



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 131988

(51) Int. Cl.² C 07 F 9/10

(21) Patentsøknad nr. 2557/71

(22) Inngitt 05.07.71

(23) Løpedag 05.07.71

(41) Alment tilgjengelig fra 07.01.72

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 26.05.75

(30) Prioritet begjært 06.07.70, Forbundsrepublikken Tyskland, nr. P 20 33 361

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive acylpropandiol-(1,3)-fosforsyre-cholinestere.

(71)(73) Søker/Patenthaver MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG
DER WISSENSCHAFTEN E.V.,
Bunsenstr. 10, D-34 Göttingen,
Forbundsrepublikken Tyskland.

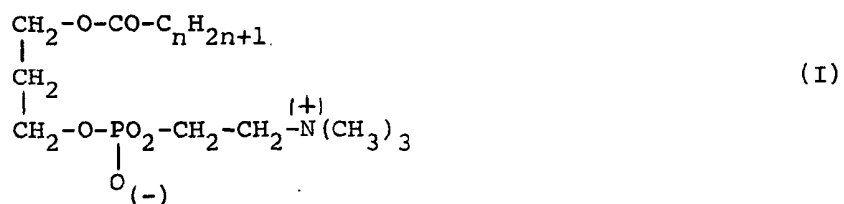
(72) Oppfinner EIBL, Hansjörg,
WESTPHAL, Otto, 7800 Freiburg/Breisgau,
Forbundsrepublikken Tyskland.

(74) Fullmektig Cand. mag. Johan H. Gørbitz.

(56) Anførte publikasjoner Liebig's Ann. Chem. 709, s. 244-45 (1967)
Chem. Phys. Lipids 3 1969 221-233

131988

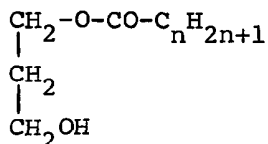
Denne oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av farmakologisk verdifulle acylpropandiol-(1,3)-fosforsyre-cholinestere med den generelle formel:



hvor n er et helt tall fra 7 til 10. I henhold til oppfinnelsen fremstilles de nye forbindelser med formel I ved at man omsetter 1,3-propandiol til monoesteren med formel:

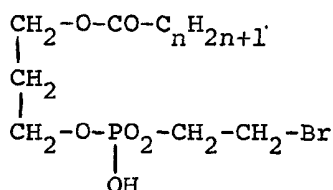
131988

2



II

hvor n har den ovenfor angitte betydning, og omsetter monoesteren med fosforsyre-mono-2-brometylesterdiklorid til acylpropandiol-(1,3)-fosforsyre-2-brometylester med formelen



III

aminerer med trimetylamin, og overfører til det indre salt med formel I ved fjernelse av bromidionene.

De nye forbindelser er løse, amorfe pulvere med et ukarakteristisk smelteforhold, og karakteriseringen foretas derfor ved tynnsjikt-kromatografi eller ved elementæranalyse.

Forbindelsene med den generelle formel I oppviser grenseflateaktive egenskaper og fører ved parenteral administrering i den dyriske organisme til en forandring i grenseflateaktiviteten hos cellemembraner. Høyere konsentrasjoner forårsaker i almidelighet cytolyse, f.eks. hemolyse, mens det ved sublytiske doser kan iakttas en doseavhengig forandring i membrangrenseflateaktiviteten. De nye forbindelser er særlig anvendelige som immunsuppressiva, idet doseområdet i hvilket immunsuppresjonen inntreffer blir bredere desto kortere kjedelengden av fettsyrekomponenten er.

De følgende eksempler skal tjene til å illustrere oppfinnelsen ytterligere.

Eksempel 1

Kaprinoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-mono-cholinester

a) Propandiol-(1,3)-kaprinsyreester

Til 66 mmol propandiol-(1,3), 5 ml pyridin og 5 ml kloroform settes dråpevis under omrøring ved 0°C 18 mmol kaprinoyl-klorid i 20 ml absolutt kloroform. Etter 30 minutter fjernes isbadet, og omrøring fortsettes i 12 timer ved romtemperatur. Man inndamper i vakuum ved 40 til 50°C (bad) og heller det oljeaktige residuum i 800 ml isavkjølt 0,2N svovelsyre. Det hvite bunnfall avsuges, vaskes godt med vann og tørres i vakuum over blågel (silikagel med fuktighetsindikator). Omkrystallisasjon fra

petroleter (40 til 60°C) gir råproduktet som hovedsakelig består av monoesteren av propandiolen. Etter kromatografi på silikagel og omkrystallisering fra petroleter får man den rene kaprinoyl-propandiol-(1,3).

b) Kaprinoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-mono-cholinester

Til 15 ml absolutt kloroform ved 0°C setter man 45 mmol vannfritt trietylamin og 18,5 mmol β -brometylfosforsyre-diklorid. Under omrøring og isavkjøling tilsetter man dråpevis en oppløsning av 6,5 mmol propandiol-(1,3)-mono-kaprinsyreester i 15 ml absolutt kloroform. Blandingen bringes i 6 timer til romtemperatur og i 12 timer til 40°C. Deretter avkjøler man den mørke oppløsning til 0°C og tilsetter 15 ml 0,1N kaliumkloridoppløsning for å hydrolysere fosforsyrekloridet. Etter 1 times omrøring og tilsetning av 25 ml metanol innstiller man på ca. pH 3 med konsentrert saltsyre og ryster godt. Residuet i den organiske fase tørres i høyvakuum over fosforpentoksyd.

Fosforyleringsproduktet oppvarmes i 50 ml butanol med 10 ml trimetylamin i 12 timer til 55°C, avkjøles deretter til 0°C, det utfelte, krystallinske produkt avsuges, vaskes med aceton, vann og igjen med aceton. Etter behandling med 1 g sølvacetat i 90%ig metanol (30 minutters omrøring) kromatograferes deretter på silikagel for å oppnå fullstendig rensning, og deretter omkrystalliseres fra butanon. Man får kaprinoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-mono-cholinesteren i et utbytte på 50%, basert på propandiol-(1,3)-mono-fettsyreesteren. R_f -verdi 0,10 i kloroform/metanol/vann 65:30:4

$C_{18}H_{40}NO_7P$ (413,6) Beregnet: C 52,2 H 9,74 N 3,38 P 7,48
(Monohydrat) Funnet: C 51,1 H 9,85 N 3,35 P 7,40

I henhold til fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ble de følgende lysolecitin-lignende forbindelser fremstilt:

131988

Tabell 1Sammenstilling av syntetiserte acyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-cholinester-monohydrat-forbindelser

	Formel (molekylvekt)		Analyseverdi			
			C	H	N	P
Oktanoyl-propandiol-(1,3)-mono-cholinester	$C_{16}H_{36}NO_7P$	Beregnet	49,85	9,41	3,63	8,03
	(385,45)	Funnet	49,16	9,74	3,57	8,46
Nonanoyl-propandiol-(1,3)-mono-cholinester	$C_{17}H_{38}NO_7P$	Ber.	51,11	9,58	3,50	7,75
	(399,48)	F.	51,02	9,48	3,67	7,73
Undekanoyl-propandiol-(1,3)-mono-cholinester	$C_{19}H_{42}NO_7P$	Ber.	53,38	9,90	3,28	7,25
	(427,53)	F.	53,15	10,50	2,94	7,52

De nye forbindelser med den generelle formel I kan administreres på vanlig måte. Særlig foretrekkes intraperitoneal injeksjon. Dosen kan variere innenfor vide grenser. Alt etter den ønskede grad av immunsuppresjon kan doser på 0,01-5 mg/kg anvendes.

Forsøksrapport

Forbindelsene

- A = Oktanoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-monocholinester,
 B = Nonanoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-monocholinester
 og
 C = Undekanoyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-monocholinester
 ble undersøkt i sammenligning med
 D = Lauroyl-propandiol-(1,3)-fosforsyre-monocholinester
 som følger:

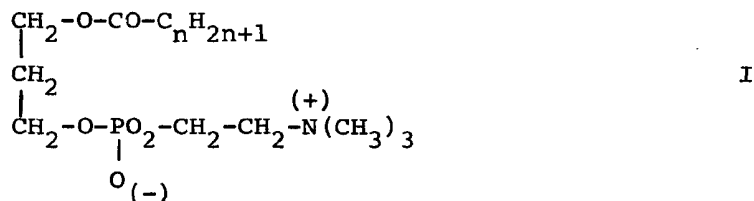
Lysolecitinanalogene (LLA) resp. 0,9 % NaCl som kontroll ble gitt i.p. til mus med normal vekt i en mengde på 250 µg pr. dyr 4 dager resp. 2 dager før administreringen av antigenet. Som antigen tjente 2×10^7 svineerythrocyter (HE)/dyr likeledes administrert i.p. På de i tabellen angitte dager ble 5 dyr avlivet, deres milt ble tatt ut og "Plaque-forming-cells" (PFC) pr. milt ble bestemt ved metoden ifølge Cunningham. Den prosentvise forandring i PFC/milt sammenlignet med kontrollen er et mål for den immunsuppressive resp. immunstimulerende virkning for forbindelsen. Ved metoden ifølge Cunningham finner man den humorale immunitet.

131988

Forbindelse	3. dag	%	4. dag	%	5. dag	%
Kontroll	-	-	14.000 [±] 5.400	100	26.800 [±] 800	100
A	-	-	1.700 [±] 1.200	12	-	-
B	-	-	3.500 [±] 4.600	25	7.700 [±] 7.000	29
C	-	-	3.400 [±] 1.200	24	3.500 [±] 2.800	13
Kontroll	2.800 [±] 400	100	70.000 [±] 20.000	100	58.000 [±] 50.000	100
D	900 [±] 400	32	14.000 [±] 8.000	20	22.000 [±] 13.000	38

131988P a t e n t k r a v

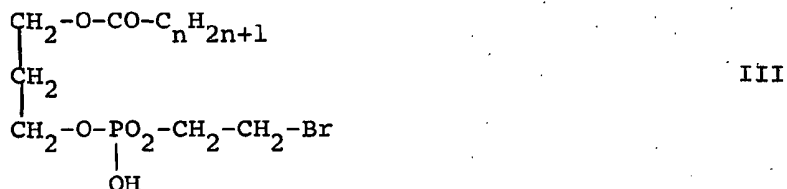
Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive acylpropandiol-(1,3)-fosforsyre-mono-cholinestere med den generelle formel



hvor n er et helt tall fra 7 til 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at man fra propandiol-(1,3) fremstiller monofettsyreesteren med den generelle formel



hvor n har den ovenfor angitte betydning, omsetter esteren med fosforsyre-mono-2-brometylesterdiklorid til acylpropandiol-(1,3)-fosforsyre-2-brometylester med formelen:



hvor n har den ovenfor angitte betydning, aminerer med trimetylamin og overfører til det indre salt med formel I under fjernelse av bromidionene.