



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **239 209 A1**

4(51) C 07 F 9/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 F / 278 561 7

(22) 15.07.85

(44) 17.09.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

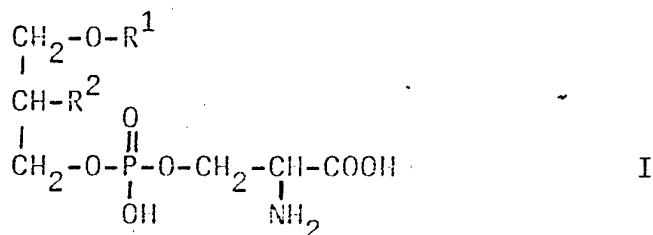
(72) Brachwitz, Hans, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem., DD; Fichtner, Iduna, Dr. rer. nat., DD; Hermetter, Albin, Dr., AT; Langen, Peter, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Biol., DD; Matthes, Eckart, Dr. med., DD; Paltauf, Friedrich, Prof. Dr., AT; Schildt, Jürgen, DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von 0-alkylsubstituierten Glycero- sowie Desoxyglycerophosphoserinen**

(57) Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung von 0-alkylsubstituierten Glycero- bzw. Desoxyglycerophospho-L-serinen zu entwickeln. Erfindungsgemäß werden diese Verbindungen durch Reaktion von 0-alkylsubstituierten Glycero- bzw. Desoxyglycerophosphorsäureestern mit L-Serin unter der Einwirkung von Phospholipase D hergestellt.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von 0-alkylsubstituierten Glycero- sowie Desoxyglycerophospho-L-serinen der allgemeinen Formel I,



in der R^1 einen Alkylrest mit 5 bis 30 C-Atomen und R^2 ein Wasserstoffatom oder eine Alkoxygruppe mit 5 bis 30 C-Atomen bedeuten, und von deren Salzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß 0-alkylsubstituierte Glycero- bzw.

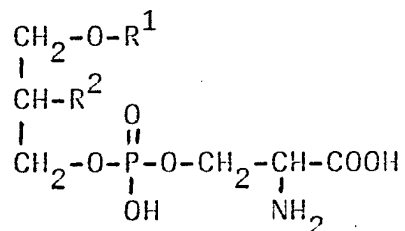
Desoxyglycerophosphorsäureester der allgemeinen Formel II, in der R^1 und R^2 die bereits bekannten Bedeutungen besitzen und X einen Methylrest oder einen Alkylrest mit 2 bis 6 C-Atomen, der auch durch OH, Cl, Br, NH_2 , NHCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ oder $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ substituiert sein kann,



bedeutet, mit L-Serin in Anwesenheit von Phospholipase D umgesetzt und das entstandene Phosphoserin-Derivat nach an sich üblichen Methoden isoliert und gereinigt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von 0-alkylsubstituierten Glycero- bzw. Desoxyglycerophospho-L-serinen der allgemeinen Formel I,



in der R^1 einen Alkylrest mit 5 bis 30 C-Atomen und R^2 ein Wasserstoffatom oder eine Alkoxygruppe mit 5 bis 30 C-Atomen bedeuten, und von deren Salzen.

Diese Verbindungen sind Alkylanaloga natürlich vorkommender Phosphatidylserine bzw. Lysophosphatidylserine. Infolge des Vorliegens einer Ethergruppierung anstelle einer Estergruppierung sind diese Substanzen durch die Phospholipasen A_1 und A_2 nicht spaltbar. Wegen dieser erhöhten Biostabilität sind diese Verbindungen interessante Untersuchungsobjekte, zum Beispiel für eine Reihe von biologischen Prozessen, an denen natürliche Phosphatidylserine beteiligt sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung ist die pharmazeutische bzw. chemische Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekanntlich lassen sich Phosphatidylserine durch Reaktion von Phosphatidsäuren oder deren Derivaten mit Serinen, deren Amino- und Carboxylgruppe im allgemeinen geschützt ist, oder durch Umsetzung von 0-Acylglycerohalohydrinen mit geschützten Phosphoserinen erhalten (H. Eibl, Chem. Phys. Lipids, 26 [1980] 405-429; A. J. Slotboom et al., Chem. Phys. Lipids, 5 [1970] 301-397; A. Hermetter et al., Chem. Phys. Lipids, 30 [1982] 35-45).

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von Phosphatidylserinen besteht in der enzymatisch katalysierten Übertragung des Phosphatidylrestes, zum Beispiel aus Phosphatidylcholin, auf L-Serin (P. Comfurius et al., Biochim. Biophys. Acta, 488 [1977] 36-42).

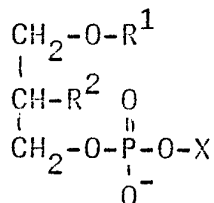
Verfahren zur Synthese der 0-alkylsubstituierten Glycero- sowie Desoxyglycerophospho-L-serine der allgemeinen Formel I sind bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden die 0-alkylsubstituierten Glycero- bzw. Desoxyglycerophospho-L-serine der allgemeinen Formel I erhalten, indem man die 0-alkylsubstituierten Glycero- bzw. Desoxyglycerophosphosäureester der allgemeinen Formel II,



in der R¹ und R² die bereits bekannten Bedeutungen besitzen und X einen Methylrest oder einen Alkylrest, mit 2 bis 6 C-Atomen, der auch durch OH, Cl, Br, NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂ oder N(CH₃)₃ substituiert sein kann bedeutet, mit L-Serin in Anwesenheit von Phospholipase D zur Umsetzung bringt und das entstandene Phosphoserin-Derivat nach üblichen Methoden isoliert. Im einzelnen erfolgt die Umsetzung, indem man eine Lösung oder Suspension eines Phospholipids der Formel II in einer hochkonzentrierten Lösung von L-Serin in einem wäßrigen Puffersystem, zum Beispiel Acetat- und Tris-Puffer. Bei pH-Werten zwischen 4,8 und 8,5 in Gegenwart einer 0,01 bis 0,1 M Lösung eines Calciumsalzes, zum Beispiel Calciumchlorid, unter der Einwirkung von Phospholipase D bei Temperaturen zwischen 10 und 50°C reagieren läßt, wobei dem Reaktionsgemisch Diethylether oder ein Gemisch von Diethylether mit weiteren organischen Lösungsmitteln, zum Beispiel Chloroform, zugesetzt wird. Im allgemeinen erfolgt die Umsetzung in einem Zeitraum von 0,5 bis 24 Stunden. Der Reaktionsablauf läßt sich durch Dünnschichtchromatographie kontrollieren. Um Ausbeuteverluste infolge Hydrolyse während der Aufarbeitung zu vermeiden, wird zur Desaktivierung des Enzyms eine 0,1 M EDTA-Lösung zum Reaktionsgemisch gegeben und darauf das entstandene Phosphoserin-Derivat auf übliche Weise isoliert. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Synthese der Racemate und der optischen Stereoisomeren vom Typ I (bei R² ≠ H).

Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen besitzen physiologische Aktivität. Sie sind cancerostatisch wirksam und hemmen zum Beispiel das Wachstum von Ehrlich Ascites-Zellen in vitro bereits bei sehr geringen Konzentrationen. Die Erfindung wird an nachstehendem Beispiel erläutert:

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

2-Desoxy-1-0-hexadecylglycero-3-phospho-L-serin

Formel I: R¹ = C₁₆H₃₃, R² = H)

Eine Mischung von 1 g L-Serin, 1,9 ml 1,0 M Acetatpuffer (pH 5,6) mit 0,1 M CaCl₂, 40 mg 2-Desoxy-1-0-hexadecylglycero-phosphorsäureethylester (II: R¹ = C₁₆H₃₃, R² = H, X = C₂H₅), 2 ml Ether/Chloroform 9:1, v/v) und 100 mg eines aus etwa 500 g Weißkohl gewonnenen Phospholipase-D-Präparates wird 4 Stunden bei 40°C intensiv gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 4,35 ml 0,1 M EDTA-Lösung hinzugegeben. Die organischen Lösungsmittel werden durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Die Mischung wird mit dem 4,3fachen Volumen Chloroform/Methanol (5:8, v/v) 30 Minuten gerührt und das sich hierbei ausscheidende unumgesetzte Serin durch Absaugen entfernt.

Das Filtrat wird mit 1 Volumen Wasser und 3,7 Volumen Chloroform 10 Minuten gerührt, die organische Phase abgetrennt und eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird an 20 g Carboxymethylcellulose (Servacel CM52) säulenchromatographisch getrennt, wobei die Elution nacheinander mit 75 ml Chloroform (Fraktion 1), je 500 ml Chloroform/Methanol (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, v/v, Fraktionen 2 bis 5) vorgenommen wird. Das Phosphoserin-Derivat wird aus Fraktion 5 in reiner Form erhalten (15 mg). DC (Merck Kieselgel 60, Fertigplatte):

Rf 0,13 CHCl₃/CH₃OH/H₂O, 50:25:4, v/v/v).