das Piperazoniumkation ist und z 1 ist, wenn Y[⊕] ein einbasisches Kation ist, oder 2 ist, wenn Y[⊕] ein zweibasisches Kation oder das Kation einer Verbindung mit zwei einbasischen Kationen ist.

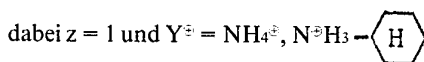
Andere günstige Eigenschaften haben auch die Kalium- und Erdalkalisalze der Säuren der Formel I und sind daher bevorzugt.

Unter den mit Stickstoffbasen neutralisierten Säuren der Formel I sind ganz besonders bevorzugt die Ammoniumsalze, in denen Y[⊕] das NH₄[⊕]-Kation ist, die Cyclohexylammoniumsalze, in denen Y[⊕] das C₆H₁₁NH₃[⊕]-Kation ist, bzw. die Guanidiniumsalze, in denen Y[⊕] das N[⊕]H₂=C(NH₂)₂-Kation ist.

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

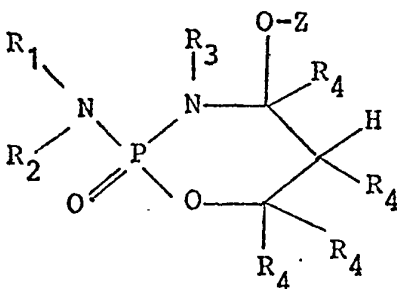
Zählung der Stellung der Mercaptogruppe in der Alkylen-Gruppe X beginnt mit dem die Sulfonsäuregruppe tragenden C-Atom.

Von besonderer Bedeutung sind diejenigen Verbindungen der Formel I, in denen R₁ und R₂ die 2-Chlorethylgruppe, R₃ und R₄ Wasserstoff darstellen, X die Ethylengruppe und



oder N[⊕]H₂=C(NH₂)₂ oder X = (CH₂)₃, z = 1, und dabei Y[⊕] = N[⊕]H₂=C(NH₂)₂ ist.

Die erfindungsgemässen Oxazaphosphorin-4-thio-alkan-sulfonsäuren und deren neutrale Salze der allgemeinen Formel I werden erfindungsgemäss dadurch erhalten, dass man ein 4-Hydroxy- oder 4-C₁₋₄-Alkoxy-oxazaphosphorin der allgemeinen Formel II



II

worin R₁, R₂, R₃ und R₄ die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben und Z Wasserstoff oder C₁₋₄-Alkyl ist, mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



worin X und Y[⊕] die gleiche Bedeutung wie in Formel I haben, umgesetzt und, falls Y[⊕] Wasserstoff ist, die erhaltene Oxazaphosphorin-4-thio-alkan-sulfonsäure gegebenenfalls mit einer der der anderen Bedeutung von Y[⊕] 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, Methylethylketon, 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°C, vorzugsweise -30°C bis +60°C, insbesondere bei -30°C bis +40°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 AlCl₃, ZnCl₂ oder TiCl₄ durchgeführt werden.

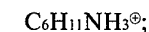
Das Kation Y[⊕] eines Sulfonats gemäss Formel I kann gegen ein anderes Kation ausgetauscht werden, z.B. an einem entsprechend beladenen Ionenaustauscher. Dieser Austausch empfiehlt sich in solchen Fällen, wo ein Salz mit einem bestimmten Kation Y[⊕] sich schlecht nach dem erfindungsgemässen Verfahren herstellen lässt. Das gewünschte Salz kann so aus einem anderen gut herstellbaren Salz mit hoher Ausbeute gewonnen werden.

Die neuen Verbindungen der Formel I können durch übliche Aufarbeitungsverfahren für derartige Produkte, insbesondere durch Kristallisation, Fällung oder chromatographische Reinigung wie insbesondere an Sephadex isoliert werden. Die Struktursicherung erfolgt z.B. 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[⊕] ein Alkalikation ist, handelt es sich insbesondere um das Natrium- oder Kaliumsalz; falls Y[⊕] ein Erdalkalikation ist, handelt es sich insbesondere um das neutrale Kalzium- oder Magnesiumsalz; falls Y[⊕] ein Cyclohexylammoniumkation ist, handelt es sich um das folgende Kation:



falls Y[⊕] 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, 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-Hydroxyoxazaphosphorinen 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 GB-OS 8 029 222 aus und hydrolysiert diese Verbindung zu optisch aktivem 4-Hydroxy-cyclophosphamid. In einem weiteren Verfahren wird beispielsweise optisch aktives Cyclophosphamid (DE-OS 2 944 106) in einem beschriebenen Verfahren [Peter et al., Cancer Treatment Reports 60, 429 (1976)] zu optisch aktivem 4-Hydroxycyclophosphamid umgesetzt.

Zur Racematspaltung kommen beispielsweise als optisch aktive Basen zum Beispiel 1-Phenylethylamin, Brucin, Chinidin, Strychin und Cinchonin sowie weitere Basen und Methoden in Frage, die in «Optical Resolution Procedures for Chemicals Compounds», Vol. 2, Paul Newman, 1981, Vorlage 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 einge-

setzt 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 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.

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 [DL 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 45 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 un behandelter Wirtstiere implantiert. Aus der Beziehung zwischen den Logarithmen der Konzentrationen und den Häufigkeiten sich entwickelnder Tumore wurden 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 Transport-

form-Verbindung keine zytotoxische Aktivität aufweist, wurde in diesen Untersuchungen als Vergleichssubstanz der aktive 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 erfindungsgemässen Verbindungen sind zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen und Zubereitungen geeignet. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen beziehungsweise Arzneimittel enthalten als Wirkstoff einen oder mehrere der erfindungsgemässen Verbindungen, gegebenenfalls in Mischung mit anderen pharmakologisch beziehungsweise pharmazeutisch wirksamen Stoffen. Die Herstellung der Arzneimittel erfolgt in bekannter Weise, wobei die bekannten und üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffe sowie sonstige übliche Träger- und Verdünnungsmittel verwendet werden können.

Als derartige Träger- und Hilfsstoffe kommen zum Beispiel solche Stoffe in Frage, die in folgenden Literaturstellen als Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete empfohlen beziehungsweise angegeben sind: Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Band 4 (1953), Seite 1 bis 39; Journal of Pharmaceutical Sciences, Band 52 (1963), Seite 918 u. ff., H. v. Czetsch-Lindenwald, Hilfsstoffe für Pharmazie und angrenzende Gebiete; pharm. Ind., Heft 2, 1961, Seite 72 u. ff.; Dr. H. P. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete Cantor KG, Aulendorf in Württemberg 1971.

Beispiele hierfür sind Gelatine, natürliche Zucker wie Rohrzucker oder Milchzucker, Lecithin, Pektin, Stärke (zum Beispiel Maisstärke), Alginsäure, Tylose, Talkum, Lycopodium, Kieselsäure (zum Beispiel kolloidale), Cellulose, Cellulosederivate (zum Beispiel Celluloseäther, bei denen die Cellulose-Hydroxygruppen teilweise mit niederen gesättigten aliphatischen Alkoholen und/oder niederen gesättigten aliphatischen Oxyalkoholen veräthert sind, zum Beispiel Methylxypropylcellulose), Stearate, Magnesium- und Calciumsalze von Fettsäuren mit 12 bis 22 C-Atomen, insbesondere der gesättigten (zum Beispiel Stearate), Emulgatoren, Öle und Fette, insbesondere pflanzliche (zum Beispiel Erdnussöl, Rhizinusöl, Olivenöl, Sesamöl, Baumwollsaatöl, Maisöl, Weizenkeimöl, Sonnenblumensamenöl, Kabeljau-Leberöl, Mono-, Di- und Triglyceride von gesättigten Fettsäuren $C_{12}H_{24}O_2$ bis $C_{18}H_{36}O_2$ und deren Gemische), pharmazeutisch verträgliche ein- oder mehrwertige Alkohole und Polyglykole wie Polyäthylenglykole sowie Derivate hiervon, Ester von aliphatischen gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren (2 bis 22 C-Atome, insbesondere 10 bis 18 C-Atome) mit einwertigen aliphatischen Alkoholen (1 bis 20 C-Atome) oder mehrwertigen Alkoholen wie Glykolen, Glycerin, Diäthylenglykol, Pentaerythrit, Sorbit, Mannit und so weiter, die gegebenenfalls auch veräthert sein können, Benzylbenzoat, Dioxolane, Glycerinformale, Tetrahydrofurfurylalkohol, Polyglycoläther mit C_1 - C_{12} -Alkoholen, Dimethylacetamid, Lactamide, Lactate, Äthylcarbonate, Silicone (insbesondere mittelviskose Dimethylpolysiloxane) Magnesiumcarbonat und ähnliche.

Zur Herstellung von Lösungen kommen beispielsweise Wasser oder physiologisch verträgliche organische Lösungsmittel in Frage, wie zum Beispiel Äthanol, 1,2-Propylenglykol, Polyglykole und deren Derivate, Dimethylsulfoxyd, Fettalkohole, Triglyceride, Partialester des Glycerins, Paraffine und ähnliche.

Bei der Herstellung der Zubereitungen können bekannte und übliche Lösungsvermittler, beziehungsweise Emulgatoren, verwendet werden. Als Lösungsvermittler und Emulgatoren kommen beispielsweise in Frage: Polyvinylpyrro-

lidon, Sorbitanfettsäureester wie Sorbitantrioleat, Lecithin, Acacia, Tragacanth, polyoxyäthyliertes Sorbitanmonooleat, polyoxyäthylierte Fette, polyoxyäthylierte Oleotriglyceride, linolisierte Oleotriglyceride, Polyäthylenoxyd-Kondensationsprodukte von Fettalkoholen, Alkylphenolen oder Fettsäuren oder auch 1-Methyl-3-(2-hydroxyäthyl)-imidazolidon-(2). Polyoxyäthyliert bedeutet hierbei, dass die betreffenden Stoffe Polyoxyäthylenketten enthalten, deren Polymerisationsgrad im allgemeinen zwischen 2 bis 40 und insbesondere zwischen 10 bis 20 liegt.

Solche polyoxyäthylierten Stoffe können beispielsweise durch Umsetzung von hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen (beispielsweise Mono- oder Diglyceride oder ungesättigte Verbindungen wie zum Beispiel solchen die Ölsäurereste enthalten) mit Äthylenoxyd erhalten werden (zum Beispiel 40 Mol Äthylenoxyd pro Mol Glycerid).

Beispiele für Oleotriglyceride sind Olivenöl, Erdnussöl, Rhizinusöl, Sesamöl, Baumwollsaatöl, Maisöl (siehe auch Dr. H. P. Fiedler «Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete» 1971, Seite 191 bis 195).

Darüberhinaus ist der Zusatz von Konservierungsmitteln, Stabilisatoren, Puffersubstanzen, zum Beispiel Calciumhydrogenphosphat, kolloidales Aluminiumhydroxyd, Geschmackskorrigentien, Antioxydantien und Komplexbildnern (zum Beispiel Äthylendiaminotetraessigsäure) und dergleichen möglich. Gegebenenfalls ist zur Stabilisierung des Wirkstoffmoleküls mit physiologisch verträglichen Säuren oder Puffern auf einen pH-Bereich von ca. 3 bis 7 einzustellen. Im allgemeinen wird ein möglichst neutraler bis schwach saurer (bis pH 5) pH-Wert bevorzugt.

Als Antioxydantien kommen beispielsweise Natriummetabisulfit, Ascorbinsäure, Gallussäure, Gallussäurealkylester, Butylhydroxyanisol, Nordihydroquajaretsäure, Tocopherole sowie Tocopherole + Synergisten (Stoffe die Schwermetalle durch Komplexbildung binden, beispielsweise Lecithin, Ascorbinsäure, Phosphorsäure) zur Anwendung. Der Zusatz der Synergisten steigert die antioxygene Wirkung der Tocopherole erheblich.

Als Konservierungsmittel kommen beispielsweise Sorbinsäure, p-Hydroxybenzoesäureester (zum Beispiel Niederalkylester), Benzoesäure, Natriumbenzoat, Trichlorisobutylalkohol, Phenol, Kresol, Benzethoniumchlorid und Formalinderivate in Betracht.

Die pharmazeutische und galenische Handhabung der erfindungsgemässen Verbindungen erfolgt nach den üblichen Standardmethoden. Beispielsweise werden Wirkstoff(e) und Hilfsbeziehungsweise Trägerstoffe durch Rühren oder Homogenisieren (zum Beispiel mittels üblicher Mischgeräte) gut vermischt, wobei im allgemeinen bei Temperaturen zwischen 20 und 80°C, vorzugsweise 20 bis 50°C, insbesondere bei Raumtemperatur gearbeitet wird. Im übrigen wird auf das folgende Standardwerk verwiesen: Sucker, Fuchs, Speiser, Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag Stuttgart, 1978.

Die Applikation der Wirkstoffe beziehungsweise der Arzneimittel kann auf die Haut oder Schleimhaut oder in das Körperinnere erfolgen, beispielsweise oral, enteral, pulmonal, rectal, nasal, vaginal, lingual, intravenös, intraarteriell, intrakardial, intramuskulär, intraperitoneal, intracutan, subcutan, intrapleurale, intrathekal, intracavitär.

Insbesondere ist auch der Zusatz anderer Arzneimittelwirkstoffe, vor allem von Uroprotektoren wie das Natriumsalz der 2-Mercaptoethansulfonsäure oder das Dinatriumsalz des entsprechenden Disulfids der Formel $HO_3S-CH_2CH_2SSCH_2CH_2-SO_3H$, aber auch anderer systemisch oder regional detoxifizierender Wirkstoffe möglich beziehungsweise günstig.

Die erfindungsgemässen Verbindungen zeigen bei intrave-

nöser, intraperitonealer oder oraler Applikation bei verschiedenen Experimentaltumoren der Ratte und der Maus eine gute zytostatische und kurative Wirksamkeit.

Beispiele für derartige Indikationen sind:

Leukämien, Lymphogranulomatose, Lymphosarkom, Retikulosarkom, Plasmazytom, M. Waldenström; Tumoren mit ausgereutem Wachstum, besonders Ovarial-, Mamma-, Bronchialkarzinom, Neuroblastom, Hodentumore, Nierenkarzinome, Pankreaskarzinome, Seminom, Ewing-Sarkom; Postoperative Zusatzbehandlung, besonders bei chemosensiblen Tumoren, die vermutlich die lokalen Grenzen bereits überschritten und trotz radikaler Operation eine schlechte Prognose haben.

Weiterhin kommen die erfindungsgemässen Verbindungen im Gegensatz zu den bekannten Mitteln «Cyclophosphamid» und «Ifosfamid» insbesondere auch für folgende Anwendungen in Frage:

- 1) für eine regionale Perfusion, in die Extremitäten und die grossen Körperhöhlen,
- 2) für eine in vitro-Behandlung des Knochenmarks bei der extracorporalen Behandlung des Knochenmarks von Leukämie-Patienten;
- 3) für prätherapeutische Sensibilitätstestungen von Tumoren in vitro.

Beispielsweise werden die erfindungsgemässen Verbindungen an der Ratte 5 Tage nach intraperitonealer Implantation von 10^5 Zellen der Leukämie L5222 mit verschiedenen Dosen intravenös, intraperitoneal oder oral appliziert und in Abhängigkeit von der Dosis eine kurative Wirkung erzielt. Als Heilung wird das Rezidiv- und Metastasen-freie Überleben der tumortragenden Tiere nach 90 Tagen definiert. Aus der mit den verschiedenen Dosen erhaltenen Häufigkeit von Heilungen wird mittels Probitanalyse nach R. Fisher als mittlere kurative Dosis (DC50) diejenige Dosis berechnet, mit der 50% der tumortragenden Tiere geheilt werden können.

Beispielsweise werden die erfindungsgemässen Verbindungen auch einen Tag nach intraperitonealer Implantation von 10^6 Zellen des Yoshida-Ascites-Sarkoms AH13 mit verschiedenen Dosen intravenös, intraperitoneal oder oral verabfolgt und in Abhängigkeit von der Dosis eine kurative Wirkung erzielt.

Auch hier wird die kurative Wirkung als Rezidiv- und Metastasen-freies Überleben der tumortragenden Tiere über 90 Tage definiert.

In entsprechender Weise wird mittels Probitanalyse nach R. Fisher als mittlere kurative Dosis (DC50) diejenige Dosis berechnet, bei der 50% der tumortragenden Tiere geheilt werden können.

Weiterhin werden beispielsweise die erfindungsgemässen Verbindungen einmalig oder mehrmalig (4x) an aufeinanderfolgenden Tagen nach intraperitonealer Implantation von 10^6 Zellen der Mäuseleukämie L1210 mit verschiedenen Dosen intravenös, intraperitoneal oder oral verabfolgt und eine zytostatische Wirkung erzielt.

Die zytostatische Wirksamkeit ist als Verlängerung der medianen Überlebenszeit der Tumortiere zu erfassen und wird als dosisabhängige prozentuale Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe ausgedrückt.

Die mittlere kurative Dosis liegt bei den Rattentumoren unabhängig von der Darreichungsform im Bereich von 0,1 bis 10 mg/kg. Mit den gleichen Dosen lässt sich eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 100% bei der Mäuseleukämie L1210 erzielen [siehe N. Block: Pharmakologische Grundlagen der Krebs-Chemotherapie In: A. Georgii

(Hrsg). Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft Band 1, pp. 15–42, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1978].

Diese curative und zytostatische Wirkung ist mit der Wirkung der bekannten Arzneimittel Cyclophosphamid (Endoxan[®]) und Ifosfamid (Holoxan[®]) vergleichbar. Die niedrigste, bereits curativ oder zytostatisch wirksame Dosis in den oben angegebenen Tierversuchen ist beispielsweise

- 0,01 mg/kg oral
- 10 0,01 mg/kg intraperitoneal
- 0,01 mg/kg intravenös

Als allgemeiner Dosisbereich für die curative und zytostatische Wirkung (Tierversuche wie oben) kommt beispielsweise in Frage:

- 0,01–100 mg/kg oral, insbesondere 0,1–10,0 mg/kg
- 0,01–100 mg/kg intraperitoneal, insbesondere 0,1–10,0 mg/kg
- 20 0,01–100 mg/kg intravenös, insbesondere 0,1–10,0 mg/kg

Indikationen für die die erfindungsgemässen Verbindungen in Betracht kommen können: Maligne Erkrankungen von Mensch und Tieren.

Die pharmazeutischen Zubereitungen enthalten im allgemeinen zwischen 1 mg bis 1 g vorzugsweise 10 bis 300 mg der erfindungsgemässen aktiven Komponente(n).

Die Verabreichung kann beispielsweise in Form von Tabletten, Kapseln, Pillen, Dragees, Zäpfchen, Salben, Gelees, Cremes oder in flüssiger Form erfolgen. Als flüssige Anwendungsformen kommen zum Beispiel in Frage: Ölige oder alkoholische beziehungsweise wässrige Lösungen sowie Suspensionen und Emulsionen.

Bevorzugte Anwendungsformen sind Tabletten, die zwischen 10 und 200 mg, oder Lösungen, die zwischen 0,1 bis 5% an aktiver Substanz enthalten.

Die Einzeldosis der erfindungsgemässen aktiven Komponenten kann beispielsweise liegen

- 40 a) bei oralen Arzneiformen zwischen 1–100 mg/kg vorzugsweise 10–60 mg/kg
- b) bei parenteralen Arzneiformen (zum Beispiel intravenös, intramuskulär) zwischen 1–100 mg/kg vorzugsweise 10–60 mg/kg
- 45 c) bei Arzneiformen zur rektalen oder vaginalen Applikation zwischen 1–100 mg/kg vorzugsweise 10–60 mg/kg
- d) bei Arzneiformen zur lokalen Applikation auf die Haut und Schleimhäute (zum Beispiel in Form von Lösungen, 50 Lotionen, Emulsionen, Salben usw.) zwischen 1–100 mg/kg vorzugsweise 10–60 mg/kg

– (Die Dosen sind jeweils bezogen auf die freie Base) –

Beispielsweise können 1–3mal täglich 1 bis 10 Tabletten mit einem Gehalt von 10 bis 300 mg wirksamer Substanz oder zum Beispiel bei intravenöser Injektion 1 bis 2mal täglich eine oder mehrere Ampullen von 1 bis 10 ml Inhalt mit 10 bis 250 mg Substanz empfohlen werden. Bei oraler Verabreichung ist die minimale tägliche Dosis beispielsweise 200; die maximale tägliche Dosis bei oraler Verabreichung soll nicht über 5000 liegen. Auch eine Dauer-Infusion entsprechender Dosen über 12 und mehr Stunden kann in Einzelfällen empfohlen werden.

Für die Behandlung von Hunden und Katzen liegt die orale Einzeldosis im allgemeinen zwischen ungefähr 10 und 60 mg/kg Körpergewicht; die parenterale Dosis ungefähr zwischen 10 und 60 mg/kg Körpergewicht.

Für die Behandlung von Pferden und Vieh liegt die orale Einzeldosis im allgemeinen zwischen ungefähr 10 und 60 mg/kg; die parenterale Einzeldosis ungefähr zwischen 10 und 60 mg/kg Körpergewicht.

Die auf dieser Seite und den vorangegangenen Seiten angegebenen Dosierungen beziehen sich auch auf die Verwendung der erfindungsgemässen Verbindungen zur Immunsuppression.

Die akute Toxizität der erfindungsgemässen Verbindungen an der Maus [ausgedrückt durch die LD 50 mg/kg; Methode nach Miller und Tainter: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 57 (1944) 261] liegt beispielsweise bei oraler Applikation zwischen 100 und 1000 mg/kg beziehungsweise oberhalb 1000 mg/kg.

Die Arzneimittel können in der Humanmedizin, der Veterinärmedizin sowie in der Landwirtschaft allein oder im Gemisch mit anderen pharmakologisch aktiven Stoffen verwendet werden.

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

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 stehengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in Aceton aufgenommen, erneut eingeeengt, 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 3stündigem Stehen bei 0°C wurde mit Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt, angerieben, das Kristallisat nach 20stündigem 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).

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 20stündigem Stehen bei 0°C abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 2,1 g (84% d.Th.), Fp.: 143–145°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]-thio-ethansulfonat 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°C (Zers.), Rf-Wert: 0,61 [Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/1n Essigsäure (5:3:2)].

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 stehengelassen. Danach wurde das Wasser im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand zweimal in Aceton aufgenommen und im Vakuum eingeeengt. 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-mercaptoethansulfonat wurden 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/1n 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-ethoxytetrahydro-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 20stündigem 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) 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 (76% 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).

Beispiel 12

2-[2-(Bis(2-chlorethyl)-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-chlorethyl)-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.

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 stehengelassen. 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

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 Trichloressigsäure versetzt und 20 Stunden bei 0°C stehengelassen. 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 stehengelassen. 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.

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 Trichloressigsäure 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-chlorethyl)-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-

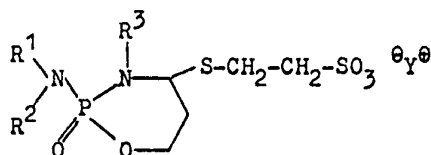
oxid und 240 mg (1 mmol) Cyclohexylammonium-2-mercaptoethansulfonat in 2 ml Dimethylformamid wurden mit einer Spur Trichloressigsäure versetzt und 2 Tage bei –25°C aufbewahrt. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung mit der 5 20fachen Menge Ether gefällt. Der Rückstand wurde gewaschen und getrocknet.

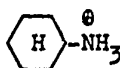
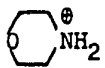
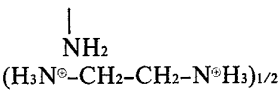
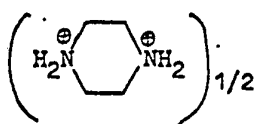
Ausbeute: 400 mg (71% d.Th.), Fp.: 102–107°C (Zers.), Rf-Wert: 0,63.

Entsprechend den vorstehenden Beispielen wurden noch 10 die folgenden Verbindungen hergestellt:

Beispiele 20–30

Oxazaphosphorin-4-thio-alkansulfonate der allgemeinen Formel



Beispiel Nr.	R ¹	R ²	R ³	Y [⊖]	Schmelzpunkt bzw. Rf-Wert ¹⁾
20	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	N [⊖] H ₄	121–125°C (Zers.)
21	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₂ -CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	N [⊖] H 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 N [⊖] H ₂	0,61
26	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	HO-CH ₂ -CH ₂ -N [⊖] H ₃	0,59
27	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(HO-CH ₂ -CH ₂) ₂ N [⊖] H ₂	0,59
28	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	NH ₂ -C=N [⊖] H ₂ [⊖]	132–134°C
29	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H		0,62
30	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H		0,61

¹⁾ Laufmittel: Essigester/iso-Propanol/in Essigsäure (5:3:2); Anfärbung: u.a. mit Jod.

Beispiel 31

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

1,39 g (5 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 1,44 (5 mmol) 2,3-Dimercapto-propansulfonsäure-Cyclohexylaminsalz wurden in 10 ml Ethanol gelöst, mit Trichloressigsäure angesäuert und 2 Tage bei 0° stehengelassen. 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-mercaptoethan-

sulfonat in 2 ml Wasser versetzt und 3 Stunden bei 0°C aufbewahrt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum bei 25°C eingengt, der Rückstand in trockenem Aceton aufgenommen und in der Kälte mit trockenem Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Einengen der 55 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.

60

Beispiel 33

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

65 14 g (50 mmol) 4-Hydroxycyclophosphamid und 11 g (50 mmol) 3-Mercapto-propansulfonsäure Guanidiniumsalz 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.).

Beispiel 34

Präparate, die als Wirkstoff 50 mg bzw. 200 mg Substanz 23 gemäss folgender Übersicht enthalten:

Substanz Beispiel 23	50 mg	200 mg
Mannit	230 mg	380 mg
Wasser f. Injektionszwecke	ad 2 ml	ad 4 ml

Die Substanz Beispiel 23 und Mannit werden jeweils unter Begasung mit Stickstoff und Lichtschutz in soviel Wasser gelöst, dass eine Lösung von 2 ml bzw. 4 ml Volumen entsteht. Bei der Herstellung und Weiterverarbeitung wird so verfahren, dass die Temperatur der Lösung 5°C nicht übersteigt. Die Lösungen werden in bekannter Weise einer Sterilfiltration unterzogen, unter aseptischen Bedingungen in braune 10 ml Injektionsflaschen zu 2 ml bzw. 4 ml dosiert, mit Gefriertrocknungsstopfen versehen und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Anschliessend wird die Anlage mit trockenem Stickstoff belüftet und die Ampullenflaschen in der Anlage verschlossen.

Der Restwassergehalt des Flascheninhalts darf 0,5% nicht überschreiten.

Zur Herstellung der applizierbaren Injektionslösung wird der Inhalt der Flaschen mit 50 mg Wirkstoff in 5 ml, mit

200 mg Wirkstoff in 10 ml Wasser für Injektionszwecke aufgelöst.

Beispiel 35

5 Präparate, die als Wirkstoff 50 mg bzw. 200 mg Substanz 33 gemäss folgender Übersicht enthalten:

Substanz Beispiel 33	50 mg	200 mg
Mannit	245 mg	430 mg
10 Wasser f. Injektionszwecke	ad 2 ml	ad 4 ml

Die Substanz Beispiel 33 und Mannit werden jeweils unter Begasung mit Stickstoff und Lichtschutz in soviel Wasser gelöst, dass eine Lösung von 2 ml bzw. 4 ml Volumen entsteht. Bei der Herstellung und Weiterverarbeitung wird so verfahren, dass die Temperatur der Lösung 5°C nicht übersteigt. Die Lösungen werden in bekannter Weise einer Sterilfiltration unterzogen, unter aseptischen Bedingungen in braune 10 ml Injektionsflaschen zu 2 ml bzw. 4 ml dosiert, mit Gefriertrocknungsstopfen versehen und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Anschliessend wird die Anlage mit trockenem Stickstoff belüftet und die Ampullenflaschen in der Anlage verschlossen.

Der Restwassergehalt des Flascheninhalts darf 0,5% nicht überschreiten.

Zur Herstellung der applizierbaren Injektionslösung wird der Inhalt der Flaschen mit 50 mg Wirkstoff in 5 ml, mit 200 mg Wirkstoff in 10 ml Wasser für Injektionszwecke aufgelöst.