



ESPAÑA

19 ES

21

21

23

NUMERO

480.565

FECHA DE PRESENTACION

14-5-79

10 A1

PATENTE DE INVENCION

Concedida el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
906.260	15-5-78	ESTADOS UNIDOS.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D211/14; A61K31/435	

64 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE 1,2 y 1,3 (di-O-n-alquil) GLICERILO.

71 SOLICITANTE (S)
PFIZER INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
235 East 42nd Street, NEW YORK, New York, ESTADOS UNIDOS.

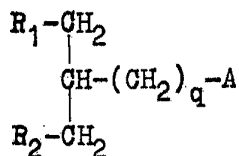
72 INVENTOR (ES)
ALLEN RICHARD KRASKA, de nacionalidad estadounidense.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

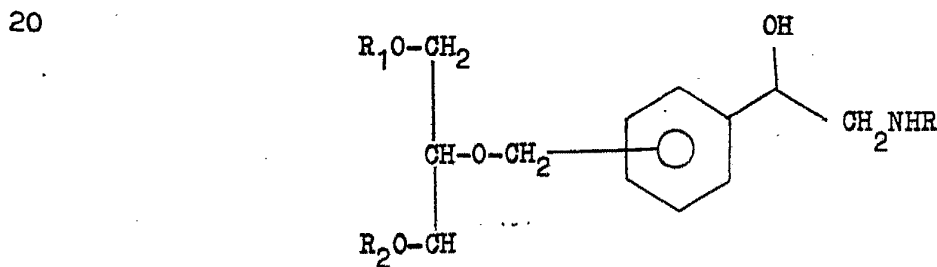
1 o (alquil inferior)amino. Sin embargo, ninguno de los com-
 puestos específicamente enumerados en la descripción de la
 citada patente contiene un grupo R₁ ó R₂ alquilo mayor de
 n-pentilo. Además, en ninguno de estos compuestos R₁ y R₂ son
 5 ambos alquilo y X e Y son ambos oxígeno.

Los compuestos insecticidas y acaricidas de fórmula



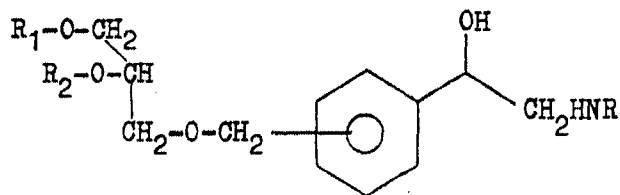
10 donde R₁ y R₂ pueden ser, entre otros, alquiltio inferior;
 q es 0 a 5 y A puede ser, entre otros, 1-piperidino o di-
 (alquil inferior)amino, están descritos en la patente ja-
 ponesa J7-6042-177.

15 En la solicitud de patente estadounidense copendiente
 número de serie 825.535, presentada el 18 de Agosto de 1977
 por los mismos solicitantes, se describen, entre otros, com-
 puestos de fórmulas:



25

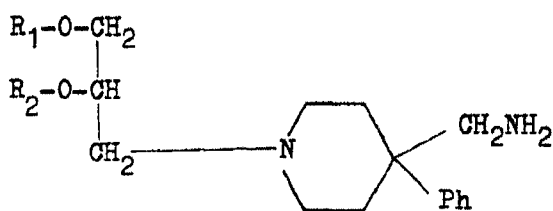
1



5

y

10

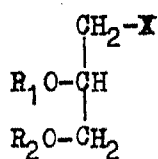


15

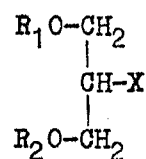
donde R es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y R₁ y R₂ son cada uno de ellos n-alquilo de 12 a 20 átomos de carbono. Se indica que estos compuestos son útiles como agentes antivíricos.

Esta invención se refiere a nuevos compuestos seleccionados entre los de fórmulas:

20



y



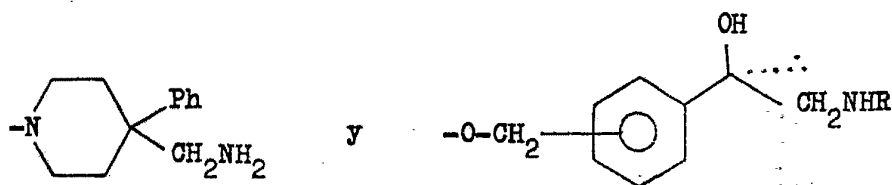
I

II

25

donde R₁ y R₂ son cada uno de ellos n-alquilo de 8 a 11 átomos de carbono y X está seleccionado entre

1



5

donde R es hidrógeno o alquile de 1 a 6 átomos de carbono, y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables.

10

Un grupo de compuestos de interés es aquél donde X es 4-aminometil-4-fenilpiperidino. Entre estos, los compuestos preferidos son aquéllos donde R₁ y R₂ tienen el mismo número de átomos de carbono, especialmente aquéllos donde R₁ y R₂ son ambos n-decilo. Los compuestos más preferidos de este grupo son los de fórmula I.

15

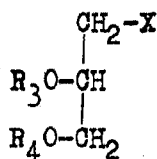
También son de interés los compuestos donde X es (1-hidroxí-2-alquilaminoetil)benciloxi. Son especialmente preferidos los compuestos donde R₁ y R₂ tienen el mismo número de átomos de carbono, especialmente aquellos donde R₁ y R₂ son ambos n-decilo. El grupo R es preferiblemente n-alquile inferior de 1 a 3 átomos de carbono, especialmente etilo. Los más preferidos son los compuestos de fórmula I.

20

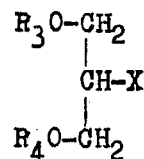
Esta invención también comprende las composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva inmunoestimulante de un compuesto de fórmulas I y II junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

1 Otra característica de esta invención es un método de
 estimulación de la inmunidad no específica mediada celular-
 mente en animales de sangre caliente, que consiste en admi-
 nistrar a dicho animal una cantidad efectiva inmunostimulan-
 5 te de un compuesto seleccionado entre los de fórmulas



y

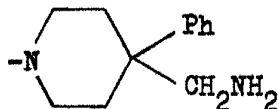


10

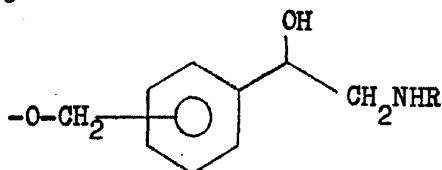
III

IV

donde R₃ y R₄ son ambos n-alquilo de 8 a 20 átomos de car-
 bono y X está seleccionado entre



y



15

20

donde R es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,
 y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente acepta-
 bles. Es especialmente preferido un método donde el grupo X
 en el compuesto administrado es 4-aminometil-4-fenilpiperi-
 dino, especialmente aquéllos donde R₁ y R₂ tienen el mismo
 número de átomos de carbono, en particular n-decilo y tola-
 vía mejor donde los compuestos son de fórmula III.

25

Los nuevos compuestos de esta invención son derivados
 de 1,2-(di-O-n-alquil)gliceroles o de 1,3-(di-O-n-alquil)-

1 gliceroles y se preparan fácilmente a partir de estos com-
puestos por métodos conocidos por los expertos en este cam-
po. El 1,2-(di-O-n-alkil)glicerol de partida puede ser pre-
parado en la forma descrita por Kates y colaboradores, Bio-
5 chemistry, 2, 394 (1963). Los 1,3-(di-O-n-alkil)gliceroles
de partida pueden prepararse por el método de Damico y cola-
boradores, J. Lipid Res., 8, 63 (1967).

Los compuestos de esta invención donde el grupo X es
4-aminometil-4-fenil-piperidino pueden ser preparados a par-
10 tir de estos 1,2- y 1,3-(di-O-n-alkil)gliceroles, por ejem-
plo formando primero el derivado tosílico del material de
partida por reacción con cloruro de p-toluensulfonilo y pi-
ridina en un disolvente inerte a la reacción, como cloruro
de metileno, a una temperatura de aproximadamente -10°C a
15 40°C, preferiblemente alrededor de 10 a 25°C. Después el de-
rivado tosílico se hace reaccionar con 4-ciano-4-fenil-pipe-
ridina calentando la mezcla de las sustancias reaccionantes
a unos 75-250°C. Esto se hace preferiblemente sin adición
de disolvente pero, si se desea, puede emplearse un disol-
20 vente inerte a la reacción como la dimetilformamida. El ni-
trilo resultante se reduce después a la amina deseada, por
ejemplo empleando níquel Raney e hidrógeno.

Los compuestos de esta invención donde el grupo X es
25 (1-hidroxi-2-alkilaminoetil)benciloxi pueden ser prepara-
dos por reacción de un 1,2- ó 1,3-(di-O-n-alkil)glicerol

1 de partida para formar un derivado cianobencílico. Esto puede
de hacerse por reacción con un haluro de cianobencilo apropiado,
como bromuro de cianobencilo, en presencia de un hidru-
rulo metálico alcalino, por ejemplo hidruro sódico, en un
5 disolvente inerte a la reacción, generalmente un éter como
tetrahidrofurano, en atmósfera de nitrógeno y a una tempera-
tura comprendida aproximadamente entre 20° y 65°C. El deriva-
do cianobencílico se reduce al correspondiente derivado for-
milbencílico con un hidruro de alquilaluminio, como hidruro
10 de diisobutilaluminio, en benceno y en atmósfera de nitróge-
no, a unos 15-35°C. El formilbencil-derivado resultante se
convierte después en el 1,2-epoxietilbencil-derivado por
reacción con un hidruro metálico alcalino suspendido en dime-
tilsulfóxido, en presencia de yoduro de trimetilsulfonio, a
15 una temperatura de -5° a 10°C aproximadamente. Cuando el gru-
po es alquilo, el producto deseado se forma por reacción del
1,2-epoxietilbencil-derivado con una amina RNH₂, a una tempe-
ratura de unos 75 a 135°C. Cuando R es hidrógeno, el epóxido
se abre por reacción con azida sódica en dioxano a la tempe-
20 ratura de reflujo, seguido de reducción a la amina deseada
por contacto con un agente reductor como hidruro de litio y
aluminio o hidruro de sodio y aluminio, en éter, a una tem-
peratura de 20 a 35°C aproximadamente.

25 Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente acep-
tables de las aminas formadas como se ha descrito pueden ser

1 preparadas por métodos convencionales, por ejemplo mezclando
la amina apropiada y el ácido en un disolvente inerte y recu
perando la sal por evaporación del disolvente o por precipi-
tación. Los hidrocioruros se preparan fácilmente haciendo pa
5 sar cloruro de hidrógeno gaseoso a través de una solución de
la amina en un disolvente inerte. Los hidrocioruros y dihidro
cloruros obtenidos por este medio suelen contener algo de
agua de cristalización o de agua ocluída. Este no constituye
un inconveniente en la presente invención y estos compuestos
10 pueden ser formulados y administrados sin deshidratarlos. La
memoria y las reivindicaciones incluyen las formas hidratadas
y anhidras. Las sales de ácidos farmacéuticamente aceptables
adecuados son las sales solubles en agua e insolubles en agua
como hidrociorure, hidrobromure, fosfato, nitrato, sulfato,
15 acetato, hexafluorfosfato, citrato, gluconato, benzoato, pro-
pionato, butirato, sulfosalicilato, maleato, laurato, malato,
fumarato, succinato, oxalato, tartrato, amsonato (4,4'-diami
no-estilbina-2,2'-disulfonato), pamoato (1,1'-metilen-bis-2-
hidroxi-3-naftoato), estearato, 3-hidroxi-2-naftoato, p-toluen
20 sulfonato, metanosulfonato, lactato y sales de suramin.

Los compuestos representados por las fórmulas III y IV,
es decir, los nuevos compuestos de esta invención de fórmulas
I y II y sus homólogos éteres alquílicos superiores, descri-
tos en la solicitud de patente estadounidense copendiente nú-
25 mero de serie 825.535, presentada el 18 de Agosto de 1977, han

1 resultado útiles como agentes para la estimulación no específica de la inmunidad mediada celularmente en los animales de sangre caliente y, en especial, son útiles en la estimulación del sistema retículo-endotelial. Los compuestos antes descritos pueden ser administrados a un animal de sangre caliente por diversas vías convencionales, especialmente por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo adecuadas unas dosis de aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto en tratamiento cuando la administración se realiza por estos métodos. Sin embargo, el médico determinará la dosis particular más adecuada para cada paciente individual, que dependerá del sujeto en tratamiento y del compuesto particular empleado. En general, inicialmente se administrarán dosis pequeñas que pueden ser aumentadas gradualmente para determinar la dosis óptima para el paciente determinado. La competencia inmune del paciente generalmente será controlada después de la administración, utilizando las técnicas convencionales empleadas en este campo, por ejemplo los ensayos de activación de monocitos y de activación de macrófagos descritos más adelante. Típicamente, se observará una activación máxima alrededor de 24 a 48 horas después de la administración inicial y, si no se administran nuevas dosis, esta activación disminuirá hasta el nivel inicial en el transcurso del siguiente periodo de 24 a 48 horas. Así, la administración de una segunda dosis aproximadamente 24 a 72 horas después de la administración

1 inicial mantendrá el nivel deseado de competencia inmune. En
general, se administrarán de 2 a 4 dosis de esta manera y se
determinará la respuesta del paciente al tratamiento. Después
pueden ser administradas otras dosis si es necesario, como se
5 ha indicado antes.

Los compuestos pueden utilizarse en preparados farma-
céuticos que contienen el compuesto o una sal farmacéuticamen-
te aceptable del mismo en combinación con un vehículo o dilu-
yente farmacéuticamente aceptable. Un tipo especialmente pre-
ferido de vehículo farmacéutico para este fin es una grasa
10 estéril o una emulsión de lípidos. Este último tipo de vehí-
culo ha resultado especialmente eficaz para la administración
parenteral e intravenosa, aumentando el índice terapéutico
hasta un valor de 15 a 25 aproximadamente, mientras que en las
15 formulaciones con Tween 80-glicerol-agua se observa unos ín-
dices terapéuticos iguales a 3 aproximadamente en ensayos pre-
liminares con ratones y ratas con los éteres alquílicos infe-
riores de esta invención, por ejemplo con la 4-aminometil-
1-[2,3-di-n-(octiloxi)-n-propil]-4-fenilpiperidina. Estas ven-
20 tajas han sido también citadas para otros compuestos utiliza-
dos con estos vehículos en emulsión grasa: véase, por ejem-
plo, Fortner y colaboradores, American Journal of Hospital
Pharmacy, 32, 502 (1975) y Jeppssen y colaboradores, Primera
Conferencia Internacional sobre Tecnología Farmacéutica, Fa-
25 cultad de Farmacia, Paris-Sur, Junio 1977. Un ejemplo de un

1 vehículo especialmente adecuado es el Intralipid (Cutter La-
boratories, Berkely, California), una emulsión de grasa al
10 % a base de aceite de soja. Sin embargo, otros vehículos
similares serían adecuados y pueden ser preparados fácilmen-
5 te por los expertos en este campo.

 Los compuestos de fórmulas III y IV también son útiles
como coadyuvantes de vacunas y pueden ser utilizados para
los mismos fines y administrados por los mismos métodos que
los coadyuvantes actualmente conocidos; véase, por ejemplo,
10 "Immunological Adjuvants", World Health Organization Techni-
cal Report Series, nº 595. Por ejemplo, los compuestos de es-
ta invención son útiles con vacunas como las de la gripe,
glosopeda y difteria, aunque sin limitarse solo a éstas. El
compuesto puede ser incorporado a la dosis de vacuna en una
15 proporción de 1 a 20 mg por dosis de vacuna, preferiblemente
en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una
emulsión de grasa o lípido o glicerol. La dosis de vacuna-
coadyuvante se administra después al sujeto de forma conven-
cional para la vacuna determinada, generalmente como dosis
20 única administrada subcutánea o intramuscularmente. Alternativa-
mente, el coadyuvante puede ser administrado independien-
temente de la vacuna y bien simultáneamente o, preferiblemen-
te, alrededor de 8 a 24 horas antes de la administración de
la vacuna.

25 La actividad inmunoestimulante y antitumoral de los

1 compuestos aquí descritos puede ser determinada por ensayos
farmacológicos. Entre los ensayos adecuados se encuentran
los utilizados para la determinación de la activación peri-
toneal de macrófagos, determinación de rechazo del tumor (me-
5 delo sarcoma 180J), determinación de la hipersensibilidad cu-
tánea retardada y determinación de la activación periférica
de monocitos. Estos ensayos están descritos e ilustrados con
más detalle más adelante, junto con los resultados obtenidos
para los compuestos de esta invención. También se describen
10 los ensayos adecuados para la evaluación de la actividad
coadyuvante de vacunas.

Esta invención es ilustrada mediante los siguientes
ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la invención no
se limita a los detalles específicos de estos ejemplos. To-
15 das las temperaturas se dan en grados centígrados.

EJEMPLO 1

4-Ciano-1-[2,3-(di-n-deciloxi)-n-propil]-4-fenil-piperidina

Se combinan y calientan a 180°C, durante 20 minutos,
20 g (0,0189 moles) de 1,2-di-O-(n-decil)-3-O-(p-tosil)gli-
20 cerol, preparado a partir de cloruro de 1,2-di-O-(n-decil)-
glicerol, y 4,5 g (0,024 moles) de 4-ciano-4-fenilpiperidi-
na. Se añaden 50 ml de agua y 100 ml de éter al producto en
friado. La capa etérea se aísla y se lava dos veces con
100 ml cada vez de una solución saturada de bicarbonato só-
25 dico, una vez con 100 ml de ácido clorhídrico 1 N, dos veces

1 con 100 ml de agua, una vez con 100 ml de solución saturada
de bicarbonato sódico y una vez con 100 ml de agua. Después
la solución etérea se seca sobre sulfato magnésico, se tra-
ta con carbón activo, se filtra y se concentra a un aceite
5 (10 g). El aceite se absorbe en gel de sílice que después se
lava tres veces con 200 ml de hexano, tres veces con 200 ml
de tolueno, tres veces con 200 ml de cloroformo y tres veces
con 200 ml de acetato de etile. El acetato de etile se con-
centra para dar el compuesto ciano puro: aceite; IR (neto)
10 2220 cm^{-1} .

EJEMPLO 2

4-Aminometil-1-[2,3-(di-n-deciloxi)-n-propil]-4-fenil-pipe- ridina

15 Se disuelven 1,2 g (0,0022 moles) del nitrilo formado
en el Ejemplo 1 en 50 ml de etanol y después la solución se
satura de amoníaco gaseoso. Se realiza después la hidrogena-
ción de esta mezcla a una presión de 50 psi (3,5 kg/cm^2) du-
rante 3 horas, empleando 0,7 g de níquel Raney como cataliza-
dor. Cuando la reducción es completa, se filtra la mezcla y
20 el filtrado se concentra a presión reducida hasta dar un
aceite (1,1 g). Este último se cromatografía en gel de síli-
ce y se eluye con benceno/etanol, se convierte en el hidro-
cloruro y se recristaliza en acetato de etile para dar 0,32 g
25 (rendimiento: 24 %) del hidrocloreuro puro, p.f. 138-140°C.

1 Análisis para $C_{35}H_{64}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot 3/4 H_2O$:
 Calculado : C, 66,59; H, 10,78; N, 4,44
 Encontrado: C, 66,46; H, 10,56; N, 4,43.

EJEMPLO 3

5 4-Ciano-1-[2,3-(di-n-hexadeciloxi)-n-propil]-4-fenil-piperidina

 Se prepara 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-O-(p-tosil)glicerol por reacción de 1,2-di-O-(n-hexadecil)glicerol con cloruro de p-toluensulfonilo. La purificación se realiza por re-
10 cristalización en acetato de etilo (p.f. 53-55°C, IR ($CHCl_3$) 1360 y 1180 cm^{-1}).

 Una mezcla de 6,96 g (10 milimoles) de 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-O-(p-tosil)glicerol, 2,23 g (10 milimoles) de hidrocloreuro de 4-ciano-4-fenilpiperidina, 2 ml de trietilamina y 40 ml de N,N-dimetilformamida se agita durante 16 horas
15 a 95-100°C. Después la mezcla de reacción se enfría, se diluye con 200 ml de agua y se extrae tres veces con 150 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados de acetato de etilo se secan sobre sulfato magnésico, se filtran y evaporan a
20 vacío hasta formar un aceite (6 g), que se purifica por cromatografía en columna (eluyendo con benceno/acetato de etilo) (aceite, IR ($CHCl_3$) 2220 cm^{-1}).

25

EJEMPLO 4

Dihidrocloruro de 4-aminometil-1-[2,3-(di-n-hexadecil-
oxi)-n-propil]-4-fenilpiperidina

Una solución de 2,5 g (3,6 milimoles) de 4-ciano-1-[2,3-
(di-n-hexadeciloxi)-n-propil]-4-fenilpiperidina en 100 ml de
éter se trata con 0,4 g (10,5 milimoles) de hidruro de litio
y aluminio y la mezcla resultante se agita durante 4 horas
a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trata
con precaución con 100 ml de agua y se extrae tres veces con
100 ml de éter. Los extractos etéreos combinados se secan so-
bre sulfato magnésico, se filtran y evaporan a vacío para dar
un aceite que se purifica por cromatografía en gel de sílice
(elución con benceno/etanol) y después se disuelve en cloro-
formo. La solución se trata con cloruro de hidrógeno gaseoso
y después se evapora a vacío para dar un sólido que se recris-
taliza en acetato de etile para obtener 1,1 g de un sólido
que contiene alrededor de 3/4 moles de H₂O por mol del pro-
ducto citado (rendimiento: 40 %), p.f. 132-134°C.

Análisis elemental:

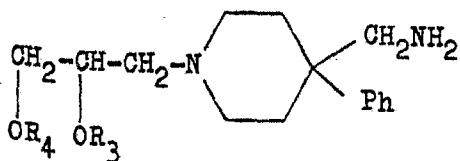
Calculado : C, 70,60; H, 11,53; N, 3,50

Encontrado: C, 70,74; H, 11,34; N, 3,40.

EJEMPLO 5

Siguiendo el procedimiento de los Ejemplos 1 a 4, se pre-
paran los siguientes compuestos:

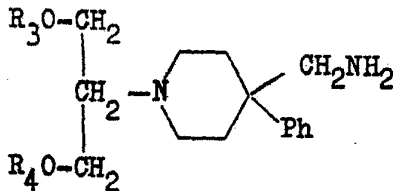
1



5

R_3, R_4	p.f. °C	Fórmula molecular	Calculado %	Encontrado %
$C_{16}H_{33}$	40-42	$C_{47}H_{88}O_2N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$	C 73,53 H 11,94 N 3,64	C 73,77 H 11,77 N 3,85
$C_{18}H_{37}$	115-117	$C_{51}H_{96}O_2N_2 \cdot 2HCl$	C 71,95 H 11,60 N 3,29	C 71,67 H 11,19 N 3,38
$C_{14}H_{29}$	140-142	$C_{43}H_{80}O_2N_2 \cdot 2HCl$	C 69,46 H 11,25 N 3,75	C 69,45 H 11,00 N 3,45
C_8H_{17}	176-178(d)	$C_{31}H_{56}O_2N_2 \cdot 2HCl \cdot \frac{1}{2}H_2O$	C 65,24 H 10,42 N 4,90	C 65,27 H 9,90 N 4,95

15



20

R_3, R_4	p.f. °C	Fórmula molecular	Calculado %	Encontrado %
$C_{10}H_{21}$	190-192	$C_{35}H_{64}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot \frac{3}{4}H_2O$	C 66,58 H 10,78 N 4,43	C, 66,70 H 10,20 N 4,27

25

De forma similar, pueden prepararse otros compuestos de esta invención a partir de los 1,2- ó 1,3-(di-n-O-alkil)gliceroles apropiados, a través del tosil-derivado.

1

EJEMPLO 6

1,2-Di-O-(n-hexadecil)-3-O-(3-cianobencil)glicerol

Se agregan 1,056 g de una dispersión de hidruro sódico al 50 % en aceite mineral (0,022 moles) a una solución de
5 1,2-di-O-n-hexadecil-glicerol en 150 ml de tetrahidrofurano y se agita durante 20 minutos bajo nitrógeno. Se agregan a la mezcla 4,0 g (0,020 moles) de bromuro de m-cianobencilo y se deja reaccionar a la temperatura ambiente durante la noche. Después se agregan con precaución 200 ml de agua y la
10 mezcla acuosa se extrae tres veces con 150 ml de acetato de etilo. Los extractos se secan sobre sulfato magnésico, se filtran y concentran a presión reducida para dar 12 g de un aceite que se cromatografía en gel de sílice (elución con benceno/hexano 8:2), obteniéndose 8,0 g de 1,2-di-O-(n-hexa-
15 decil)-3-O-(3-cianobencil)glicerol puro: aceite, IR (CHCl_3) 2230 cm^{-1} .

EJEMPLO 7

1,2-Di-O-(n-hexadecil)-3-O-(3-formilbencil)glicerol

Se hacen reaccionar 5,0 g (7,6 milimoles) de 1,2-di-O-
20 (n-hexadecil)-3-O-(3-cianobencil)glicerol con 1,17 g (8,2 milimoles) de hidruro de di-isobutilaluminio en 25 ml de benceno, en atmósfera de nitrógeno y a la temperatura ambiente, durante 16 horas. La mezcla de reacción se trata con 4,22 ml de metanol y 2,5 ml de agua y se agita durante 30 minutos
25 hasta que se ha descompuesto el hidruro que no haya reaccio-

1 nade. Se filtra la mezcla, se extrae tres veces con 25 ml de
benceno y los extractos bencénicos combinados se secan con
sulfato sódico, se filtran y se concentran a presión reduci-
da. El aceite resultante se purifica por cromatografía en
5 gel de sílice, y se eluye con benceno para dar 1,2-di-O-(n-
hexadecil)-3-O-(3-formilbencil)glicerol puro (rendimiento:
40 %): aceite, IR (CHCl₃) 1700 cm⁻¹; RMN (CDCl₃) δ 10,1
(s, 1, ArCHO).

EJEMPLO 8

10 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-O-[3-(1,2-epoxietil)bencil] glicerol

Se suspenden 3,23 g de una dispersión de hidruro sódico
al 57 % en aceite mineral (0,067 moles) en 117 ml de dimetil-
sulfóxido y se calienta a 70-75°C en atmósfera de nitrógeno
durante unos 45 minutos, hasta que cesa el desprendimiento
15 de hidrógeno. Se agregan 88 ml de tetrahidrofurano y la mez-
cla se enfría a 0-5°C. Se añaden poco a poco 13,67 g (0,067
moles) de yoduro de trimetilsulfonio, seguido de la rápida
adición de 7,0 g (0,0106 moles) de 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-
O-(3-formilbencil)glicerol en 58 ml de tetrahidrofurano. La
20 mezcla se agita después a la temperatura ambiente durante
16 horas, se vierte en 200 ml de agua y se extrae tres ve-
ces con 180 ml de éter. Los extractos etéreos combinados se
lavan dos veces con 100 ml de agua y una vez con 100 ml de
una solución saturada de cloruro sódico, se secan sobre sul-
25 fato magnésico, se filtran y concentran a presión reducida

1 para dar 7,0 g (rendimiento: 98 %) de un aceite amarillo pá-
lido que resulta por cromatografía en capa fina suficiente-
mente puro para la posterior reacción, descrita en el Ejem-
ple 9.

5

EJEMPLO 9

Hidrocloreuro de 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-O-[3-(1-hidroxi-2- ter-bútilaminoetil)bencil] glicerol

En una bomba de acero se introducen 30 ml de ter-butil-
amina y 2,0 g (2,97 milimoles) de 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-
10 O-[3-(1,2-epoxietil)bencil] glicerol y se calienta a 100°C du-
rante 9 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción, se
separa la ter-butilamina a presión reducida y el aceite re-
sultante se purifica por cromatografía en gel de sílice, elu-
yendo con benceno/etanol. Las fracciones deseadas se saturan
15 de ácido clorhídrico gaseoso, se concentran a presión reduci-
da y se recristalizan en acetato de etilo para dar 630 mg
(27 %) de 1,2-di-O-(n-hexadecil)-3-O-[3-(1-hidroxi-2-ter-
butilaminoetil)bencil] glicerol: p.f. 49-51°C; RMN (CDCl₃) δ
1,47[s, 9, -C(CH₃)₃].

20

EJEMPLO 10

Hidrocloreuro de 1,3-di-O-(n-decil)-2-O-[3-(1-hidroxi-2-etil- aminoetil)bencil] glicerol

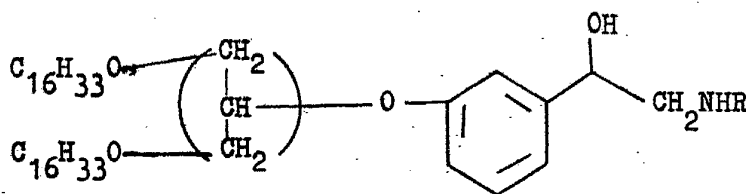
En una bomba de acero se introducen 30 ml de etilamina
y 2,018 g (4,13 milimoles) de 1,3-di-O-(n-decil)-2-O-[3-(1,2-
25 epoxietil)bencil] glicerol y se calienta a 80-90°C durante

1 16 horas a 140 psi (9,8 kg/cm²). Después de enfriar, la mez-
 5 cia de reacción se saca de la bomba lavando con éter y el pro-
 ducto se aísla separando el disolvente y el exceso de etil-
 amina a presión reducida. Después el aceite resultante (2,4 g)
 5 se disuelve en éter, se lava con solución acuosa de hidróxido
 amónico al 2 %, agua y solución acuosa saturada de cloruro só-
 dico, se seca y se concentra para obtener un aceite amarillo
 (1,8 g). El producto se purifica por cromatografía en gel de
 sílice (eluyendo con tolueno/etanol 2:1) y se convierte en
 10 el hidrocloreuro (0,794 g, 33 %): p.f. 55-57°C; RMN (CDCl₃)
 0,87 (s, 6H, -CH₃), 1,3 (s, 32H, protones alifáticos), 1,45
 (t, J = 7 Hz, 3H, -NHCH₃), 3,15 (q, J = 7 Hz, 2H, -NHCH₂CH₃),
 3,45-3,58 [m, 11H, (-CH₂OCH₂)₂CHOR, CHOHCH₂NH-], 4,65 (s,
 2H, Ar-CH₂O-), 5,17-5,50 (m, 1H, Ar-CHOH-) y 7,33 (s, 4H,
 15 Ar-H).

EJEMPLO 11

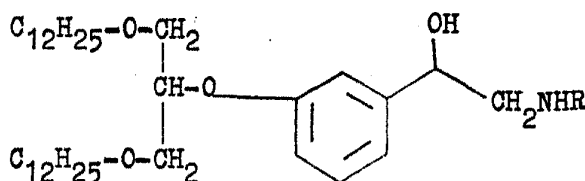
Siguiendo los métodos de los Ejemplos 6 a 10, se pre-
 paran los siguientes compuestos:

20



25

R	Posición de -OC ₁₆ H ₃₃	p.f. °C	Fórmula molecular
CH(CH ₃) ₂	2,3	53-55	C ₄₇ H ₈₉ O ₄ N.HCl.3/4H ₂ O Calculado: C, 72,17; H, 11,79; N, 1,79 Encontrado: C, 72,11; H, 11,55; N, 1,92
C(CH ₃) ₃	1,3	43-45	C ₄₈ H ₉₁ O ₄ N.HCl.H ₂ O Calculado: C, 71,99; H, 11,82; N, 1,75 Encontrado: C, 72,06; H, 11,43; N, 1,71



R	p.f. °C	Fórmula molecular
CH(CH ₃) ₂	aceite	C ₃₉ H ₇₃ O ₄ N.HCl.1/2H ₂ O Calculado: C, 70,39; H, 10,21; N, 2,10 Encontrado: C, 70,36; H, 10,77; N, 2,22
CH ₂ CH ₃	64-65	C ₃₈ H ₇₁ O ₄ N.HCl Calculado: C, 71,04; H, 11,14; N, 2,18 Encontrado: C, 71,04; H, 10,99; N, 2,08

De forma similar pueden prepararse otros compuestos de esta invención a partir de los epóxidos y aminas adecuados.

EJEMPLO 12

Modelo de sarcoma 180J para determinar el rechazo de tumores

Unos grupos de seis ratones hembras CD-1 (20-25 g) recibieron 106 células S-180J de 5 a 8 días de edad, por administración intraperitoneal. Al día siguiente de la inoculación del tumor, los ratones recibieron 0,1 ml del compuesto

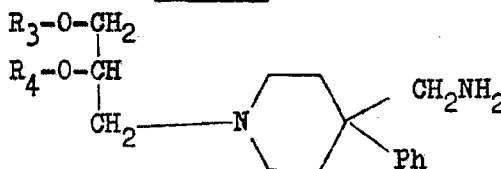
1 de ensayo formulado en el vehículo de emulsión grasa Intra-
 2 lipid (Gutter Laboratories) a la dosis deseada y después se
 3 observaron hasta la muerte o durante 40 días, según lo que
 4 ocurriera primero. Los resultados están expresados como por-
 5 centaje de aumento de la duración de vida (% ADV), definido a
 6 continuación:

$$\% \text{ ADV} = \frac{\text{Supervivencia media de los ratones trata-}}{\text{Supervivencia media de los ratones de con-}} \times 100$$

dos con la droga
 control no tratados

10 Los resultados obtenidos en el ensayo anterior fueron
 los siguientes:

TABLA I



15

<u>R₃, R₄</u>	<u>% ADV/dosis (mg/kg)</u>			
	<u>0,25</u>	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>16</u>
n-C ₈ H ₁₇	113	109	154 (1)	192 (4)
n-C ₁₀ H ₂₁	127	139 (1)	110	108
n-C ₁₄ H ₂₉	129 (1)	116	133	109
n-C ₁₆ H ₃₃	110	105	104	127
n-C ₁₈ H ₃₇	119	158 (2)	98	109

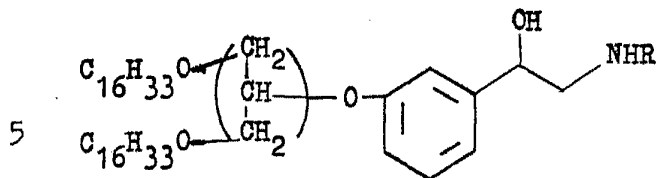
20

25

Los resultados del ensayo anterior obtenidos con los
 análogos (1-hidroxi-2-alkilamino-etil)enciloxi de esta in-
 vención, formulados en Tween 80-glicerol-agua, están indica-

1 dos en la Tabla II.

TABLA II



10

R	Posición del $-OC_{16}H_{33}$	% ADV/dosis (mg/kg)		
		5	15	50
$CH(CH_3)_2$	2,3	174(1)	135	147(1)
$C(CH_3)_3$	2,3	166(2)	181(4)	182(4)
$C(CH_3)_3$	1,3	159(1)	171(3)	157(2)

(Los números entre paréntesis en las Tablas I y II son el número de supervivientes al cabo de 40 días).

EJEMPLO 13

15 Determinación de la activación peritoneal de macrófagos

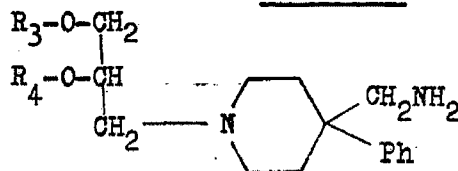
Unos ratones fueron inyectados intraperitonealmente con solución salina o con el compuesto de ensayo. Los macrófagos se recogieron 72 horas más tarde por inyección intraperitoneal de 3 ml de medio de suero de ternera fetal al 8 % - 92 % RPMI 1640 (Grand Island Biological Co., N.Y.) (1640₉₂ FCS₈) más 5 unidades/ml de heparina, manteniéndose la temperatura de todos los medios a 37°C; se mantuvo 1 a 2 minutos, se abrió y todo el líquido peritoneal se extrajo con una pipeta siliconizada estéril a un tubo de plástico de 50 ml mantenido en hielo. Se contaron los macrófagos utilizando un hemo-

20

25

1 citómetro y se ajustaron a una concentración de $1,5 \times 10^6$ /ml
 con 1640_{92} FCS₈. Después las células se colocaron en placas
 de múltiples pocillos, a razón de $1,5 \times 10^6$ células por po-
 5 cille y se incubaron durante 1 a 2 horas a 37°C en atmósfera
 al 5 % de dióxido de carbono. Se desprecó el líquido sobre-
 nadante y las células se lavaron una vez con el medio, adhi-
 riéndose los macrófagos al fondo de los pocillos. Después se
 agregaron células L 1210 (recogidas de ascites de ratones
 DBA aproximadamente 5 días después de la inoculación) en
 10 1640_{92} FCS₈, 1 ml de 1×10^5 células/ml a cada pocillo, y se
 incubó a 37°C durante 24 a 30 horas en atmósfera al 5 % de
 dióxido de carbono. Después las células se pulsaron con
 $^3\text{H-Tdr}$ (1,0 Ci/ml; Amersham/Searles) durante 6 horas a 37°C
 y el líquido sobrenadante se retiró utilizando un cosecha-
 15 dor de células: filtro Reeve-Angel y se lavó cinco veces con
 solución salina. Los discos del filtro se dejaron secar y se
 colocaron en viales de centelleo con un fluido de centelleo
 LSC (5,0 g PPO y 0,2 g POPOP/litro de tolueno; Yorktown Re-
 search). El recuento se realizó durante 2 minutos utilizando
 20 un contador Beckman LS-250. Los resultados obtenidos por este
 procedimiento fueron los siguientes:

TABLA III



	<u>R₃, R₄</u>	<u>Dosis (mg/kg)</u>	<u>% de inhibición de la síntesis de ADN</u>
1	n-C ₁₀ H ₂₁	1,25	76
	n-C ₁₀ H ₂₁	0,625	94
5	n-C ₁₀ H ₂₁	0,313	56
	n-C ₁₄ H ₂₉	25	90

EJEMPLO 14

Determinación de la activación de monocitos periféricos de la sangre

10 Unas ratas se inyectaron intravenosamente con el com-
 puesto a ensayar o con solución salina en el caso de los ani-
 males de control. Los monocitos se recogieron 72 horas más
 tarde pasando 2 ml de sangre a un tubo EDTA y diluyendo con
 2 ml de solución salina. Esta dilución se cubrió después cui-
 15 dadosamente con 3 ml de LSM (Medio de Separación de Linfoci-
 tos - Bionetics) y se centrifugó a 800 rpm durante 40 minu-
 tos a la temperatura ambiente. Se empleó una pipeta para re-
 coger la capa central turbia que contenía los monocitos y
 linfocitos. Estas células se lavaron dos veces con solución
 20 salina equilibrada de Hanks, se resuspendieron en 1640₉₂ FCS₈,
 se depositaron sobre placas de múltiples pocillos y se incu-
 baron a 37°C en dióxido de carbono al 5 % durante hora y me-
 dia. Después las células se lavaron fuertemente con el medio
 para separar las células no adheridas. De nuevo se agregó
 25 el medio a los monocitos restantes y se agregaron células

1 I 1210 en una relación Efactor:blanco de 15:1. Siguiendo el
procedimiento descrito en el Ejemplo 13, las células se pul-
saron con ³H-Tdr y se contaron con un contador de centelleo.

5 Utilizando este procedimiento, se observó que 1,25 mg/
kg de 4-aminometil-1-[2,3-di-n-deciloxi)-n-propil]-4-fenil-
piperidina producía una inhibición del 80 % en la síntesis
de ADN.

EJEMPLO 15

Ensayo de la capacidad coadyuvante de vacunas y de inhibición 10 de la Hemaglutinación

El virus de la gripe interacciona con los glóbulos ro-
jos de la sangre produciendo su aglutinación. Si en una mues-
tra de suero hay anticuerpos anti-virus, se evitan las in-
teracciones virus-glóbulos rojos que conducen a la aglutina-
15 ción. Así, la ausencia de aglutinación de los glóbulos rojos
de la sangre indica la presencia de anticuerpos anti-virus y
la determinación del título de hemaglutinación, como se des-
cribe más adelante, constituye una medida del nivel de anti-
cuerpos.

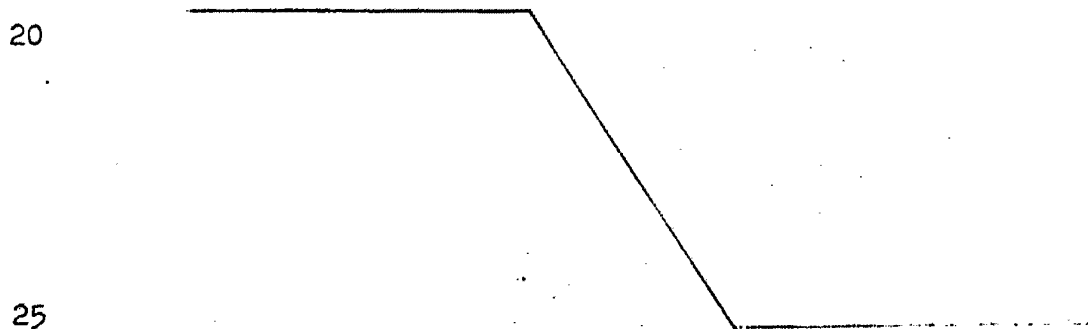
20 Los compuestos a ensayar al nivel de dosis deseado se
formulan disolviéndolos en 0,3 ml de etanol, seguido de la
adición de 0,1 ml de Tween 80 y la mezcla resultante se agre-
ga a 4,6 ml de Intralipid (Gutter Laboratories). También se
preparan los correspondientes vehículos sin el compuesto de
25 ensayo. Se mezcla el virus de la gripe Fluogen (Parke-Davis

1 and Co.) con cada vehícule para obtener 250 CCA de antígeno
per cada 0,5 ml de volumen de inyección. Un grupo de cobayas
hembra Hartley (Camm Laboratories) se inyecta intramuscular-
mente con 0,5 ml del vehícule que contiene el Fluogen y el
5 compuesto a ensayar. Un grupo de cobayas de control se inyec-
ta con el vehícule que contiene Fluogen pero ningún compuesto
a ensayar. Treinta días después de la sensibilización prima-
ria, los animales se atacan con una nueva inyección intramus-
cular del antígeno homólogo con el que han sido inmunizados
10 inicialmente. Los animales se sangran por punción intracar-
diaca varias veces después de la sensibilización primaria. Se
separa el suero utilizando un tubo separador de suere inte-
grado CORVAC (Corning Glass Werks) y se conserva a -20°C has-
ta que se valora por el ensayo de hemaglutinación, como sigue.

15 Los sueros a ensayar, tratados con yodato potásico
0,011 M para separar los factores sódicos no específicos que
inhiben la aglutinación, se dispensan en diluciones seriadas
al doble en volúmenes de 0,025 ml en pocillos de microvalora-
ción (Linbro Scientific Company, New Haven, Conn., tipo
20 IS-MRC-96) conteniendo 0,025 ml de solución salina fisiológi-
ca tamponada con fosfato 0,01 M (en adelante denominada PBS),
pH 7,2. La suspensión de virus a ensayar, que contiene cuatro
unidades de HA por 0,025 ml de PBS, se agrega a cada pocillo:
se incluyen controles de células (PBS solamente) y de anti-
25 gene (PBS y antígeno del virus). Después de incubar las pla-

1 cas a la temperatura ambiente durante 30 minutos, se agra-
gan a cada pocillo 0,05 ml de eritrocitos de pollo lavados
con solución salina al 0,5 % (Flow Laboratories, Rockville,
Md.). La incubación se prosigue hasta que el control de las
5 células indica que la sedimentación es normal. Se incluyen
sueros tratados con peryodatos de cobayas normales para de-
terminar el nivel de inhibición de aglutinación no específi-
ca residual en los sueros experimentales tratados con yoda-
te potásico. El título de inhibición de la hemaglutinación
10 se define como la máxima dilución de suero que inhibe comple-
tamente la hemaglutinación, corregida teniendo en cuenta la
inhibición no específica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de la 4-amino-
metil-1-[2,3-(di-n-deciloxi)-n-propil]-4-fenilpiperidina se
15 encuentran en la Tabla IV. El título de hemaglutinación más
alto observado después de volver a atacar a los animales a
los que se ha administrado el compuesto a ensayar indica la
actividad coadyuvante del compuesto.



1

TABLA IV

<u>Antígeno ad- ministrado.</u>	<u>Título de hemaglutinación</u>			
	<u>Día[*] 15</u>	<u>30^{**}</u>	<u>44</u>	<u>65</u>
	0	0	40	40
5	0	0	160	80
	0	0	40	10
Fluogen	10	0	80	10
	10	0	80	20
	10	0	160	160
10	10	10	80	1280
	10	10	640	2560
	10	40	640	1280
Fluogen y 4-aminometil 1-[2,3-(di-n-deciloxi)- n-propil]-4-fenilpiperi- dina (5 mg)	0	10	640	1280
15	0	20	640	160
	10	10	10	20
	0	10	40	10
	10	10	10	10
	10	0	10	10
20	0	0	-	-

* Días después de la sensibilización primaria.

** Atacado de nuevo 30 días después de la sensibilización primaria.

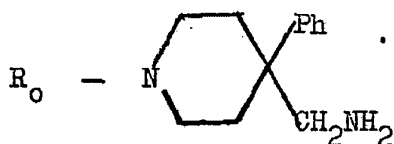
25. Los resultados anteriores son los observados para cada animal en los grupos respectivos.

REIVINDICACIONES

1

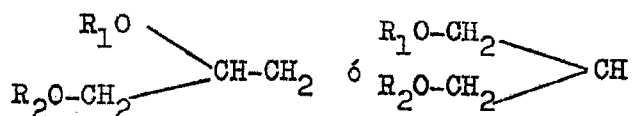
1a.- Un procedimiento para la preparación de nuevos derivados de 1,2 y 1,3-(di-O-n-alkil) glicerilo de fórmula:

5



donde R_o es un grupo de fórmula:

10

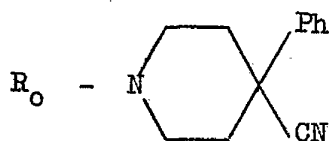


15

donde R_1 y R_2 son cada uno de ellos n-alkilo de 8 a 11 átomos de carbono y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables; cuyo procedimiento consiste en:

a) someter a reacción de reducción un compuesto de fórmula:

20



b) si se desea convertir el compuesto obtenido en una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables.

25

1

2ª.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el agente reductor es níquel Raney e hidrógeno.

3ª.- Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde R_1 y R_2 son ambos n-decilo.

5

4ª.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita por: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE 1,2 y 1,3 (di-O-n-alkil) GLICERILLO.

10

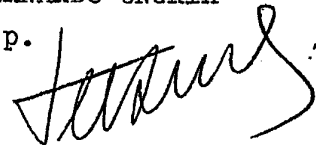
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de treinta y tres páginas mecanografiadas.

15

Madrid, 14 de mayo de 1.979

BERNARDO UNGRIA

p.p.



20

25