

P. 47.095
Case 5/449



19 FEB 1971

388446

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE C07 A61
SUBCLASE F K

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de DR. KARL THOMAE, GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER
HAFTUNG

entidad / ~~nacionalidad~~ alemana

con domicilio en Biberach an der Riss, República Federal
Alemana

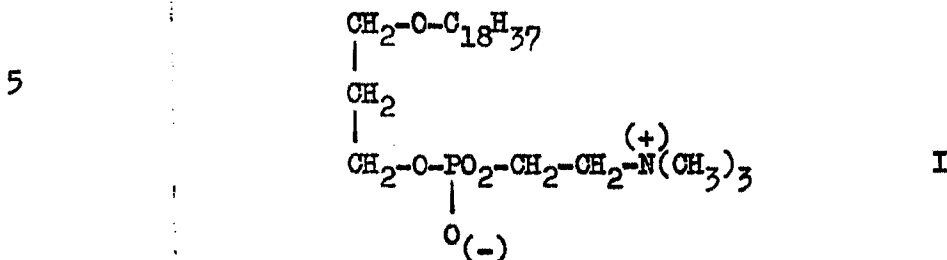
por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ESTER MONOCOLINI-
CO DE ACIDO 3-OCTADECILOXI-PROPANOL-(1)-FOSFORICO"
(Clase Internacional C07f)

388446

19

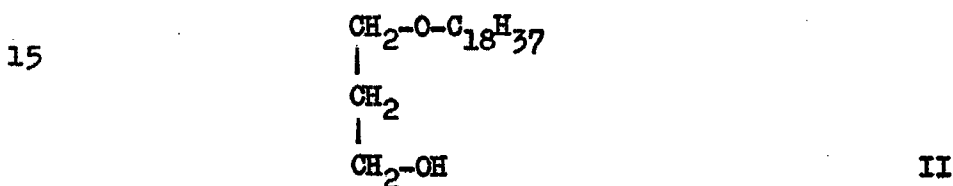


El invento concierne al éster monocólico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico farmacológicamente valioso de la fórmula

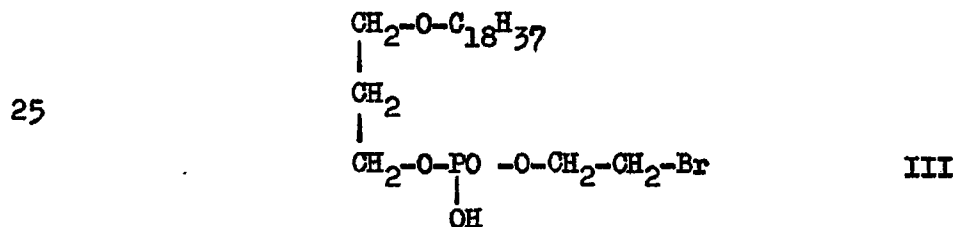


así como a la preparación del mismo.

10 El compuesto de la fórmula I de acuerdo con el invento se prepara alcoholando 1,3-propándiol con un halogenuro o sulfato de octadecilo para formar 3-octadeciloxi-propanol-(1) de la fórmula



20 haciendo reaccionar el éster con dicloruro de éster mono-2-bromoetilico de ácido fosfórico para formar éster 2-bromoetilico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico de la fórmula



30 someténdolo a aminación con trimetilamina, y transformándolo en la sal interna de la fórmula I por eliminación de los iones bromuro.



La sustancia de acuerdo con el invento es un polvo amorfo poco coherente con un comportamiento de fusión no característico. La caracterización tiene lugar por lo tanto mediante la cromatografía en capa delgada (valor R_F) y por análisis elemental.

El compuesto de acuerdo con el invento, que no es metabolizado en el organismo por fosfolipasa B, tiene propiedades tensioactivas y, en el caso de administración parenteral al organismo animal, conduce a una modificación de la tensioactividad de membranas celulares. Mientras que mayores concentraciones provocan citólisis, por ejemplo hemólisis, en dosis sublétricas se puede observar una variación, dependiente de la dosis, de la tensioactividad de las membranas. El compuesto de acuerdo con el invento se puede utilizar especialmente como coadyuvante inmunológico.

Ejemplo de preparación.

a) 3-octadeciloxi-propanol-(1).

2,3 g (0,1 moles) de sodio son disueltos en 38 g (0,5 moles) de 1,3-propándiol anhidro y la carga es calentada a 150°C bajo vigorosa agitación durante 16 horas, después de añadirse 57 g (0,15 moles) de yoduro de n-octadecilo. Después de enfriar, se añaden 200 ml de éter y 100 ml de éter de petróleo (30-50°C), se agita bien a fondo y se decanta del residuo de color pardo muy viscoso. Después de secar la solución con sulfato de sodio, se obtienen 48,7 g de producto bruto. Al recoger en éter, la mayor parte del diéter que resulta como subproducto, así como una parte del yoduro de alcohol, quedan sin disolver. La solución en éter sobrenadante es concentrada por evapo

388446

19 FEB. 1971



5 ración y el residuo es cromatografiado sobre 250 g de gel de sílice primero en éter de petróleo puro (30-50°C) y posteriormente con éter de petróleo (30-50°C)/éter (1:1), obteniéndose el monoéster en forma de sustancia incolora pura con un valor de R_F de 0,35. La recristalización en éter de petróleo (30-50°C) proporciona cristales incoloros de p. de f. 50-51°C. Rendimiento: 10,5 g (correspondiente a 32% de la teoría).

10 b) Ester monoclinico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico.

15 A una solución de 4,4 g (75 milimoles) de trietilamina y 4,8 g (20 milimoles) de dicloruro de éster mono-2-bromoetilico de ácido fosfórico en 50 ml de cloroformo absoluto se añade gota a gota lentamente, bajo agitación y enfriamiento con hielo, una solución de 6,6 g (20 milimoles) de 3-octadeciloxi-propanol-(1) en 50 ml de cloroformo. Después de calentar a la temperatura ambiente se deja reposar durante 24 horas.

20 Para la hidrólisis, después de nuevo enfriamiento a 0°C, se añaden gota a gota bajo agitación 30 ml de solución acuosa 0,1 N de cloruro de potasio. Después de reposar durante una hora a la temperatura ambiente y de añadir 50 ml de metanol, se ajusta a aproximadamente pH 3 con ácido clorhídrico concentrado, se agita bien a fondo durante algunos minutos y se separa en el embudo separador. Después de secar sobre sulfato de magnesio, el residuo de la fase orgánica es secado en elevado vacío sobre pentóxido de fósforo. El éster bromoetilico bruto es recogido luego en benceno absoluto y es filtrado con succión de las sales amónicas no disueltas. A partir del filtrado

25

30



se obtienen 10,4 g de sustancia c rea de color amarillo claro. Esta es disuelta, sin purificación cromatográfica intermedia, en 200 ml de cloroformo absoluto y es agitada a la temperatura ambiente durante 3 días juntamente con 15 ml de trimetilamina condensada. Después de concentrar la solución por evaporación y de disolver y precipitar de nuevo el residuo con acetona en solución de cloroformo, se obtienen 10,4 g de bromuro de éster monocolínico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico bruto en forma de polvo incoloro. Este, para la eliminación de los iones bromuro, es disuelto en 300 ml de metanol y es agitado vigorosamente a la temperatura ambiente durante 30 minutos con 3 g de acetato de plata. A partir del filtrado, después de concentrar por evaporación, se obtienen 9,2 g de éster colónico bruto. De estos se cromatografía 1,0 g sobre 200 g de gel de sílice con cloroformo/metanol/agua (65:25:4), pudiendo ser recuperado el producto final con un valor de R_F de 0,20 después de disolver y precipitar de nuevo con acetona en cloroformo, en forma de polvo blanco como la nieve. Rendimiento 70% de la teoría (pasando por las dos etapas)

$C_{26}H_{58}O_6NP$ (511,7) (en forma de monohidrato)

Calc. : C 61,03 H 11,42 N 2,74 P 6,05

Enc. : C 61,38 H 11,14 N 2,72 P 5,98

Las propiedades coadyuvantes del compuesto de acuerdo con el invento se ensayaron del siguiente modo:

1.- El ensayo tuvo lugar ayudándose del método de Dresser (Immunology 9 (1965) 261). El fundamento de esta disposición de ensayo consiste en la inducción de tolerancia mediante una proteína soluble. En esta disposi-

388446

19 FEB 1971



ción de ensayo se investiga la aptitud de sustancias para
reforzar en el organismo la respuesta inmune frente a la
gamma globulina bovina (GGB) inmunógena de modo extraordi-
nariamente débil de tal modo que los anticuerpos puedan
5 ser detectados irrecusablemente frente a esta proteína.
En este caso, unos ratones recibieron una inyección intra-
peritoneal de GGB exenta de aglomerados separada por cen-
trifugación, en una dosis de 5 mg. Normalmente, con esta
dosis no se puede detectar ningún anticuerpo después de
10 8 a 10 días. Por lo tanto, los animales no están inmuniza-
dos. Estos son incapaces bajo estas condiciones de propor-
cionar una respuesta inmune frente a la GGB. Por el con-
trario, si se añade la GGB en combinación con un coadyu-
vante, se impide la formación transitoria de tolerancia y
15 los animales forman entonces anticuerpos frente a la GGB
que por lo demás es tolerógena. 10 hasta 12 días después
de administración de la proteína tolerógena se inyecta a
los animales nuevamente GGB, que está señalado con yodo-
125. Si los animales son tolerantes, el antígeno señalado
20 es degradado lentamente igual que gamma-globulina propia.
Si por el contrario los animales son inmunes, se llega a
una llamada eliminación inmune, es decir, el antígeno se-
ñalado es eliminado de la circulación con rapidez esencial-
mente mayor. Como medida de los anticuerpos formados sir-
ve por lo tanto la velocidad de eliminación de GGB señala-
da con yodo-125.
25

En el ensayo del compuesto de acuerdo con el in-
vento se pudo comprobar que, en comparación con un grupo
testigo que solo había sido inyectado previamente con sal
30 común, los animales tratados con GGB y éster monocólico

388446

19 FEB 1971



de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico eliminaban la proteína señalada 10 hasta 100 veces con más rapidez desde la circulación.

5 2.- Otro método de determinación inmunológica de anticuerpos, con cuya ayuda se pueden determinar las propiedades del coadyuvante, se basa en que el antígeno (GGB) es copulado con eritrocitos, y las células así tratadas son incubadas con el suero en una serie geométrica de diluciones durante 20 horas a 42°C. Si el suero contiene anticuerpos, los eritrocitos son aglutinados. La máxima dilución de suero con la que todavía se puede observar este fenómeno, es designada como concentración o título de anticuerpos del suero.

15 También con este método esencialmente más inexacto, se puede comprobar irrecusablemente que el compuesto de acuerdo con el invento es un coadyuvante muy activo.

20 El compuesto de la fórmula I de acuerdo con el invento puede ser aplicado de manera usual. Se prefiere especialmente la inyección intraperitoneal. La dosis puede oscilar dentro de amplios límites. Según el grado deseado de potenciación de la respuesta inmune, se pueden administrar dosis de 0,5 hasta 10 mg/kg.

25 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal Alemana, el 27 de Febrero de 1.970, bajo el Nº P 20 09 341.8, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

30

16.2.71

388446

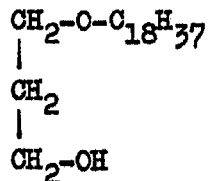
19 FEB 1971



REIVINDICACIONES

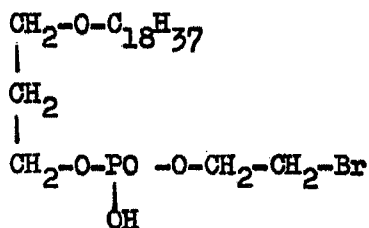
Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1. Procedimiento para la preparación de éster monocolínico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico, caracterizado porque se alcoholiza 1,3-propandiol con un halogenuro o sulfato de octadecilo para formar 3-octadeciloxipropanol-(1) de la fórmula



II

se hace reaccionar el éter de la fórmula II con dicloruro de éster mono-2-bromoetilico de ácido fosfórico para formar éster-2-bromoetilico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico de la fórmula



se somete a aminación con trimetilamina al compuesto de la fórmula III y se le transforma en la sal interna de la fórmula I con eliminación de los iones bromuro.

2. Procedimiento para la preparación de éster monocolínico de ácido 3-octadeciloxi-propanol-(1)-fosfórico.

Ref.

388446

19 FEB 1971



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid,

19 FEB 1971

P.A.

10

Alberto de Euzkadi
Por Poder. *Arta*

JQ

12.6.71

- 9 -

h.j.