



F.C. 21-II-75

Int. Cl.:	B01F//C07D; A61J
-----------	---------------------

407949

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., Inc.

Residencia: 126 East Lincoln Avenue  
RAHWAY, NEW JERSEY 07065  
ESTADOS UNIDOS

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MONOLEATO DE ISOMANIDA PURO"

407949



1                    Esta invención se refiere a un procedimiento pa-  
ra la preparación de monooleato de isomanida puro y a su  
uso como agente emulsionante, especialmente en la prepara-  
ción de emulsiones de agua en aceite para uso como coadyu-  
vantes en la preparación de vacunas.

5                    El uso de coadyuvantes del tipo de emulsión para  
aumentar la antigenicidad de las vacunas parenterales ha  
sido conocido durante muchos años. En general, comprenden  
emulsiones de aceites minerales o vegetales y agua, siendo  
10 la fase continua el aceite o el agua y siendo la fase dis-  
continua el agua, el aceite o una segunda emulsión de agua  
en aceite. Los coadyuvantes de emulsión generalmente requie-  
ren para su estabilidad otros componentes conocidos como  
agentes emulsionantes. Un agente emulsionante comúnmente  
15 empleado en la técnica anterior es el monooleato de manida  
comercial. Por ejemplo, en la patente estadounidense  
3.149.036 de Woodhour y colaboradores, cuya descripción se  
incorpora aquí a título de referencia, se describe la pre-  
paración de coadyuvantes del tipo de emulsión de agua en  
20 aceite que comprenden como emulgente "monooleato de mani-  
da" comercial.

25                    A pesar de la probada eficacia de los coadyuvan-  
tes del tipo de emulsión para aumentar la respuesta de an-  
ticuerpos, ninguno ha sido aceptado como vehículo para una  
vacuna comercial. Esta falta de aceptación ha sido debi-

407949



1 da en gran parte a los informes sobre la tumorigenicidad  
de la preparación coadyuvante en animales y específicamen  
te del monooleato de manida comercial incorporado a los  
mismos.

5 Por lo tanto, existía la necesidad de un agente  
con capacidad emulgente tan bueno o mejor que el monoolea  
to de manida comercial pero desprovisto de propiedades  
tumorigénicas.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado, como reali-  
zación de esta invención, que el monooleato de isomanida  
puro (99 %) posee propiedades emulgentes superiores a las  
del monooleato de manida comercial y está desprovisto de  
propiedades tumorigénicas. El uso del monooleato de isoma  
nida puro en lugar del monooleato de manida comercial en  
15 los coadyuvantes de las vacunas tiene las ventajas adicio-  
nales de reducir su poder irritante para el huésped,  
presentar mayor potencia inmunológica de la vacuna y no  
presentar tumorigenicidad animal. Como ventaja adicional,  
el uso del monooleato de isomanida puro conduce a una  
20 constancia en el producto, tan importante en el campo de  
los medicamentos, mientras que el monooleato de manida  
comercial, al tratarse de una mezcla compleja de composi-  
ción variable, carece de la requerida constancia en el  
producto.

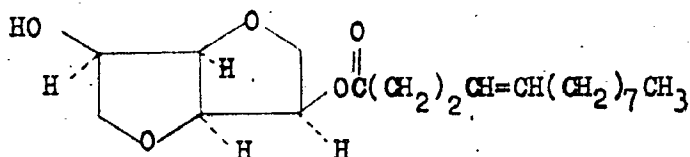
25 Otra realización de este invento es el nuevo

407949



25

1 producto, monooleato de isomanida puro, de estructura:



5

y las siguientes características:

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} + 66,7^\circ$  (C = 1,0, CHCl<sub>3</sub>)

Indice de refracción:  $n_D^{22} 1,4780$

Equivalente de saponificación: 99,7 % del teórico

10

Punto de ebullición: 220°/0,200 mm Hg

Destilación molecular: 105-111°C/ <1 micra Hg

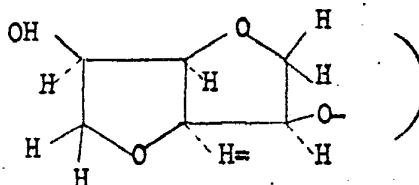
Espectro de masas: m/e = 410

Espectro RMN en (d<sub>6</sub> - dimetilsulfóxido)

$\delta$  0,9-2,2 [multiplete, 31H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>]

15

$\delta$  3,1-5,05 (multiplete, 9H,



20

$\delta$  5,3 (triplete, 2H, -CH=CH-)

Espectro infrarrojo

25

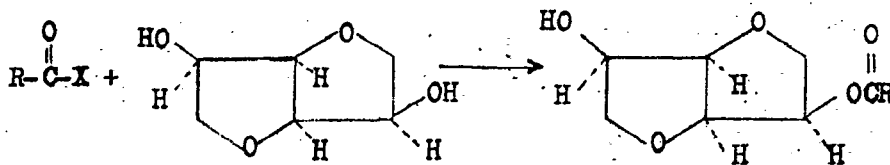
407949



	<u>Número de ondas (cm<sup>-1</sup>)</u>	<u>Intensidad</u>
1	3444	media
	3000	"
	2920	fuerte
5	2850	"
	1740	"
	1650	muy débil
	1470	media
	1240	"
10	1170	"
	1120	"
	1080	"
	1060	"
	1020	"

15 Otra realización de este invento es el nuevo procedimiento para su preparación. Los preparados de la técnica anterior son mezclas de múltiples componentes que contienen menos del 10 % de monooleato de isomanida.

20 El nuevo procedimiento de esta invención puede ser descrito mediante la siguiente ecuación:



25

407949



1 donde R es  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-$

X es OH; halógeno como bromo, cloro o yodo; alcoxi inferior de 1 a 4 átomos de carbono aproximadamente como metoxi, etoxi, propoxi o butoxi; o ariloxi de un solo núcleo, preferiblemente fenoxi.

Las condiciones de reacción varían algo según la naturaleza del sustituyente X.

10 Cuando X es halógeno, el haluro de oleoilo se agrega a un exceso de isomanida disuelto en un disolvente inerte como acetona, un hidrocarburo aromático como benceno, tolueno, xileno o similares, un éter como tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano o similares o un hidrocarburo halogenado como 1,2-dicloroetano, cloroformo, 15 cloruro de metileno o similares. La temperatura de la reacción puede estar comprendida entre unos  $-20^\circ\text{C}$  y la temperatura de reflujo del disolvente. Cuando se eleva la temperatura por encima de unos  $50^\circ\text{C}$ , la reacción transcurre rápidamente sin que sea necesaria la presencia de un aceptor de ácido. A las temperaturas más bajas, es ventajosa 20 la presencia de una base como un carbonato o bicarbonato alcalino o alcalino-térreo, piridina, una amina terciaria como trietilamina, N,N-dimetilanilina o 1,4-diazabicyclo [2,2,2]octano.

25 Cuando X es hidroxilo, se deja reaccionar en un

407949



1 disolvente una mezcla de ácido oleico, un exceso de iso-  
manida y preferiblemente un catalizador ácido. El catali-  
zador puede ser cualquier ácido mineral fuerte como sul-  
fúrico, clorhídrico, perclórico, bromhídrico, fluorhídri-  
5 co, clorosulfónico y etanosulfónico; una resina cambiada-  
ra de catión regenerada con ácido; diversas sales de mer-  
curio, plata, cobalto, níquel y cerio o ácidos sulfónicos  
aromáticos como los ácidos benzosulfónico, p-toluensulfó-  
nico o  $\beta$ -naftalensulfónico. El disolvente empleado es ge-  
10 neralmente un disolvente aromático o un disolvente aromá-  
tico halogenado como benceno, tolueno, xileno, clorobence-  
no o similares. La reacción se lleva a cabo a cualquier  
temperatura comprendida entre la ambiente y la temperatura  
de reflujo del disolvente empleado.

15 Cuando X es alcoxi inferior o ariloxi, se hace  
reaccionar una mezcla de cantidades aproximadamente equi-  
moleculares del éster de ácido oleico e isomanida, prefe-  
riblemente en presencia de una cantidad catalítica de una  
base o de un ácido. La reacción puede efectuarse en un di-  
20 solvente como un hidrocarburo aromático o un éter como  
tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano o similares,  
a cualquier temperatura comprendida aproximadamente entre  
-20°C y la temperatura de reflujo del disolvente. El cata-  
lizador es preferiblemente un alcóxido de metal alcalino  
25 y preferible, pero no necesariamente, la porción alcoxi

407949



1 del éster oleico y del catalizador son iguales. Alternati-  
vamente, puede emplearse un ácido mineral fuerte como áci-  
do sulfúrico, sulfónico o clorhídrico. La reacción tam-  
bién puede efectuarse en ausencia de un disolvente, en cu-  
5 yo caso la mezcla de las dos sustancias reaccionantes y un  
alcoído de metal alcalino se calientan por encima del pun-  
to de fusión, preferiblemente a presión reducida, para des-  
tilar el subproducto alcohólico.

#### EJEMPLO 1

##### Monocoleato de Isomanida

10

##### Etapa A: Preparación de cloruro de oleoilo

15

En 2400 ml de benceno, contenidos en un matraz de  
fondo redondo y 5 litros de capacidad, provisto de agita-  
dor, separador de agua Dean-Stark con condensador y fuen-  
te de nitrógeno, se cargan 350 g (1,24 moles) de ácido  
oleico. El sistema se seca por destilación de 300 ml de  
benceno a la presión atmosférica. La solución se enfría a  
25°C. El matraz se sumerge en un baño de agua y el separa-  
dor Dean-Stark y la fuente de nitrógeno se sustituyen por  
un embudo de decantación de 500 ml, un termómetro de inmer-  
20 sión y un respiradero Drierite.

20

A lo largo de un periodo de 15 minutos se añaden  
gota a gota 393 g (264 ml, 3,10 moles) de cloruro de oxa-  
lilo. Durante la adición se mantiene una temperatura de  
reacción de  $25 \pm 1^\circ$ . La mezcla de reacción se agita a 25°C

25



1 durante 1 hora. Después la mezcla de reacción se calien-  
ta a reflujo durante 2 horas. El exceso de cloruro de oxa-  
lilo y el cloruro de hidrógeno se separan destilando  
1750 ml de benceno a la presión atmosférica, seguido de  
5 concentración a vacío de la masa hasta formar un aceite,  
mientras se mantiene la temperatura por debajo de 100°C.  
La mezcla se lava tres veces con 880 ml cada vez de bence-  
no seco, por concentración a vacío hasta formar un aceite  
todas las veces. El rendimiento de cloruro de oleilo cru-  
do, turbio y de color ambarino, es de 373 g (100-101 %).

10

Etapa B: Preparación de isomanida

En un matraz de fondo redondo y 5 litros de capa-  
cidad, provisto de agitador y condensador de reflujo, se  
introducen 1000 g (5,49 moles) de D-manitol y 3000 ml de  
15 ácido clorhídrico concentrado y se calienta a reflujo du-  
rante 18 horas. La mezcla se concentra sobre un baño de  
vapor hasta formar un jarabe. Este último se lava después  
dos veces con 300 ml de agua cada vez, por concentración  
a vacío hasta formar un aceite todas las veces. Después  
20 se separa el agua calentando el jarabe residual en un ba-  
ño de vapor bajo vacío, durante 2,5 horas. El jarabe se  
destila a vacío a través de una columna corta. No se re-  
cogen cabezas. Se obtienen 283,18 g de un aceite viscoso  
amarillo, p.e. 134-146°C/0,5-1,0 mm, que solidifica al per-  
manecer en reposo.

25

407949



1 El destilado de bajo punto de fusión se disuel-  
ve en 935 ml de una mezcla caliente de acetato de etilo/  
etanol (95:5). La solución amarilla transparente se en-  
fría a 25°C a lo largo de 3 horas. La cristalización se  
5 produce a 50-55°C. La mezcla se envejece a la temperatu-  
ra ambiente durante 1 hora y a 0-5°C durante otra hora.  
Se filtran los cristales, se lavan con 100 ml de acetato  
de etilo frío (5°C) y dos veces con 150 ml de hexano cada  
vez. El producto se seca a vacío a 40°C/0,2 mm. Se obtie-  
10 nen 228,6 g (28-29 %) de isomanida, p.f. 86-88°C.  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +91,27°, C = 2,9.

Etapa C: Preparación de monooleato de isomanida

Se añaden 525 g (3,60 moles) de isomanida a  
6800 ml de tolueno contenidos en un matraz de fondo re-  
15 dondo y 12 litros de capacidad, provisto de agitador, se-  
parador de agua Dean-Stark con condensador y una fuente  
de nitrógeno. El sistema se seca por destilación de 400 ml  
de tolueno. El separador de agua y la fuente de nitrógeno  
se sustituyen por un embudo de decantación de 500 ml y un  
20 respiradero Drierite. A la solución a reflujo se añaden,  
a lo largo de 15 minutos, 361 g (1,20 moles) de cloruro  
de oleilo. La mezcla de reacción se calienta a reflujo  
durante 2 horas. Se destilan 2145 ml de tolueno a la pre-  
sión atmosférica. La mezcla de reacción se deja llegar a  
25 25°C sin emplear baño de refrigeración, durante cuyo tiem-

407949



1 po cristaliza la isomanida que no ha reaccionado. La mez-  
cla se envejece a la temperatura ambiente (25°C) durante  
16 horas. Se filtra la mezcla y el sólido se lava dos ve-  
ces con 290 ml de tolueno cada vez para dar 322,2 g (92-  
5 93 %) de isomanida recuperada. Se combinan el filtrado y  
las aguas de lavado y se lavan cinco veces con 490 ml de  
agua cada vez. La solución toluénica se seca destilando  
450 ml de tolueno a la presión atmosférica y después se  
enfria a la temperatura ambiente (25°C). El producto en  
10 tolueno se pasa por una columna (5,5 x 25 cm) que contie-  
ne 485 g de óxido de aluminio relleno en tolueno. La co-  
lumna se lava con 485 ml de tolueno y las aguas de lavado  
se agregan al eluato. La capa amarilla de tolueno se tra-  
ta con 48,5 g de Nuchar C-1000N durante 2 horas a 25°C.  
15 Se filtra la mezcla y la torta de carbón se lava dos ve-  
ces con 100 ml de tolueno cada vez. La solución toluénica  
amarillo pálido se concentra a vacío sobre baño de vapor  
para dar 414,24 g (84-85 %) de producto crudo amarillo pá-  
lido. Se destilan 787 g de monooleato crudo de la siguien-  
te forma, empleando un aparato de destilación molecular  
20 centrífuga. Se recogen unas cabezas de 23,6 g a 83-85°/ <1  
micra para separar el oleato de metilo. La fracción prin-  
cipal de 600,7 de monooleato (esencialmente incoloro) se  
recoge a 105-111°/ <1 micra. El rendimiento es de 64-65 %  
25 calculado sobre el ácido oleico. Un ensayo de la fracción

407949

25



1 principal por cromatografía en fase de vapor indica la  
 presencia de 99,9 %+ de monooleato, con trazas de ácido  
 oleico, oleato de metilo y dioleato.

Espectro de masas - m/e 410

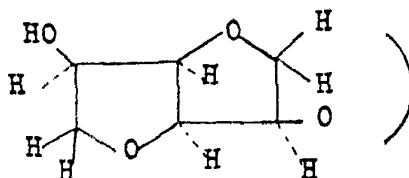
5 Infrarrojo (neto) - carbonilo de éster a  $1740\text{ cm}^{-1}$

RMN ( $d_6$  DMSO)

$\delta$  0,9-2,2 (m, 31,  $(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7$ )

$\delta$  3,1-5,05 (m, 9,

10



$\delta$  5,3 (t, 2,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ).

#### EJEMPLO 2

#### 15 Monooleato de isomanida a partir de ácido oleico e isomanida

Se calienta a reflujo durante 12 horas una mez-  
 20 cla de 4,0 g (0,014 moles) de ácido oleico, 6,12 g (0,042  
 moles) de isomanida y 0,4 g (0,002 moles) de ácido p-to-  
 luensulfónico en 120 ml de tolueno, durante cuyo tiempo  
 se separa agua empleando un separador de agua. Después  
 de enfriar, la mezcla de reacción se filtra con ayuda de  
 tierra de diatomeas y se concentra a vacío. El residuo se  
 25 trata con 25 ml de hexano. La isomanida insoluble se se-  
 para por filtración y el filtrado se pasa por un lecho



1 de alúmina para separar el ácido p-toluensulfónico y el  
 ácido oleico. El filtrado se destila a vacío para dar  
 monooleato de isomanida, p.e. 220°C/0,200 mm Hg.

EJEMPLO 3

5 Monocoleato de isomanida a partir de oleato de metilo e  
isomanida

Se calienta a vacío (25-50 mm Hg) a 100°C, du-  
 rante 1 hora, una mezcla de 5,93 g (0,02 moles) de olea-  
 to de metilo, 8,77 g (0,02 moles) de isomanida y 0,0524 g  
 10 (0,001 moles) de metóxido sódico. La masa fundida se en-  
 fría a la temperatura ambiente. El sólido oleoso se trata  
 con 40 ml de hexano. La isomanida se separa por filtra-  
 ción y el filtrado se destila a vacío para dar monooleato  
 de isomanida, p.e. 218-222°C/0,175 mm Hg.

EJEMPLO 4

15 Preparación de coadyuvante de aceite de cacahuet empleando  
monooleato de isomanida puro al 10, 6, 4 y 2%

	<u>Porcentaje en volumen</u>			
Aceite de cacahuet	86	90	92	94
20 Monoestearato de aluminio	4	4	4	4
20 Monooleato de isomanida puro	10	6	4	2

El monooleato de isomanida estéril se agrega al  
 aceite de cacahuet estéril y se mezcla íntimamente. El  
 vehículo bivalente aceite-monooleato de isomanida se agre-  
 25 ga al monoestearato de aluminio estéril. La mezcla triva-

407949

25 OCT



1 lente es solubilizada elevando la temperatura hasta unos  
120°C, con agitación constante para garantizar la disper-  
sión íntima del monoestearato de aluminio en el vehículo  
oleoso bivalente. Se deja enfriar la mezcla a la tempera-  
5 tura ambiente (20-30°C).

EJEMPLO 5

Preparación de vacunas contra la gripe con coadyuvante de  
aceite de cacahuet, empleando monooleato de isomanida pu-  
ro al 5, 3, 2 y 1 %

10 El coadyuvante de aceite de cacahuet obtenido en  
el Ejemplo 4 se utiliza para preparar una vacuna contra  
la gripe, agitándolo lentamente en un volumen igual de una  
solución salina regulada con fosfato que contiene 2800 uni-  
dades CCA/ml de virus bivalente de la gripe (1600 unida-  
15 des CCA/ml de A<sub>2</sub>/Aichi y 1200 unidades CCA/ml de B/Mass./3/66).

EJEMPLO 6

Preparación de coadyuvante de aceite mineral utilizando mo-  
nooleato de isomanida puro al 5, 3, 2 y 1 %

	<u>Porcentaje en volumen</u>			
20 Aceite mineral	90	94	96	98
Monoleato de isomanida	10	6	4	2

El monooleato de isomanida se agrega al aceite  
mineral y se mezcla íntimamente.

25

407949



1

EJEMPLO 7

Preparación de vacuna con coadyuvante de aceite mineral, empleando monooleato de isomanida puro al 5, 3, 2 y 1 %

5

El coadyuvante de aceite mineral del Ejemplo 5 se utiliza para preparar una vacuna contra la gripe, agitando lentamente en un volumen igual de una solución salina regulada con fosfato que contiene 2800 unidades CCA/ml de virus bivalente de la gripe (1600 unidades CCA/ml de A<sub>2</sub>/Aichi y 1200 unidades CCA/ml de B/Mass/3/66).

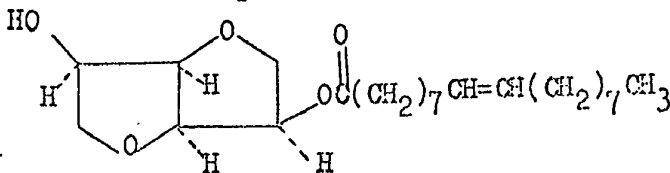
10

Habiendo descrito la invención se considera como una novedad y, por lo tanto, reclamamos como de nuestra propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

15

1 Un procedimiento para la preparación de monooleato de isomanida puro de estructura:



20

con una rotación óptica específica  $[\alpha]_D^{25} + 66,7^\circ$  (c= 1,0 en CHCl<sub>3</sub>); índice de refracción  $n_D^{22} 1,4780$ ; equivalente de saponificación, 99,7 % del teórico; punto de ebullición, 220°C/0,200 mm Hg; destilación molecular, 105-111°C/ < 1 micras Hg; espectro de masas, m/e = 410; espectro RMN en d<sub>6</sub>-dimetilsulfóxido: δ 0,9-2,2, multiplete, 31H; δ 3,1-5,05, multiplete, 9H; δ 5,3, triplete, 2H; espectro infrarrojo:

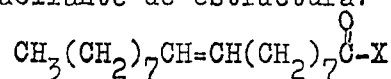
25

407949



1 intensa absorción a 2920, 2850, 1740  $\text{cm}^{-1}$ , adsorción  
media a 3444, 3000, 1470, 1240, 1170, 1120, 1080, 1060  
y 1020  $\text{cm}^{-1}$  y adsorción débil a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , cuyo proce-

5 agente acilante de estructura:



donde X es hidroxilo, halógeno, alcoxi inferior o ariloxi  
de un solo núcleo, en un disolvente caliente, enfriamien-  
to, eliminación del exceso de isomanida y del disolvente  
10 y destilación del producto.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1,  
donde X es hidroxilo y la reacción se lleva a cabo en presen-  
cia de un catalizador ácido.

15 3. Un procedimiento según la reivindicación 1,  
donde X es halógeno.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-  
de X es alcoxi inferior y la reacción se lleva a cabo en  
presencia de un catalizador ácido o básico.

20 5. Un procedimiento según la reivindicación 1,  
para la preparación de monooleato de isomanida puro que  
comprende el tratamiento de alrededor de tres equivalentes  
molares de isomanida, en tolueno caliente, con un equivalen-  
te molar de cloruro de oleilo, enfriamiento, eliminación  
del exceso de isomanida y del disolvente y destilación del  
25 producto a 105-111°C a una presión inferior a 1 micra.

407949



1

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MONOOLEATO DE ISO  
MANIDA PURO.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de diecisiete páginas mecanografiadas.

Madrid, 25 Octubre 1.972

BERNARDO UNGRIA

P.P.

10

15

20

25