



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 290 197 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983

5(51) C 07 H 19/10

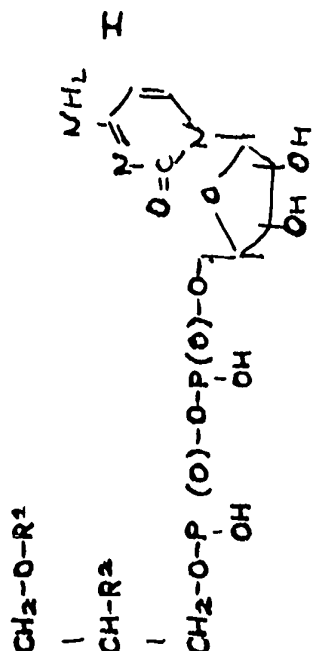
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

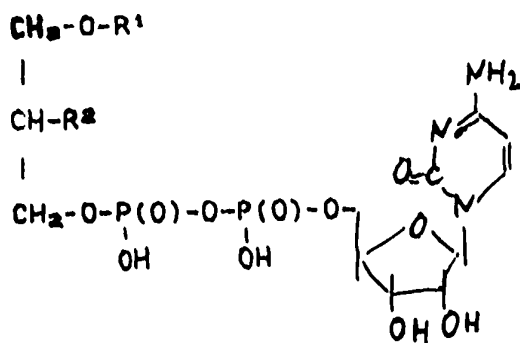
(21)	DD C 07 H / 334 702 6	(22)	20. 11. 89	(44)	23. 05. 91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuscke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Brachwitz, Hans, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem., DE; Langen, Petar, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Biol., DE; Hermetter, Albin, Dr., AT; Paltauf, Friedrich, Prof. Dr., AT				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Molekularbiologie, O - 1115 Berlin, DE; Institut für Biochemie, Technische Universität Graz, O - 8010 Graz, AT				
(74)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkyl-glycerol-Derivaten und von deren Salzen				

(55) Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkyl-2-0-methylglycerol;
1-0-Alkyl-2-0-methylglycerol;
Cytidin-5'-morpholidophosphat; Herstellungsverfahren;
chemische und pharmazeutische Industrie
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von
Cytidin-5'-diphosphat-1-alkylglycerolen der allgemeinen
Formel I und deren Salzen. Erfindungsgemäß werden die
Verbindungen der Formel I, in der R¹ ein gesättigter oder
ungesättigter aliphatischer Rest mit 2-30 C-Atomen, der
auch substituiert sein kann und R² ein kurzkettiger Alkyl-
oder Alkoxyrest mit 1,3 oder 4 C-Atomen, der auch
substituiert sein kann, ist, synthetisiert, indem man
Cytidin-5'-phosphat oder ein zur Diphosphatbildung
geeignetes Derivat dieser Verbindung mit
1-0-Alkylglycero-3-phosphaten umsetzt. Formel

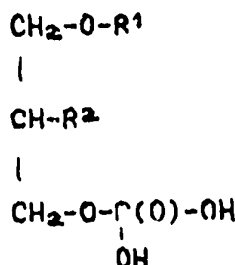


Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkylglycerolen der allgemeinen Formel I,



in der R^1 ein gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Rest mit 6 bis 30 C-Atomen, der auch substituiert sein kann und R^2 ein kurzkettiger Alkyl- oder Alkoxyrest mit 1, 3 oder 4 C-Atomen, der auch substituiert sein kann, ist und von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man 1-0-Alkylglycero-3-phosphorsäuren der allgemeinen Formel II,

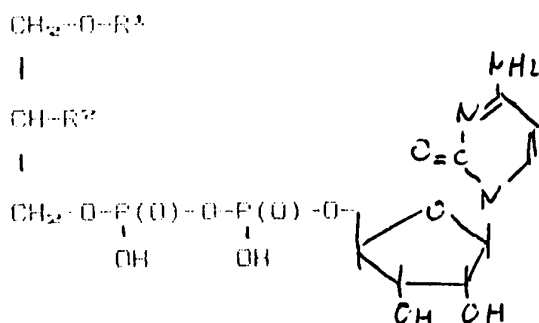


in der R^1 und R^2 die bereits genannten Bedeutungen besitzt, beziehungsweise deren Salze, mit Cytidin-5'-phosphat oder einem aktivierten Derivat dieser Verbindung, in Gegenwart eines Kondensationsmittels oder einer organischen Base bei Temperaturen zwischen 15 und 60°C, kondensiert und das entstandene Kondensationsprodukt isoliert und gegebenenfalls in ein Salz überführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cytidin-5'-morpholidophosphat in Gegenwart einer organischen Base mit der Verbindung II bei Temperaturen von 35–40°C umsetzt, wobei man eine der Komponenten im Überschuß verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cytidin-5'-phosphat mit Verbindung II im Verhältnis 1:0,5 bis 2 umsetzt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkylglycerolen der allgemeinen Formel I, in der R^1 ein gesättigter oder ungesättigter aliphatischer Rest mit 6 bis 30 C-Atomen, der auch substituiert sein kann und R^2 ein kurzkettiger Alkyl- oder Alkoxyrest mit 1, 3 oder 4 C-Atomen, der auch substituiert sein kann, ist, und von deren Salzen. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die chemische und die pharmazeutische Industrie.



Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Nukleosiddiphosphat-diacylglycerol-Addukte durch Umsetzung von Phosphatidsäuren mit Nukleosidmonophosphaten herstellbar sind (M. Paulus et al., J. Biol. Chem., 235 [1960] 1307; Chung Il Hong et al., J. Med. Chem., 31 [1988] 1793). Verfahren zur Herstellung der neuen Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkylglycerole der Formel I sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkylglycerolen der allgemeinen Formel I zu entwickeln.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung neuartiger, physiologisch wirksamer Verbindungen zu entwickeln. Erfindungsgemäß werden die Cytidin-5'-diphosphat-1-0-alkylglycerole der allgemeinen Formel I, hergestellt, indem man 1-0-Alkylglycero-3-phosphorsäuren der allgemeinen Formel II,



in der R^1 und R^2 die bereits genannten Bedeutungen besitzt, beziehungsweise die Salze der Verbindungen, mit Cytidin-5'-phosphat oder einem aktivierten Derivat der Verbindung in Gegenwart eines Kondensationsmittels wie N,N-Dicyclohexylcarbodiimid bei Temperaturen zwischen 15 und 60°C, vorzugsweise bei 35 bis 40°C reagieren läßt. Eine bevorzugte Variante der Umsetzung besteht darin, daß man Cytidin-5'-morpholidophosphat als reaktive Komponente einsetzt und diese mit dem Glycerophosphorsäurederivat II zur Umsetzung bringt. Die Reaktion wird im allgemeinen in Anwesenheit einer organischen Base, z. B. 4-Dimethylaminopyridin oder Pyridin durchgeführt, wobei bei Verwendung des letzteren, auch ohne weiteren Zusatz eines Lösungsmittels gearbeitet werden kann. Es ist zweckmäßig, eine Reaktionskomponente im Überschuß zu verwenden, wobei das Molverhältnis zwischen Cytidin-5'-morpholidophosphat und der Verbindung II wie 1:0,5 bis 2 beträgt. Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei 35 bis 40°C. Die Reaktion wird unter Ausschluß von Wasser durchgeführt. Nach beendeter Umsetzung wird das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockne einrotiert. Der verbleibende Rückstand wird in Chloroform-Methanol-verd. HCl aufgenommen und die wäßrige Phase auf einen pH-Wert von 2 bis 3 eingestellt. Die nach Phasentrennung erhaltene Chloroform-Methanol-Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird nach Aufnehmen in Chloroform-Methanol mit methanolischem Ammoniak behandelt. Das entstandene Diammoniumsalz der Verbindung I wird mit Wasser aus der Chloroform-Methanol-Lösung extrahiert. Durch Einengen der wäßrig-alkoholischen Lösung, Aufnehmen des erhaltenen Rückstandes in wenig Methanol und Zusatz von getrocknetem Aceton wird das Diammoniumsalz von I als chromatographisch einheitliche Verbindung erhalten. Die neuen Verbindungen vom Typ I zeichnen sich durch ihre cytostatische Wirksamkeit aus. So hemmt z. B. das Cytidin-5'-diphosphat-1-0-octadecyl-2-0-methylglycerol I ($\text{R} = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$) konzentrationsabhängig die Zellproliferation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (Tab. 1).

Tabelle 1: Hemmung der Zellproliferation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch Cytidin-5'-diphosphat-1-0-octadecyl-2-0-methylglycerol

Konzentration (μMolar)	3	10	30	100
Hemmung (%)	17	16	87	97

Die Erfindung wird an nachstehendem Beispiel erläutert.

Ausführungsbeispiel

Cytidin-5'-diphosphat-1-0-octadecyl-2-0-methylglycerol I ($\text{R} = \text{C}_{18}\text{H}_{37}$)

Eine Mischung von 1-0-octadecyl-2-0-methylglycerophosphorsäure (1,314 g, 3 ml) und Cytidin-5'-morpholidophosphat (4-Morpholin-N,N'-dicyclohexylcarboxamidin-Salz) (2,605 g, 3,75 mmol) wird viermal mit je 5 ml Pyridin (mit CaH_2 getrocknet) im Hochvakuum zur Trockne einrotiert, zuletzt nach Zugabe von ca. 5 ml Toluol. Der Rückstand wird dann erneut in 20 ml Pyridin aufgenommen und die Lösung unter Ausschluß von Feuchtigkeit 9 Tage bei 37°C gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockne eingeeengt, der Rückstand mehrfach mit ca. 4 ml Toluol versetzt und erneut zur Trockne gebracht. Die erhaltene Substanz wird in einem Gemisch aus Chloroform-Methanol (1:1, v/v, 30 ml) und 0,01 N HCl (15 ml) aufgenommen. Durch tropfenweise Zugabe von 1 N HCl wird die Mischung auf einen pH-Wert von 2 bis 3 eingestellt. Die Chloroform-Methanol-

Phase wird abgetrennt, mit Wasser neutral gewaschen und nach Filtrieren eingeeengt. Der Rückstand wird in einem Gemisch aus Chloroform (13 ml), Methanol–Wasser (2:1, v/v, 10 ml) 1 N methanol. NH_3 (0,2 ml) aufgenommen. Die organische Phase wird abgetrennt und zweimal mit dem genannten Methanol-Wasser-methanol. NH_3 -Gemisch (ca. je 8 ml) extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden eingeeengt. Der Rückstand wird mit wenig Methanol zur Kristallisation gebracht und anschließend mit trockenem Aceton mehrfach ausgewaschen. Nach nochmaligem Umfällen und Trocknen werden 0,8 g des Diammoniumsalzes von I als chromatographisch einheitliche Substanz erhalten.

Dünnschichtchromatographie (Fertigplatte Kieselgel 60, Merck): R_f 0,36 (n-Propanol/25%ig. wäßr. NH_3 /Wasser, 8:2:1, v/v/v; R_f 0,30 (Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser, 25:15:2:4, v/v/v/v). UV-Absorption: λ_{max} 274,3 nm (Wasser); λ_{max} 281,1 nm (0,01 N HCl).