

Quartäre Stickstofflost-Verbindungen als potentielle Cancerostatica

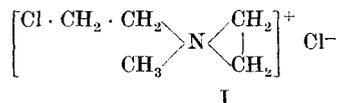
VON MANFRED WUNDERWALD UND WERNER OZEGOWSKI

Inhaltsübersicht

Es wird die Synthese von quartären Ammoniumverbindungen beschrieben, die sich vom Bis-(β -chloräthyl)-methylamin ableiten und als weiteren Substituenten einen leicht abspaltbaren Alkylrest enthalten, wobei beabsichtigt war, zu cancerostatischen Verbindungen zu gelangen, die nach dem Prinzip eines Transportform-Wirkform-Mechanismus aufgebaut sind.

Es ist allgemein bekannt, daß die cancerostatische Wirksamkeit der Bis-(β -chloräthyl)-amine auf ihrer alkylierenden Wirkung beruht, indem sie sich mit nucleophilen Gruppen umsetzen, die einen chemischen Baustein vieler biologischer Systeme darstellen.

Diese Alkylierungsreaktion verläuft bekanntlich über die Bildung einer Äthylenammoniumverbindung I¹⁾, die als eigentliche Alkylierungskomponente anzusehen ist. Da bei quartären Bis-(β -chloräthyl)-ammoniumverbindungen die Ausbildung dieser Zwischenstruktur unmöglich ist, so wäre



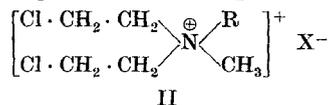
von vornherein anzunehmen, daß diese Verbindungen keine Wirkung zeigen können, wenn nicht die Möglichkeit bestünde, daß in einer vorangehenden Entalkylierungsreaktion das tertiäre Amin wieder freigegeben würde.

Quartäre Ammoniumverbindungen sind als Alkylierungsmittel bekannt. Bei gemischten Ammoniumverbindungen geht die Abspaltbarkeit der Substituenten ihrem elektrophilen Charakter etwa parallel²⁾. In Gegenwart von Molekülen oder Ionen starker nucleophiler Aktivität werden solche quartären Ammoniumverbindungen relativ leicht entalkyliert.

¹⁾ LWOWSKI, Angew. Chem. **76**, 487 (1958); HOUBEN-WEYL, Methoden der organischen Chemie, Bd. 5/4, 699, Georg Thieme Stuttgart 1960.

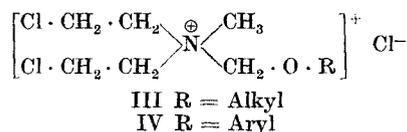
²⁾ HOUBEN-WEYL, **11/2**, 633.

Bei unseren Arbeiten gingen wir von der Annahme aus, daß im biologischen Zellgeschehen quartäre Ammoniumverbindungen II mit einem leicht abspaltbaren Alkylrest R entalkyliert werden, wobei Bis-(β -chloräthyl)-methylamin entsteht, das dann über die Äthylenammoniumstruktur zur Wirksamkeit gelangen kann. Der Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen müßte sich demnach aus zwei Schritten zusammensetzen. In einer ersten Entalkylierungsreaktion der quartären Verbindung sollte zu-



nächst das tertiäre Amin frei werden, das darauf in einer zweiten Alkylierungsreaktion — über die Äthylenammoniumstruktur — seine eigentliche Wirksamkeit entfaltet. Wir betrachten somit II als inaktive Transportform, die im Organismus in eine aktive Wirkform übergeführt werden könnte.

Als leicht abspaltbare Alkylreste wählten wir die $-\text{CH}_2\text{O}-\text{R}$ -Gruppierung, wobei R einen Alkyl- oder Arylrest bedeutet. Es wurde versucht, Bis-(β -chloräthyl)-methylamin mit Chlormethyl-methyl-äther und Chlormethyl-n-amyl-äther zu Verbindungen der Formel III umzusetzen³⁾. Es wurden zwar Umsetzungsprodukte erhalten, diese waren aber so unbeständig, daß sie bei der Umkristallisation aus reinem Chloroform bereits wieder



zerfielen. Unter den Zerfallsprodukten konnten Formaldehyd und Bis-(β -chloräthyl)-methylamin-hydrochlorid nachgewiesen werden. Nimmt man an, daß die Zerfallsreaktion von der Basizität des Äther-Sauerstoffatoms bestimmt wird, so müßte eine Herabsetzung der Basizität zu einer größeren Stabilität dieser Verbindungen führen. Zu diesem Zweck wurde die Alkylgruppe in Verbindung III durch eine Arylgruppe (Verbindung IV) ersetzt. Die Umsetzung von Chlormethylaryläthern mit tertiären Aminen zu quartären Ammoniumsalzen wurde bereits von H. J. BARBER und H. B. GREEN⁴⁾ beschrieben. Die von uns durch Umsetzung von verschiedenen Chlormethylaryläthern mit Bis-(β -chloräthyl)-methylamin erhaltenen Verbindungen IV erwiesen sich gegenüber den mit rein aliphatischen Chlormethyläthern erhaltenen Umsetzungsprodukten beständiger. Die Umkristallisation konnte beim raschen Arbeiten ohne Zersetzung durchgeführt werden, während beim längeren Erhitzen der Lösungen bereits wieder Zerfall auftrat.

³⁾ F. M. LITTERSCHEID u. K. THIMME, Liebigs Ann. Chem. **334**, 50 (1904).

⁴⁾ H. J. BARBER u. M. B. GREEN, J. appl. Chem. **4**, 115 (1954).

Die Darstellung der Chlormethylaryläther erfolgte durch Umsetzung von Natriumphenolaten mit chlormethansulfosaurem Natrium⁵⁾ zu aryloxy-methansulfosaurem Natrium und anschließende Reaktion mit Phosphor-pentachlorid⁶⁾. In Anlehnung an die Arbeiten von B. MYLO⁷⁾ wurde ein zweiter Weg zur Darstellung von Chlormethylaryläthern beschrieben. Wir gingen in diesem Fall von Methoxymethyl-phenyläther bzw. seinem p-Methoxy- und p-Nitro-Derivat aus und setzten diese Verbindungen mit Acetylchlorid um. Als Katalysator verwendeten wir bei dieser Reaktion Zinntetrachlorid, dadurch erfolgte die Umsetzung bereits bei tiefen Temperaturen mit hoher Geschwindigkeit. Bei der Destillation der auf diese Weise hergestellten Aryloxymethylchloride gingen mit dem Hauptprodukt stets Nebenprodukte über, deren Abtrennung nicht gelang. Trotzdem konnten die erhaltenen unreinen Aryloxymethylchloride mit Bis-(β -chloräthyl)-methylamin zu reinen quartären Verbindungen umgesetzt werden. Auf diese Weise erhaltenes Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxymethyl-ammoniumchlorid wurde durch die nachfolgend erwähnte thermische Spaltung dieser Verbindung in reines Phenoxymethylchlorid und Bis-(β -chloräthyl)-methylamin zerlegt.

Durch Umsetzung der Aryloxymethylchloride mit Bis-(β -chloräthyl)-methylamin in benzolischer Lösung oder einem Gemisch von Dimethylformamid und Benzol im Verhältnis 1:3 wurden folgende quartäre Ammoniumverbindungen hergestellt:

Phenoxymethyl-

p-Nitrophenoxymethyl-

p-Methoxyphenoxymethyl-

α -Naphthoxymethyl- und

β -Naphthoxymethyl-bis-(β -chloräthyl)-methyl-ammoniumchlorid.

Wie schon oben bereits erwähnt wurde, besitzen diese Verbindungen eine thermische Labilität. Erhitzt man Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxymethyl-ammoniumchlorid kurz über den Schmelzpunkt, so tritt unter Alkylierung des eigenen Anions eine Spaltung der Substanz in die Ausgangskomponenten ein.

Bei der Testung der Verbindungen am EHRLICHschen Ascitescarcinom der weißen Maus in der chemotherapeutischen Testabteilung unseres Insti-

⁵⁾ H. J. BARBER, H. J. COTTRELL, R. F. FULLER u. M. B. GREEN, J. appl. Chem. **3**, 253 (1953).

⁶⁾ H. J. BARBER, R. F. FULLER, M. B. GREEN u. H. T. ZWARTOUW, J. appl. Chem. **3**, 266 (1953).

⁷⁾ B. MYLO, Ber. dtsh chem. Ges. **44**, 3211 (1911).

tutes zeigten die Verbindungen jedoch keine cancerostatische Wirksamkeit. Die relativ leichte Alkylierbarkeit des eigenen Anions, die bei der thermischen Spaltung dieser Verbindungen eintritt, ist demnach kein Anhaltspunkt für die Alkylierbarkeit von nucleophilen Körpern im biologischen Stoffwechselgeschehen, die die Voraussetzung für die Entstehung des eigentlich wirksamen Agens, nämlich Bis-(β -chloräthyl)-methylamin bzw. der entsprechenden Äthylenammoniumverbindung bildet.

Beschreibung der Versuche

Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxy-methyl-ammoniumchlorid (V)

21 g Bis-(β -chloräthyl)-methylamin-hydrochlorid (HN 2) (0,11 Mol) werden in der gleichen Menge Wasser gelöst und mit einer Lösung von 4,4 g Natriumhydroxid (0,11 Mol) in etwa 10 ml Wasser bei 0 bis -5°C versetzt. Die in Freiheit gesetzte Base wird mit Chloroform extrahiert, der Extrakt mit Natriumsulfat getrocknet und das Chloroform im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml wasserfreiem Benzol aufgenommen und mit 15,5 g Phenoxy-methylchlorid (0,11 Mol), gelöst in 20 ml Benzol, versetzt. Nach 4 Tagen wird die ausgefallene kristalline Substanz abgesaugt. Ausbeute 13,2 g (40% d. Th.), F. $102-105^{\circ}$. Zur Reinigung löst man die Substanz in Chloroform und versetzt mit dem doppelten Volumen Essigester. Nach wiederholter Reinigung schmilzt die Substanz bei $110-111^{\circ}$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{NO}$ (298,7) ber.: C 48,25; H 6,08; Cl 35,61; N 4,69;
gef.: C 48,28; H 6,18; Cl 35,04; N 4,79.

Bis-(β -chloräthyl)-methyl-p-nitrophenoxy-methyl-ammoniumchlorid (VI)

12,6 g HN 2 (65 mMol) werden auf die oben angegebene Weise in die freie Base übergeführt, in 13 ml Benzol aufgenommen und mit 12,2 g p-Nitrophenoxy-methylchlorid⁸⁾ (65 mMol), in 13 ml Benzol gelöst, umgesetzt. Man läßt das Gemisch 20 Tage bei Zimmertemperatur stehen und saugt anschließend die ausgeschiedenen Kristalle ab. Ausbeute 3,6 g (16% d. Th.), F. $149-153^{\circ}$. Zur Reinigung kristallisiert man aus Dimethylformamid um. F. $155,5-158^{\circ}$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (343,7) ber.: C 41,94; H 4,99; N 8,15; Cl 30,95;
gef.: C 41,84; H 5,02; N 8,35; Cl 30,89.

Bis-(β -chloräthyl)-methyl- α -naphthoxy-methyl-ammoniumchlorid (VII)

9,1 g HN 2 (47 mMol) werden in die freie Base übergeführt und in 10 ml eines Gemisches von Dimethylformamid und Benzol (1:1) gelöst. Hierzu gibt man 9,1 g α -Naphthoxy-methylchlorid (47 mMol), in 10 ml Dimethylformamid-Benzol (1:1) gelöst, hinzu. Die ausgefallene Substanz wird am anderen Tag abgesaugt. Ausbeute 5,3 g (32% d. Th.), F. $152-160^{\circ}$. Bei weiterem Stehen können aus dem Reaktionsgemisch weitere 1,9 g vom F. $144-148^{\circ}$ gewonnen werden. Die Substanz wird aus Dimethylformamid umkristallisiert. F. $167-170^{\circ}$.

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}$ (348,7) ber.: C 55,11; H 5,78; N 4,02; Cl 30,51;
gef.: C 54,93; H 5,86; N 4,17; Cl 30,45.

Bis-(β -chloräthyl)-methyl- β -naphthoxy-methyl-ammoniumchlorid (VIII)

13,8 g HN 2 (72 mMol) werden in die freie Base übergeführt und in 14 ml Benzol gelöst. Hierzu gibt man 14,1 g β -Naphthoxy-methylchlorid (73 mMol), in 14 ml Benzol gelöst, hinzu.

⁸⁾ H. J. BARBER, H. J. COTTRELL u. M. B. GREEN, J. appl. Chem. **3**, 259 (1953).

Nach 10tägigem Stehen werden die Kristalle abgesaugt. Ausbeute 11,3 g (44%), F. 114–125°. Zur Reinigung löst man die Substanz in Chloroform und versetzt mit dem doppelten Volumen Essigester. F. 120–123°.

$C_{16}H_{20}Cl_3NO$ (348,7) ber.: C 55,11; H 5,78; N 4,02; Cl 30,51;
gef.: C 55,06; H 5,87; N 4,13; Cl 30,49.

Phenoxymethylchlorid (IX)

Zu einer Lösung von 3,0 g Zinntetrachlorid (0,01 Mol) in 20 g Acetylchlorid (0,25 Mol) tropft man bei einer Temperatur von -50 bis -60° unter Rühren eine Lösung von 13,8 g Methoxymethylphenyläther (0,1 Mol) in 20 g Acetylchlorid (0,25 Mol) im Verlauf von 5 Minuten zu. Es werden weitere 10 Minuten bei -40 bis -25° nachgerührt, sodann wird das Reaktionsprodukt sofort in Eiswasser gegossen. Man versetzt mit etwa 150 ml Äther und fügt zu dem Gemisch 40 g Natriumhydroxid, in Eiswasser gelöst, hinzu. Die wäßrige Phase wird abgetrennt, mit Äther nachgewaschen und die Ätherextrakte zweimal mit eiskalter $n/1$ NaOH und zweimal mit Eiswasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Lösung und dem Vertreiben des Äthers wird das Produkt im Vakuum destilliert. Kp_{11} 77,5–81°. Ausbeute 11,1 g. Es wurde für das Produkt ein Chlorgehalt von 18,8% gefunden. Aus der Berechnung ergibt sich ein Chlorgehalt von 24,87%. Aus der nachfolgend beschriebenen Umsetzung dieses Produktes mit HN 2 und unter Berücksichtigung der in (V) erhaltenen Ausbeute kann man jedoch ersehen, daß der überwiegende Teil des Produktes aus Phenoxymethylchlorid besteht.

Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxymethyl-ammoniumchlorid aus Phenoxymethylchlorid (aus IX) (X)

19,25 g HN 2 (0,1 Mol) werden in die freie Base übergeführt und mit 20 ml Dimethylformamid-Benzol (1:3) gemischt. Hierzu fügt man eine Lösung von 14,25 g Phenoxymethylchlorid (aus IX) in 20 ml Dimethylformamid-Benzol (1:3). Während des 24stündigen Stehens kristallisiert das Reaktionsprodukt aus (7,8 g), F. 102–110°, das durch Lösen in Chloroform und Versetzen mit dem doppelten Volumen Essigester gereinigt wird. F. 110,5–111°.

Ber.: Cl 35,61;
gef.: Cl 35,59.

Thermische Spaltung von Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxymethyl-ammoniumchlorid (XI)

5,4 g Bis-(β -chloräthyl)-methyl-phenoxymethyl-ammoniumchlorid (18 mMol) (aus X) wurden in einer Destillationsapparatur unter Wasserstrahlvakuum im Ölbad erhitzt. Bei einer Badtemperatur von 125° begann die Zersetzung und bei 135–150° destillierte ein farbloses Produkt über. Kp_{10} 77–84°. Es wurden 4,7 g Destillat und 0,3 g Rückstand erhalten. Das Destillat wurde mit verdünnter eiskalter Salzsäure geschüttelt und das Gemisch zweimal ausgeäthert. Der Ätherextrakt wurde einmal mit eiskalter $n/1$ NaOH und zweimal mit Eiswasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Äther vertrieben und der Rückstand im Vakuum destilliert. Es wurden 1,5 g Phenoxymethylchlorid (58% d. Th.) vom Kp_{11} 78–79° erhalten.

Ber.: Cl 24,87;
gef.: Cl 24,86.

Die wäßrig, salzsaure Phase wurde im Vakuum eingedampft. Zur Entfernung noch anhaftender geringer Mengen Wasser wurde der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt und der Alkohol anschließend abdestilliert. Der Rückstand (etwa 3 ml) wurde mit 10 ml Aceton versetzt und bei -20° zur Kristallisation gebracht. Es wurden 1,8 g Bis-(β -chloräthyl)-methylamin-hydrochlorid (52% d. Th.) erhalten. F. $108-109,5^{\circ}$. Nach Umkristallisation aus Aceton-Alkohol schmolz das Produkt bei $109,5-110,5^{\circ}$. Der Mischschmelzpunkt mit einer authentischen Probe Bis-(β -chloräthyl)-methylamin-hydrochlorid ergab keine Depression.

Hydrochinon-methyläther-methoxymethyläther (XII)

13,6 g Hydrochinon-monomethyläther (0,11 Mol) werden mit 4,4 g Natriumhydroxid (0,11 Mol) in 50 ml Dimethylformamid unter Stickstoff zum Phenolat umgesetzt. Hierzu gibt man allmählich 8 g Chlormethyl-methyläther (0,1 Mol) bei etwa 20° . Danach wird kurze Zeit auf 50° erwärmt, das Gemisch in Wasser gegossen, das Reaktionsprodukt ausgeäthert und der Äther vertrieben. Nach der Destillation des Rückstandes erhält man 14,9 g Hydrochinon-methyläther-methoxymethyläther (89% d. Th.) vom $Kp_{0,4}$ $74,5-75^{\circ}$.

$C_9H_{12}O_3$ (168,2) ber.: C 64,27; H 7,19;
gef.: C 64,40; H 7,21.

p-Methoxyphenoxymethylchlorid (XIII)

Zu einem Gemisch von 6 g Zinntetrachlorid (0,02 Mol) und 40 g Acetylchlorid (0,5 Mol) tropft man bei einer Temperatur von -50 bis -60° unter Rühren ein vorgekühltes Gemisch von 33,6 g Hydrochinon-methyläther-methoxymethyläther (0,2 Mol) und 40 g Acetylchlorid (0,5 Mol) innerhalb von 4 Minuten zu. Man rührt 3 Minuten bei -50° nach und gießt das Reaktionsgemisch sofort auf Eis. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie in (IX) beschrieben. Nach zweimaliger Destillation werden 19,5 g vom $Kp_{0,6}$ $76,5-77,5^{\circ}$ erhalten.

Es wurde für das Produkt ein Chlorgehalt von 7% gefunden. Die Berechnung ergibt einen Chlorgehalt von 20,16%. Aus der nachfolgend beschriebenen Umsetzung dieses Produktes mit HN 2 kann man jedoch ersehen, daß ein Teil des Produktes aus p-Methoxyphenoxymethylchlorid besteht.

Bis-(β -chloräthyl)-methyl-p-methoxyphenoxymethyl-ammoniumchlorid aus p-Methoxyphenoxymethylchlorid (aus XIII) (XIV)

7,7 g HN 2 (0,04 Mol) werden in die freie Base übergeführt und in 10 ml Dimethylformamid-Benzol (1:3) gelöst. Hierzu gibt man eine Lösung von 19,5 g p-Methoxyphenoxymethylchlorid (es wurde auf Grund des ermittelten Chlorwertes des p-Methoxyphenoxymethylchlorids ein Gehalt von 35% angenommen) (0,04 Mol) in 10 ml Dimethylformamid-Benzol (1:3). Nach 2 Tagen wird der entstandene Niederschlag abgesaugt. Ausbeute 9,4 g (71,5% d. Th.), F. $97-100^{\circ}$. Die Reinigung erfolgt durch Lösen in Chloroform und Versetzen der Lösung mit dem doppelten Volumen Butylacetat. F. $97-98^{\circ}$.

$C_{13}H_{20}Cl_3NO_2$ (328,7) ber.: C 47,50; H 6,14; N 4,26; Cl 32,36;
gef.: C 47,35; H 6,05; N 4,20; Cl 32,51.

Herrn Dr. Dr. W. JUNGSTAND sowie Herrn Dipl.-Biol. W. GUTSCHE von der chemotherapeutischen Testabteilung unseres Institutes sind wir für

die Durchführung der Testversuche zu besonderem Dank verpflichtet. Der Analytischen Abteilung danken wir für die Durchführung der Analysen und Frau H. BÖTTCHER für ihre zuverlässige und sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Jena, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 16. Juli 1962.