

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 428–434 (1977)

Harald Hamacher

### Potentielle Antineoplastica, 1. Mitt.

## Cyclophosphamidanaloge 2-Arylamino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxide\*

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen  
(Eingegangen am 1. Juli 1976).

---

Die Iostgruppenfreien Cyclophosphamidanaloga 7–11 werden dargestellt und durch UV-, IR-, <sup>1</sup>H-NMR sowie massenspektroskopische Untersuchungen charakterisiert. 7 zeigt am Walker Carcinom 256 der Ratte keine antineoplastische Wirksamkeit, auch kann bei in vitro Versuchen in Gegenwart des Monooxygenasesystems keine Acroleinfreisetzung nachgewiesen werden.

### Arylamino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine 2-oxides, Analogues of Cyclophosphamide

The cyclophosphamide derivatives 7–11 without the mustard residue are synthesized and characterized by UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR and mass spectroscopic measurements. 7 is not active against the Walker carcinoma 256 of the rat, and no formation of acrolein is observed during the incubation of 7 with the mixed function oxidase system in vitro.

---

Cyclophosphamid (1) ist wegen seines hohen therapeutischen Indexes<sup>1)</sup> eine der am häufigsten verwendeten Substanzen unter den alkylierenden Antineoplastica. Im Zusammenhang mit eigenen Versuchen, durch Verknüpfung östrophiler Carriermoleküle mit cytotoxischen Gruppen organspezifische Antitumormittel zu erhalten, war es nicht gelungen, am Ringstickstoff aryl-substituierte Derivate des Cyclophosphamids darzustellen<sup>2)</sup>.

Unter den zahlreichen Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des Cyclophosphamids war unter diesem Aspekt für die weiteren Syntheseveruche eine Arbeit von Alarcon und Meienhofer<sup>3)</sup> von besonderem Interesse. Die genannten Autoren

---

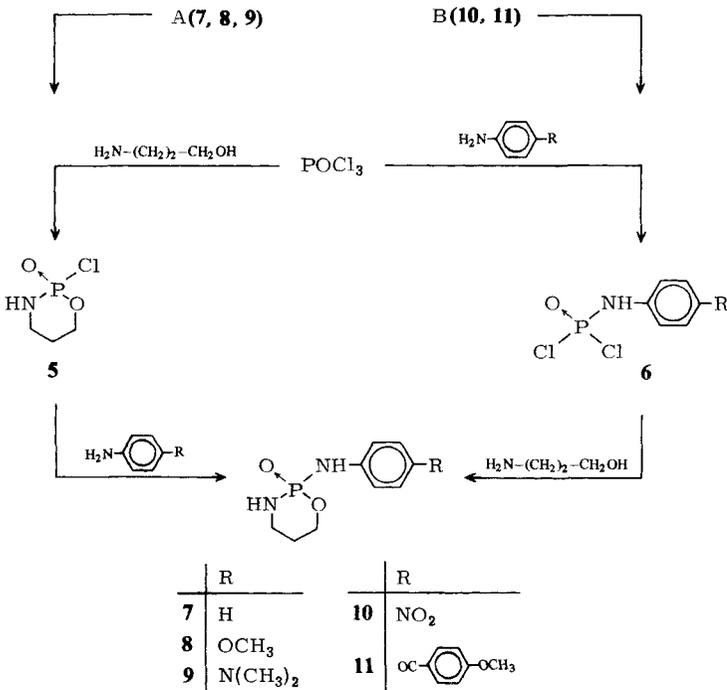
\* Vorgetragen anlässlich der Hauptversammlung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Heidelberg, Oktober 1974.

1 H. Arnold, F. Bourseaux und N. Brock, *Arzneim.-Forsch.* 11, 143 (1961).

2 H. Hamacher, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 308, 290 (1975).

3 R. A. Alarcon und J. Meienhofer, *Nature (London) New Biol.* 233, 250 (1972).





Kohlenstoffgerüsts in den Heterocyclus nach Methode B vermehrt mit Nebenreaktionen gerechnet werden muß. Wegen der relativ geringen Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substitution des letzten Chloratoms am Phosphor ist bei der Darstellung nach B in erhöhtem Maße eine intermolekulare Reaktion des primär aus **6** und 3-Amino-1-propanol gebildeten nichtcyclischen Kondensationsprodukts und damit eine verstärkte Polymerisation zu erwarten.

Die Verbindungen **7**, **8** und **9** mit Wasserstoff, einer Methoxy- oder Dimethylaminogruppe in 4-Stellung des Phenylrings konnten nach A in Ausbeuten von etwa 40 bis 50 Prozent dargestellt werden. Dabei erwies sich als vorteilhaft, das Zwischenprodukt **5** nicht zu isolieren, sondern die Umsetzung stufenweise im gleichen Reaktionsansatz vorzunehmen, da **5** nur sehr schwer in reiner Form zu gewinnen ist und meistens ein mit Triäthylaminhydrochlorid verunreinigtes Produkt erhalten wird.

Die Cyclophosphamidderivate **10** und **11** mit der elektronegativen Nitro- bzw. 4-Methoxybenzoylgruppe in 4-Stellung des Aromaten ließen sich wegen der geringen Reaktivität dieser aromatischen Amine nach A praktisch nicht darstellen. Beim Einsatz von 4-Nitroanilin konnten, selbst wenn die Reaktion in siedendem Dioxan durchgeführt wurde, nach mehrtägiger Reaktionszeit dünnschichtchromatographisch nur weniger als 5 % der gewünschten Verbindung **10** im Reaktionsgemisch nachgewiesen

werden. **10** und **11** wurden jedoch nach B erhalten. Auch hier wurde zwecks besserer Ausbeute auf die Isolierung des Zwischenprodukts **6** verzichtet. Bei der Darstellung von **10** und **11** konnte wegen der nach Methode B erhaltenen kompliziert zusammengesetzten Reaktionsgemische auf eine chromatographische Trennung nicht verzichtet werden, und die Ausbeuten waren mit nur 4 Prozent für **10** und 12 Prozent für **11** erwartungsgemäß niedrig.

Als schwierig bei der Reindarstellung der Cyclophosphamidderivate **7** bis **11** erwies sich die Abtrennung des gebildeten Triäthylaminhydrochlorids aus den Reaktionsgemischen, welches offenbar wegen der guten lösungsvermittelnden Eigenschaften der entstandenen Phosphorsäurederivate zum großen Teil im lipophilen Dichlormethan gelöst blieb. Nach erfolglosen Extraktionsversuchen gelang es schließlich, die Chloridionen durch Ionenaustausch abzutrennen und das freigesetzte Triäthylamin durch schonende Destillation zu entfernen.

2-Phenylamino-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid (**7**) wurde unter in vitro Bedingungen auf seine antineoplastische Wirksamkeit sowie auf seine Acrolein-freisetzung geprüft.\* Das Cyclophosphamidderivat wurde zu seiner Aktivierung zunächst in Gegenwart von NADP und anderen Cofaktoren mit Rattenleberhomogenaten inkubiert. Bei der anschließenden Inkubation mit frisch isolierten Tumorzellen des Walker Carcinoms 256 der Ratte ( $0,9 \cdot 10^6$  Zellen pro ml) zeigte **7** weder in einer Konzentration von  $100 \mu\text{g}$  pro ml noch von  $500 \mu\text{g}$  pro ml eine signifikante Wirkung.

Dünnschichtchromatographisch ließen sich zwar Metaboliten nachweisen, im Gegensatz zu Cyclophosphamid selbst wurde jedoch überraschenderweise unter den Versuchsbedingungen kein Acrolein gefunden.

## Experimenteller Teil

IR (KBr): Beckman IR 20 A-Y. – UV (Methanol): Zeiss PMQ II. –  $^1\text{H-NMR}$ : Varian A-60, als 10proz. Lösung mit Tetramethylsilan als innerem Standard. **7**, **8**, **10**, **11** in  $(\text{D}_3\text{C})_2\text{SO}$ , **9** in  $\text{CDCl}_3$ . – MS (70 eV): CH-7, Varian Mat, Direkteinlaß. *Elementaranalytische Untersuchungen*: Mikroanalytische Laboratorien der Fa. Ilse Beetz, Kronach und des Pharmazeutischen Instituts der Universität Tübingen. DC: Kieselgel 60 F<sub>245</sub>-Glasfertigplatten der Firma Merck, Schichtdicke 0,25 mm, Kammersättigung, Fließmittel Benzol-Aceton 3 : 7, Detektion in UV-Licht  $\lambda_{254}$ .

### Darstellung der Cyclophosphamidderivate **7** bis **11**

#### Methode A

Eine Lösung von 0,1 Mol 3-Amino-1-propanol und 0,2 Mol Triäthylamin\*\* in 125 ml Dichlormethan\*\* wird unter Rühren bei  $0-10^\circ$  tropfenweise mit einer Lösung von 0,1 Mol Phosphoroxid-

\* Für die Durchführung der biologischen und biochemischen Untersuchungen danke ich den Herren Dr. Connors, Dr. Cox und Dr. Farmer, Chester Beatty Research Institute, Royal Cancer Hospital, London.

\*\* Für alle Umsetzungen wird über Natriumhydroxid getrocknetes Triäthylamin und über Diphosphorpentoxid getrocknetes Dichlormethan verwendet.

Tab. 1: Ausbeuten, Schmelzpunkte, dc RF-Werte und Elementaranalysen

Darstellungsmethode	Ausbeute	Schmp. <sup>o</sup> (unkorr.)	RF-Wert	Elementaranalyse	Ber.: Gef.:
7 A	51 %	164*	0,33	C 50,94 H 6,18 C 50,71 H 6,04	N 13,20 P 14,60 N 12,96 P 14,65
8 A	44 %	180**	0,27	C 49,55 H 6,24 C 49,85 H 6,34	N 11,56 P 12,79 N 11,58 P 12,77
9 A	37 %	177**	0,23	C 51,76 H 7,11 C 51,61 H 7,04	N 16,46 P 12,13 N 16,52 P 11,92
10 B	4 %	222**	0,36	C 42,03 H 4,70 C 42,55 H 5,02	N 16,34 P 12,04 N 16,08 P 11,87
11 B	12 %	177	0,32	C 58,96 H 5,53 C 59,26 H 5,55	N 8,09 P 8,94 N 7,96 P 8,90

\* Metallblock DAB 7, \*\* Kofler-Heiztischmikroskop

trichlorid in 50 ml Dichlormethan versetzt und das Gemisch unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 20 Std. bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird bei 0–10° tropfenweise eine Lösung von 0,1 Mol des betreffenden aromatischen Amins und 0,1 Mol Triäthylamin in 75 ml Dichlormethan zugegeben und das Gemisch für weitere 7 Tage bei Raumtemp. gerührt.\*\* Das Reaktionsgemisch wird dann filtriert und so lange mit Dichlormethan gewaschen, bis im Filterrückstand dc das gewünschte Reaktionsprodukt nicht mehr nachweisbar ist. Die vereinigten Filtrate werden i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 400 ml Methanol gelöst und die Lösung über 200 g frisch aktivierten stark basischen Anionenaustauscher R 63 DAB 7 filtriert. Nach dem Nachwaschen mit 200 ml Methanol werden die vereinigten chloridfreien Filtrate i. Vak. eingedampft und der Rückstand wiederholt aus Chloroform-Petroläther 50–70° umkristallisiert.

#### Methode B

Eine Lösung von 0,1 Mol des betreffenden aromatischen Amins\* und 0,1 Mol Triäthylamin in 500 ml Dichlormethan wird unter Rühren bei 0–10° tropfenweise mit einer Lösung von 0,1 Mol Phosphoroxid-trichlorid in 50 ml Dichlormethan versetzt und das Gemisch unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 3 Tage bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird bei 0–10° tropfenweise

\*\* Bei der Darstellung von 9 wird im Stickstoffstrom gearbeitet.

\* Das für die Darstellung von 11 benötigte Oxo-(4-methoxyphenyl)-(4-aminophenyl)-methan wird durch Reduktion der entsprechenden Nitroverbindung (hergestellt nach <sup>7)</sup>) mit Hydrazin und Raney-Nickel erhalten<sup>2)</sup>.

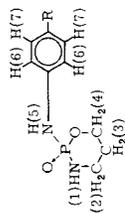
7 K. Auwers, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 36, 3893 (1903).

eine Lösung von 0,1 Mol 3-Amino-1-propanol und 0,2 Mol Triäthylamin in 125 ml Dichlormethan zugegeben. Nach weiteren drei Tagen Reaktionszeit bei Raumtemp. wird filtriert und der Filterrückstand mit Dichlormethan gewaschen, bis das gewünschte Reaktionsprodukt nicht mehr nachweisbar ist. Die vereinigten Filtrate werden i. Vak. eingedampft. Das Rohprodukt wird wie bei Methode A beschrieben von Chloridionen und Triäthylamin befreit. Der Rückstand der nach dem Ionenaustausch erhaltenen Filtrate wird an Aluminiumoxid basisch Woelm, Aktivitätsstufe I so getrennt (15 g des zu trennenden Gemisches pro 1000 g Aluminiumoxid). Das Sorbens wird trocken in ein Glasrohr eingefüllt und mit dem am Aluminiumoxid adsorbierten Gemisch überschichtet. Die Adsorption erfolgt durch Eindampfen einer Lösung des nach dem Ionenaustausch erhaltenen Rohprodukts in Methanol mit 5 % der erforderlichen Gesamtmenge an Sorbens im Rotationsverdampfer. Eluiert wird zunächst mit Aceton und anschließend mit einem Gemisch aus Aceton-Methanol 9 : 1. Die Fraktion mit dem gewünschten Reaktionsprodukt wird i. Vak. eingedampft und der Rückstand aus Chloroform-Petroläther 50–70° umkristallisiert.

Experimentelle Daten der Verbindungen 7 bis 11 s. Tab. 1 bis 3.

Tab. 2: UV-, IR- und Massenspektren

	UV		IR [cm <sup>-1</sup> ]	MS m/e
	$\lambda_{\max}$ [nm]	log $\epsilon$		
7	202	4,3	3240 (NH)	212 (M <sup>+</sup> ), 184 (M <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ), 155 (M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N), 93 (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sup>+</sup> ), 57 (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sup>+</sup> ).
	231	4,1	1278 (P→O)	
	275	3,1	1030, 969 (P-O-C)	
8	202	4,3	3270 (NH)	242 (M <sup>+</sup> ), 227 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> ), 214 (M <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ), 185 (M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N), 123 (C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sup>+</sup> ), 122 (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sup>+</sup> ), 120 (M <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N).
	235	4,1	1278 (P→O)	
	293	3,3	1026, 973 (P-O-C)	
			1177 (OCH <sub>3</sub> )	
9	204	4,3	3220 (NH)	255 (M <sup>+</sup> ), 227 (M <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ), 198 (M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N), 57 (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sup>+</sup> ), 136 (C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 135 (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 120 (M <sup>+</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> ).
	256	4,2	1275 (P→O)	
	311	3,2	1029, 963 (P-O-C)	
10	202	4,1	3340, 3170 (NH)	257 (M <sup>+</sup> ), 229 (M <sup>+</sup> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ), 227 (M <sup>+</sup> -NO), 138 (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 122 (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 120 (M <sup>+</sup> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 108 (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sup>+</sup> ).
	220	3,9	1300 (P→O)	
	326	4,1	1032, 980 (P-O-C)	
1330 (NO <sub>2</sub> )				
11	203	4,5	3300, 3230 (überlagert) (NH)	346 (M <sup>+</sup> ), 289 (M <sup>+</sup> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N), 239 (M <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O), 227 (C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 211 (M <sup>+</sup> -C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ), 182 (M <sup>+</sup> -C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N), 135 (C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> ), 107 (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sup>+</sup> ), 57 (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sup>+</sup> ).
			227	
	303			
			1032, 990 (P-C-O)	
			1653 (C=O)	

Tab. 3: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

R	δ[ppm]	H(1)	H(2)	H(3)	H(4)	H(5)	H(6)	H(7)	H(8)	H(9)	H(10)
7	H	5,13 t 4,93 t J <sub>12</sub> =6Hz J <sub>13</sub> P=11Hz	3,9-4,5 m	1,3-2,1	2,9-3,5 m	7,46 d J <sub>5P</sub> =10Hz	aromat. Protonen 7,0-7,5 m				
8	OCH <sub>3</sub> (8)	4,8*	3,9-4,5 m	1,4-2,0 m	2,8-3,5 m	7,20 d J <sub>5P</sub> =10Hz	7,01 d J <sub>67</sub> =9Hz	6,73 d	3,69 s		
9	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (8)	3,7*	4,0-4,5 m	1,4-2,2 m	3,0-3,5 m	5,78 d J <sub>5P</sub> =10Hz	7,01 d J <sub>67</sub> =9Hz	6,60 d	2,83 s		
10	NO <sub>2</sub>	5,3*	3,9-4,5 m	1,4-2,1 m	2,8-3,5 m	8,46 d J <sub>5P</sub> =10Hz	7,21 d J <sub>67</sub> =9Hz	8,08 d			
11	OC-CH <sub>3</sub> (10) H(8) H(9)	5,2*	3,9-4,5 m	1,4-2,2 m	2,8-3,5 m	8,07 d J <sub>5P</sub> =10Hz	7,13 d J <sub>67</sub> =9Hz	7,68 d	7,61 d J <sub>89</sub> =9Hz	7,03 d	3,86 s

\* Überlagerung zweier Triplets durch Kopplung mit H(2) und P

Anschrift: Dr. H. Hamacher, Auf der Morgenstelle 8, 7400 Tübingen.

[Ph 735]