



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **149022 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **3214/78**

(51) Int.Cl.⁴: **C 07 C 93/02**
C 07 C 93/14

(22) Indleveringsdag: **18 jul 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **19 feb 1979**

(44) Fremlagt: **23 dec 1985**

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: **18 aug 1977 US 825535**

(71) Ansøger: ***PFIZER INC.; New York, US.**

(72) Opfinder: **Allen Richard *Kraska; US.**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af amin-
derivater af di-O-(n-alkyl- eller alkenyl)-gly-
ceroler eller farmaceutisk acceptable syre-
additionssalte deraf**

LN 149022 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte aminderivater af di-O-(n-højere alkyl- og alkenyl)-glyceroler eller deres farmaceutisk acceptable syreadditionssalte, hvilke forbindelser er nyttige til bekæmpelse af virale infektioner i pattedyr. Af særlig interesse er 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol og dens farmaceutisk acceptable syreadditionssalte.

Virusinfektioner, som angriber pattedyr, herunder mennesker, er normalt smitsomme sygdomme, som kan forårsage stor menneskelig lidelse og økonomisk tab. Uheldigvis er opdagelsen af antivirale forbindelser meget mere kompliceret og besværlig end opdagelsen af

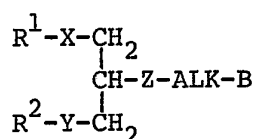
antibakterielle og antifungale midler. Dette skyldes delvis den tætte strukturelle lighed mellem vira og strukturen af visse essentielle cellulære forbindelser, såsom ribonucleinsyre og desoxyribonucleinsyre. Imidlertid er beskrevet adskillige ikke-virale "antivirale forbindelser", dvs. forbindelser "som kan danne enten en beskyttende eller terapeutisk virkning til en klar påviselig fordel for den virusangrebne vært, eller et materiale, som væsentligt kan forøge antistofdannelsen, forbedre antistofaktiviteten, forbedre ikke-specifik modstand, bevirke hurtigere helbredelse eller hæmme symptomer", [Herrman *et.al.*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 103, 625, (1960)]. Listen af angivne antivirale midler omfatter for at nævne et fåtal, interferon og syntetiske materialer, såsom amantadinhydrochlorid, pyrimidiner, biguanider, guanidin, pteridiner og methisazon. På grund af det temmelig snævre område af virale infektioner, der kan behandles med hver af de i handelen tilgængelige antivirale midler på nuværende tidspunkt, er nye syntetiske antivirale midler altid velkomne som potentiel værdifuld forøgelse af den medicinske teknologis hjælpestoffer.

Pattedyrs celler producerer som svar på virale infektioner et stof, der muliggør, at cellerne kan modstå formering af et antal vira. De virushæmmende eller virusinterfererende stoffer kaldes "interferoner". Interferonerne er glycoproteiner, der kan adskille sig i deres fysisk-kemiske egenskaber, men som alle udøver samme biologiske egenskaber, nemlig hæmning af et stort antal ikke-beslægtede vira, ikke har toksisk eller anden skadelig effekt på cellerne og er artsspecifikke (Lockart, *Frontiers of Biology*, Vol. 2, "Interferons", udgivet af Finter, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1966, side 19-20).

Ingen praktisk, økonomisk fremgangsmåde er endnu blevet udviklet til fremstilling af exogene interferoner til klinisk rutinebrug overfor virale infektioner. Et alternativ til fremstilling af interferoner har derfor været forsøgt, hvilket omfatter administrering tildet dyr, som skal beskyttes eller behandles, af et ikke-viralt stof, der stimulerer eller inducerer frembringelse af interferon i cellerne. Interferon fremstillet på denne måde betegnes "endogen" interferon.

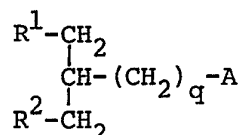
U.S. patentskrift nr. 2.738.351 beskriver, at forbindelser med den almene formel

3



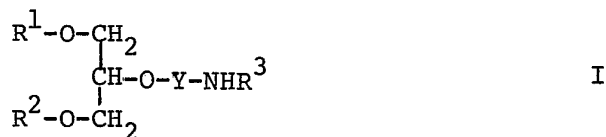
hvor R^1 og R^2 kan være alkyl, aralkyl, aryl, cycloalkyl, nitro-substitueret aryl, halogen-substitueret aryl, alkyl-substitueret aryl eller alkoxy-substitueret aryl, X, Y og Z kan være oxygen, svovl eller sulfonyl, ALK betyder en ligekædet eller forgrenet alkylengruppe med fra 1-6 carbonatomer, og B kan være di(lavere)-alkylamino, piperidino, morpholino, pyrrolidino, (lavere alkyl)-pyrrolidino, N'-alkylpiperazino eller pipecolino, er lokalt anæstetiske midler. Yderligere beskrives ved diskussionen af alternative syntetiske veje (se spalte 1, ll. 57-70 i nævnte patentskrift) mellemprodukter med den i det foregående nævnte formel, hvor B er amino- og (lavere alkyl)-aminogrupper. Imidlertid indeholder ingen af de i det nævnte patentskrift specielt angivne forbindelser en R^1 eller R^2 alkylgruppe, som er større end n-pentyl. Yderligere er der ingen forbindelser, hvor både R^1 og R^2 er alkylgrupper, og både X og Y er oxygenatomer.

Insecticide og miticide forbindelser med formelen

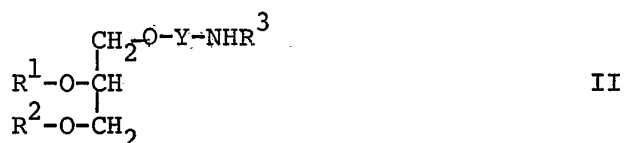


hvor R^1 og R^2 hver bl.a. kan være lavere alkylthiogruupper, q betyder 0-5, og A bl.a. kan være en 1-piperidino eller di(lavere alkyl)aminogruppe er beskrevet i japansk patentskrift nr. J7-6042-177.

Det har nu vist sig, at visse hidtil ukendte amin-derivater af di-O-(n-C₁₂₋₂₀ alkyl og-alkenyl)-glyceroler kan bekæmpe virale infektioner i pattedyr. De hidtil ukendte forbindelser fremstillet ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse har formlerne

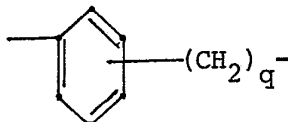


eller



hvor

R^1 og R^2 hver er udvalgt fra gruppen bestående af normale alkylgrupper med fra 12-20 carbonatomer og normale alkenylgrupper uden dobbeltbinding i 1-stillingen og med fra 12-20 carbonatomer, Y er udvalgt fra gruppen bestående af alkylengrupper med fra 2-4 carbonatomer, idet de to valenser findes ved forskellige carbonatomer, ortho-, meta- og para-phenylendimethylen, og



hvor q er et helt tal fra 1-3, og den venstre binding er forbundet med O, og

R^3 er et hydrogenatom eller en alkylgruppe med fra 2-4 carbonatomer, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf.

Forbindelserne med formelen I eller II udyser anti-viral virkning overfor en stor mængde vira in vivo i pattedyr og in vitro i cellekulturer fra pattedyr. I det mindste en væsentlig mængde af denne virkning resulterer fra de nævnte forbindelsers evne til at inducere interferonproduktion i cellerne, d.v.s. endogen interferon.

Med "farmaceutisk acceptable" syreadditionssalte menes de salte, som er ikke-toksiske ved de indgivne doser. De farmaceutisk acceptable syreadditionssalte, der kan anvendes, omfatter sådanne vandopløselige og vanduopløselige salte, såsom hydrochlorider, hydrobromider, fosfater, nitrater, sulfater, acetater, hexafluor-fosfater, citrater, gluconater, benzoater, propionater, butyrater, sulfosalicylater, maleater, laurater, malater, fumarater, succinater, oxalater, tartrater, amsonater (4,4'-diamino-stilben-2,2'-disulfonater), pamoater (1,1'-methylen-bis-2-hydroxy-3-naphthoater), stearater, 3-hydroxy-2-naphthoater, p-toluen-sulfonater, methansulfonater, lactater og suraminsalte.

En foretrukket gruppe af forbindelserne med formlerne I eller II består af hydrochloridsaltene af baserne med formlerne I eller II

En anden foretrukket gruppe af forbindelserne med formlerne I eller II består af de forbindelser, hvor R^1 og R^2 hver er normale alkylgrupper med fra 14-18 carbonatomer.

En anden foretrukket gruppe af forbindelserne med formlerne I eller II består af de forbindelser, hvor R^1 og R^2 hver er normale alkylgrupper med fra 14-18 carbonatomer og indeholder samme antal carbonatomer.

En anden foretrukken gruppe af forbindelser med formlerne I eller II består af de forbindelser, hvor R^1 og R^2 hver er n-hexadecyl-grupper.

En anden foretrukken gruppe af forbindelserne med formlerne I eller II består af forbindelser, hvor R^3 er et hydrogenatom.

En anden foretrukken gruppe af forbindelser med formlerne I eller II består af de forbindelser, hvor R^3 er et hydrogenatom, og Y er en ligekædet alkylengruppe med fra 2-4 carbonatomer.

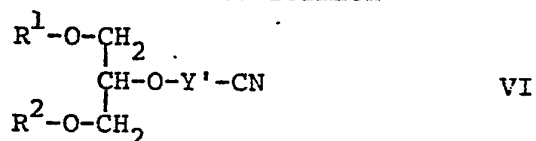
En anden foretrukken gruppe forbindelser med formlerne I eller II består af de forbindelser, hvor R^3 er et hydrogenatom, og Y er ortho-, meta- eller para-phenylendimethylen.

Særlig værdifulde er følgende forbindelser og deres farmaceutisk acceptable syreadditionssalte.

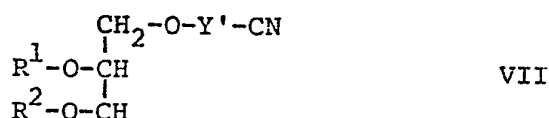
1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol,
 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-aminopropyl)-glycerol,
 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glycerol,
 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glycerol,
 1,2-di-O-(n-tetradecyl)-3-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glycerol,
 1,3-di-O-(n-hecadecyl)-2-O-(meta-aminomethylphenyl)-glycerol,
 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(para-aminomethylphenyl)-glycerol,
 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(para-aminomethylphenyl)-glycerol,

Forbindelserne med formlen I eller II i det foregående fremstilles ifølge opfindelsen ved, at man til opnåelse af en forbindelse med formlen I eller II, hvor R^3 er et hydrogenatom,

a) reducerer en forbindelse med formlen

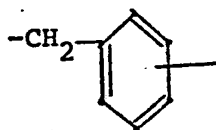


eller

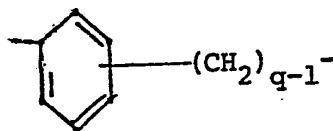


hvor Y' er udvalgt fra gruppen bestående af alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer,

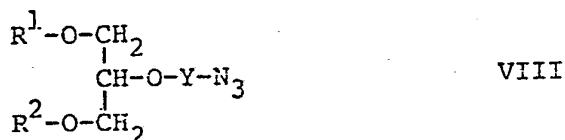
6



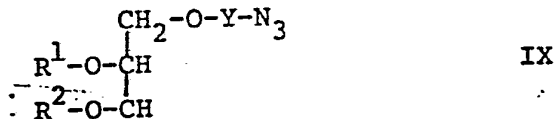
hvor den venstre binding er forbundet til O, og



hvor den venstre binding er forbundet til O, og q har ovennævnte betydning, og hvor R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning eller b) reducerer en forbindelse med formelen



eller



hvor Y, R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, hvorefter man om ønsket alkylerer den resulterende forbindelse med formelen I eller II, hvor R^3 er et hydrogenatom, og/eller om ønsket omdanner en dannet forbindelse med formelen I eller II til et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf.

Syreadditionssalte af baserne med formlerne I eller II kan fremstilles ved konventionelle fremgangsmåder, såsom ved blanding af aminforbindelsen i et passende opløsningsmiddel med den ønskede syre og udvinding af saltet ved fordampning eller udfældning efter tilsætning af et opløsningsmiddel, hvori saltet er uopløseligt. Hydrochloridsalte kan let fremstilles ved genindvinding af hydrogenchlorid gennem en opløsning af aminforbindelsen

i et organisk opløsningsmiddel. Som det kan ses af de følgende eksempler har mange af de isolerede hydrochlorid- eller dihydrochloridsalte af baserne med formlerne I eller II tendens til at indeholde en betydelig mængde vand. Det vides ikke, hvorvidt dette

observerede "fangne" vand er vilkårligt indesluttet under krystallisationen eller svarer til dannelse af virkelige molekulære hydrater eller stammer fra tilstedeværelsen af et andet fænomen. I hvert tilfælde kan saltene indeholdende "fanget" vand let præpareres og administreres uden forudgående dehydratisering.

Udgangsmaterialerne 1,2-di-O-(n-højere alkyl)-glyceroler kan fremstilles ved den af Kates, M. et al., Biochemistry, 2, 394 (1963) angivne metode. Udgangsmaterialerne 1,3-di-O-(n-højere alkyl)-glyceroler kan fremstilles ved den af Damico, R., et al. J. Lipid Res., 8, 63 (1967) angivne metode. Udgangsmaterialerne 1,2- og 1,3-di-O-(n-højere alkenyl)-glyceroler kan fremstilles ved den af Bauman, W.J. og Mangold, H. K., J. Org. Chem., 31, 498 (1966) angivne metode.

Den anti-virale virkning af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen blev bestemt ved anvendelse af to uafhængige fremgangsmåder. Ved den første blev prøveforbindelsen administreret til mus ad intraperitoneal vej 18 til 24 timer før indgift af en letal dosis af encephalomyocarditis (EMC) virus. Overlevelsedata er opført 10 dage efter indgift af virus og sammenlignet med data fra ubeskyttede dyr. Fremgangsmåden, ved hvilken medikamentet indgives 18 til 24 timer før og på et væsentligt adskilt sted fra virusinjektionen, er beregnet på at eliminere lokale effekter mellem medikament og virus og identificere udelukkende de forbindelser, som giver et systemisk anti-viralt svar.

Ved den anden fremgangsmåde behandles monolag af humane nasale polypceller, dyrket på mikrotiterplader med prøveforbindelsen ca. 18 timer før behandling med en letal dosis af vesikular stomatitis-virus (VSV). Prøveforbindelsen vaskes bort fra monolaget før virusbehandling. Kulturvæske ekstraheres fra pladerne efter en inkubationsperiode, titreres for mængden af infektiøs virus tilstedeværelse i mikrotiterplader af L-929 muse-fibroblaster. Sammenligning gøres med virusdata fra kulturvæske ekstraheret fra ubeskyttede polypceller.

Yderligere blev mange af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen afprøvet med hensyn til deres evne til at forøge den kendte anti-virale virkning af polyinosin:polycytidylinsyre. Endelig blev visse af forbindelserne afprøvet med hensyn til deres evne til at inducere cirkulerende interferon i mus efter parenteral administrering ved anvendelse af den af Hoffman, W.W., et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 3, 498-501 (1973) beskrevne fremgangsmåde.

Parenteral, topisk eller intranasal administrering af de i det foregående nævnte beskrevne aminer til pattedyr. Før udsættelse af pattedyret for en infectiøs virus giver hurtig modstand mod virusen. Fortrinsvis bør administreringen finde sted fra ca. 2 til ca. 1 dag før udsættelse for virus, men dette vil variere noget med den specielle dyreart og med den specielle infectiøse virus.

Ved indgift af de pågældende forbindelser anvendes de lettest og mest økonomisk i dispergeret form i en acceptabel bærer. Når det siges, at forbindelserne er dispergeret, betyder det, at partiklerne kan være af molekulær størrelse og holdes i sand opløsning i et passende opløsningsmiddel, eller at partiklerne kan være af colloidale størrelse og dispergeret i en væskefase i form af en suspension eller en emulsion. Betegnelsen "dispergeret" betyder også, at partiklerne kan være blandet med og spredt i en fast bærer, således at blandingen er i form af et pulver eller støv. Denne betegnelse omfatter også blandinger, der egner sig til anvendelse som sprøjtemidler, omfattende opløsninger, suspensioner eller emulsioner af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen.

Administreret parenteralt (subcutant, intramuskulært, intraperitonealt) anvendes forbindelserne i en mængde på fra ca. 1 mg/kg legemsvægt til ca. 200 mg/kg legemsvægt. Det foretrukne område er fra ca. 5 mg/kg til ca. 100 mg/kg legemsvægt, og det mest foretrukne område fra ca. 5 mg til ca. 50 mg/kg legemsvægt. Dosis afhænger naturligvis af det pattedyr, som skal behandles, og den specielle aminforbindelse, som er anvendt, og bestemmes af den person, som er ansvarlig for administreringen. Sædvanligvis administreres små doser i begyndelsen med gradvis forøgelse af dosis, indtil det optimale dosisniveau er bestemt for det specielle subjekt, som er under behandling.

Ved anvendelse af den intranasale administrationsvej kan anvendes en hvilken som helst praktisk fremgangsmåde til kontakt mellem det anti-virale middel og dyrets åndedrætsveje. Effektive fremgangsmåder omfatter administrering af midlet ved hjælp af intranasale eller nasopharyngeale dråber og ved inhalation ved hjælp af en nebulizer eller en aerosol. Sådanne administrationsfremgangsmåder er af praktisk betydning, fordi de tilvejebringer en let, sikker og effektiv metode. Til intranasal administrering af midlet, sædvanligvis i en

acceptabel bærer, er en koncentration af midlet mellem 1,0 mg/ml og 100 mg/ml tilfredsstillende. Koncentrationer i området på fra ca. 30 til 50 mg/ml muliggør administrering af passende volumen.

Til topisk anvendelse benyttes de anti-virale forbindelser mest passende i en bærer for at muliggøre let og sikker anvendelse og bedre absorption. Også her er koncentrationer i området fra ca. 1,0 mg/ml til ca. 250 mg/ml tilfredsstillende. Generelt vil man ved de to foregående metoder anvende en dosis i området fra ca. 1,0 mg/kg til ca. 250 mg/kg legemsvægt og fortrinsvis fra ca. 5,0 mg/kg til ca. 50 mg/kg.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af følgende eksempler.

Eksempel 1

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid.

A. 1,3-Di-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoethyl)-glycerol.

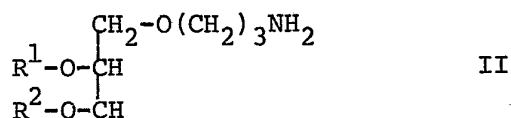
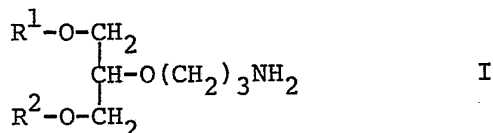
En blanding af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-glycerol (80 g, 148 mmol) acrylonitril (1,49 kg, 28,1 mol) og vandig 2N natriumhydroxid (1,2 l) blev opvarmet til 50°C. Tetrabutylammoniumhydroxid (19,2 g 40 vægtprocent vandig opløsning, 29,15 mmol) blev langsomt tilsat, hvorved temperaturen af den exotherme reaktionsblanding steg til ca 80 til 90°C. Reaktionsblandingen blev så omrørt i 20 min. uden ydre opvarmning, efterfulgt af afkøling til 20°C og tilsætning af vand (1,0 l). Et fast materiale, en blanding af ikke-reageret og cyanoethyleret 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-glycerol blev isoleret og behandlet igen med frisk acrylonitril (1,49 kg, 28,1 mol), vandig 2N natriumhydroxid (1,2 l) og tetrabutylammoniumhydroxid (19,2 g 40 vægt% vandig opløsning, 29,15 mmol) i 20 min. under omrøring ved 50°C, efterfulgt af afkøling og tilsætning af vand (1,0 l). Den resulterende 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoethyl)-glycerol i form af et fast stof blev filtreret, vasket med vand, derefter methanol og acetonitril og tørret [82 g, 93% udbytte, smp. 45-46°C, $\text{ir (CHCl}_3\text{)} 2250 \text{ cm}^{-1}$, $\text{nmr (CDCl}_3\text{)} \delta 3,92 \text{ (t, 2, NCCH}_2\text{CH}_2\text{O-)}, 3,33\text{--}3,67 \text{ (m, 9, -OCH[CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{]}_2\text{)}, 2,62 \text{ (t, 2, NCCH}_2\text{CH}_2\text{O-)} \text{ og } 0,75\text{--}1,58 \text{ (m, 62, alifatiske protoner)}]$.

B. Titelforbindelsen.

En blanding af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoethyl)-glycerol (20,5 g, 35,5 mmol), tetrahydrofuran (200ml), ethanol (10 ml) og Raneynikkelkatalysator 3 g, blev mættet med ammoniakgas ved 0-5°C og derpå hydrogeneret (3,5 ato) i en Paar-hydrogenator i 3 timer ved stuetemperatur. Blandingen blev så filtreret, katalysatoren vasket med tetrahydrofuran (50 ml) og det totale filtrat fordampet i vakuum til en olie. Denne fremgangsmåde blev gentaget 3 gange mere med friske reaktanter og katalysator til dannelse af en totalmængde på 77 g olie. Olien blev opløst i ether (500 ml) og opløsningen vasket med 2 vægt% vandig ammoniumhydroxidopløsning (500 ml), tørret med MgSO_4 , filtreret og indampet i vakuum til dannelse af et fast stof. Det faste stof blev opløst i 300 ml methanol, og opløsningen mættet med hydrogenchloridgas og derpå indampet i vakuum til fast stof. Det faste stof blev krystalliseret med ethylacetat til dannelse af det angivne produkt med en ringe mængde urenhed (63 g, 72%'s udbytte, smp. 69-70°C), og derpå omkrystalliseret 2 gange med isopropanol:acetonitril (1:1, 800 ml) [47,5 g, 54%'s udbytte, smp. 58-59°C, nmr. (CDCl_3) δ 3,84 (t, 2, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,55 (m, 9, $-\text{OCH}[\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_{15}\text{H}_{31}]_2$), 3,24 (t, 2, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 2,04 (m, 2, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) og 0,90-1,32 (m, 62, alifatiske protoner), elementær analyse: beregnet: 72,04% C, 12,73% H, 2,21% N, fundet: 71,80% C, 12,41% H, 2,30% N].

Eksempel 2-7

På lignende måde som beskrevet i eksempel 1 blev følgende forbindelser fremstillet ved anvendelse af de passende 1,3- eller 1,2-di-O-(n-højere alkyl)-glyceroler som udgangsmateriale



Eksem- pel nr.	Struk- tur	R ¹	R ²	Molekylær formel	Smp. (°C)	Analyse			
						C	$\frac{\text{Beregnet}(\%)}{\text{H} \quad \text{N}}$	$\frac{\text{Fundet}(\%)}{\text{H} \quad \text{N}}$	
2	I	n-dodecyl	n-dodecyl	$\text{C}_{30}\text{H}_{63}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot\frac{3}{2}\text{H}_2\text{O}$	76-77	65,60	12,29 2,54	65,45 11,91 2,61	
3	I	n-tetra-decyl	n-tetra-decyl	$\text{C}_{34}\text{H}_{71}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	57-58	68,47	12,50 2,35	68,51 11,24 2,29	
4	I	n-octa-decyl	n-octa-decyl	$\text{C}_{42}\text{H}_{87}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$	64-65	73,04	12,84 2,03	72,96 12,56 1,99	
5	II	n-tetra-decyl	n-tetra-decyl	$\text{C}_{34}\text{H}_{71}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$	90-91	70,60	12,55 2,42	70,74 12,85 2,68	
6	II	n-hexa-decyl	n-hexa-decyl	$\text{C}_{38}\text{H}_{79}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot\frac{3}{4}\text{H}_2\text{O}$	76-78	70,54	12,77 2,16	70,42 12,17 2,07	
7	II	n-octa-decyl	n-octa-decyl	$\text{C}_{42}\text{H}_{87}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	67-69	71,19	12,80 1,98	70,95 12,19 1,91	

Eksempel 8

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(4-aminobutyl)-glycerol-hydrochlorid.

A. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-hydroxypropyl)-glycerol.

Boranmethylsulfid (BMS) kompleks (6,5 ml, 68,5 mmol) blev sat ved 0-5°C til en opløsning af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-allyl-glycerol (10,82 g, 18,6 mmol, fremstillet som angivet i eksempel 11A) i hexan (190 ml), og den resulterende opløsning blev omrørt i 3 timer ved stuetemperatur. Reaktionsopløsningen blev så igen afkølet til 0-5°C, og ethanol (17,3 ml) blev dråbevis tilsat til spaltning af resterende BMS. Reaktionsopløsningen blev så behandlet med vandig 3N natriumhydroxid (13 ml) og 30 vægt% vandig hydrogenperoxid (11 ml) og omrørt i 16 timer under tilbagesvaling, afkølet og udhældt i isvand indeholdende natriumbisulfit. Isvandopløsningen blev omrørt, indtil den gav negativ stivelses-iodidprøve for peroxider, og derpå ekstraheret med ether (3 x 200 ml). Den samlede ethereks-trakt blev vasket med vand (200 ml), vasket med mættet vandig natriumchloridopløsning (200 ml), tørret over $MgSO_4$, filtreret og indampet i vakuum. Det resulterende produkt blev rensat med chromatografi på silicagel (eluering med benzen:ethanol) [5 g, 45% udbytte, smp. 29°C, nmr. ($CDCl_3$) δ 3,80 (t, J = 5 Hz, 2, -OCH₂CH₂CH₂OH) og 3,75 (t, J = 5 Hz, 2, -OCH₂CH₂CH₂)].

B. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-[3-(p-tosyloxy)propyl]-glycerol.

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-hydroxypropyl)-glycerol (8,0 g, 13,4 mmol) blev sat ved 10°C til en opløsning af p-toluensulfonylchlorid (5,25 g, 27,5 mmol) og pyridin (10 ml i 200 ml methylenchlorid), og blandingen blev omrørt i 60 timer ved stuetemperatur. Vand (200 ml) blev så tilsat, methylenchlorid og den vandige fase blev adskilt, sidstnævnte blev ekstraheret med methylenchlorid (2 x 150 ml). De 3 methylenchloridlag blev samlet, vasket med vand (2 x 150 ml), tørret over $MgSO_4$, filtreret og indampet i vakuum. Det resulterende tosylat blev rensat ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen) [3,0 g, 30% udbytte, olie, ir ($CHCl_3$) 1130 og 1350 cm^{-1} , nmr. ($CDCl_3$) δ 7,53 (q, 4, protoner på phenylringen), 4,15 (t, 2, -SO₃CH₂CH₂CH₂O-), 3,63 (t, 2, -SO₃CH₂CH₂CH₂O-), 3,42 (m, 9, -OCH[CH₂OCH₂C₁₅H₃₁]₂), 2,45 (s, 3, Ar-CH₃), 1,90 (m, 2, -SO₃CH₂CH₂CH₂O-) og 0,90-1,50 (m, 62, alifatiske protoner)].

C. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-cyanopropyl)-glycerol.

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-[3-(p-tosyloxy)propyl]-glycerol (3,0 g, 4,0 mmol) blev opløst i en opløsning af natriumcyanid (0,5 g, 10 mmol) i N,N-dimethylformamid (50 ml) og den resulterende opløsning blev omrørt i 16 timer ved 80°C, afkølet, fortyndet med vand (100 ml) og ekstraheret med ether (3 x 150 ml). Den samlede etherekstrakt blev vasket med 1N saltsyre (3 x 75 ml), derpå med mættet vandig natriumhydrogencarbonatopløsning (3 x 75 ml), så vand (75 ml) og til slut mættet vandig natriumchloridopløsning (75 ml) og derpå tørret (MgSO₄), filtreret og inddampet i vakuum til dannelse af et voksagtigt fast stof, der blev anvendt til næste trin uden yderligere rensning [2,0 g, 83%'s udbytte, ν (CHCl₃) 2250 cm⁻¹].

D. Titelforbindelsen.

Lithiumaluminiumhydrid (800 mg, 21 mmol) blev sat til en opløsning af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-cyanopropyl)-glycerol (2,0 g, 3,3 mmol) i ether (100 ml), og blandingen blev omrørt i 60 timer ved stuetemperatur. Tilstrækkeligt vand til afslutning af reaktionen blev forsigtigt tilsat, efterfulgt af yderligere 100 ml vand. Den resulterende blanding blev omrørt i yderligere 1 time ved stuetemperatur og derpå ekstraheret med ether (3 x 100 ml). Den samlede etherekstrakt blev vasket med mættet vandig natriumchloridopløsning (3 x 75 ml), tørret over MgSO₄, filtreret og inddampet i vakuum til en olie, som blev rensat ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen:ethanol) og derpå opløst i ethanol. Opløsningen blev behandlet med hydrogenchloridgas og derpå inddampet i vakuum til dannelse af et fast stof, som blev omkrystalliseret med ethylacetat. [444 mg, 21%'s udbytte, smp. 61,5-63,5°C, nmr. (CDCl₃) δ 3,67 (t, 2, -OCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 3,55 (m, 9, -OCH[CH₂OCH₂C₁₅H₃₁]₂), 3,10 (t, 2, -OCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 15,0-2,00 (m, 4, -OCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂) og 0,80-1,50 (m, 62, alifatiske protoner), elementær analyse beregnet: 72,23% C, 12,74% H, 2,16% N, fundet: 72,53 % C, 12,42% H, 2,10% N].

Eksempel 9

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-aminomethylbenzyl)-glycerol-hydrochlorid.

A. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glycerol.

Natriumhydrid (1,056 g af 50 vægt% mineraloliedispersion, 22 mmol) blev sat til en opløsning af 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-glycerol (9,73 g, 18 mmol) i tetrahydrofuran (150 ml), og den resulterende opløsning blev omrørt i 20 min. ved stuetemperatur under nitrogen. m-Cyanobenzylbromid (4,0 g, 20 mmol) blev tilsat, og reaktionsblandingen omrørt natten over ved stuetemperatur under nitrogen. Vand (200 ml) blev så tilsat forsigtigt, og den resulterende blanding ekstraheret med ethylacetat (3 x 150 ml). Det samlede ethylacetatekstrakt blev tørret over MgSO_4 , filtreret og inddampet i vakuum til en olie (12 g), som blev renset ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen:hexan) [8,0 g, 68%'s udbytte, olie, ir (CHCl_3) 2230 cm^{-1}].

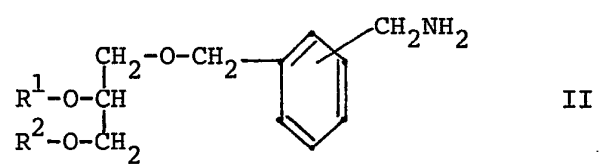
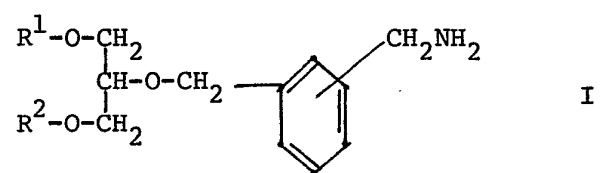
B. Titelforbindelsen.

En opløsning af 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glycerol (1,0 g, 1,5 mmol) i ether (10 ml) blev langsomt under nitrogen sat til en suspension af lithiumaluminiumhydrid (0,057 g, 1,5 mmol) i ether (40 ml), og den resulterende blanding blev omrørt i 1 time under tilbagesvaling og nitrogen og derpå afkølet. 50 ml vand blev forsigtigt tilsat, og blandingen blev ekstraheret med ether (3 x 50 ml). Den samlede etherekstrakt blev tørret over MgSO_4 , filtreret og inddampet i vakuum til en olie, som blev renset ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen:ethanol) og derpå opløst i ethylacetat. Opløsningen blev behandlet med hydrogenchlorid-gas og derpå inddampet i vakuum til dannelse af et fast stof, som blev omkrystalliseret med ethylacetat [220 mg, 21%'s udbytte, smp. $88-90^\circ\text{C}$, elementær analyse beregnet: 74,14% C, 11,87% H, 2,01% N, fundet: 74,35% C, 11,54% H, 2,15% N].

Eksempel 10-21

På lignende måde som beskrevet i eksempel 9 blev følgende forbindelser fremstillet ved anvendelse af passende 1,3- eller 1,2-di-O-(n-højere alkyl- eller alkenyl)-glyceroler og cyanobenzylbromid som udgangsmaterialer

15



Eksem- pel nr.	Struk- tur	R ¹	R ²	Substitution på phenylringen	Molekylar formel	Smp. (°C)
10	I	n-hexadecyl	n-hexadecyl	ortho	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	71-73
11	I	n-hexadecyl	n-hexadecyl	meta	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	77-79
12	I	n-hexadecyl	n-hexadecyl	para	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl·H ₂ O	77-78
13	II	n-tetradecyl	n-tetradecyl	ortho	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl·1/4H ₂ O	71-72
14	II	n-hexadecyl	n-hexadecyl	ortho	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	79-80
15	II	n-tetradecyl	n-tetradecyl	meta	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl	87-88
16	II	n-octadecyl	n-octadecyl	meta	C ₄₇ H ₈₉ O ₃ N·HCl	73-75
17	II	n-octadec- 9-enyl	n-octadec- 9-enyl	meta	C ₄₇ H ₈₅ O ₃ N·HCl·1/2H ₂ O	olie
18	II	n-tetradecyl	n-tetradecyl	para	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl	132-135
19	II	n-hexadecyl	n-hexadecyl	para	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	117-119
20	II	n-octadecyl	n-octadecyl	para	C ₄₇ H ₈₉ O ₃ N·HCl	67-69
21	II	n-octadec- 9-enyl	n-octadec- 9-enyl	para	C ₄₇ H ₈₅ O ₃ N·HCl·3/4H ₂ O	olie

Analyse

<u>Eksem- pel nr.</u>	<u>Beregnet (%)</u>			<u>Fundet (%)</u>		
	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
10	74,14	11,87	2,01	73,89	11,43	1,99
11	73,20	11,85	1,98	73,17	11,53	2,28
12	72,28	11,83	1,96	75,52	11,46	1,90
13	72,63	11,48	2,17	72,62	11,81	2,43
14	74,14	11,87	2,01	73,94	11,25	2,02
15	73,14	11,65	2,19	72,86	11,44	2,11
16	74,99	12,06	1,86	74,97	11,73	1,83
17	74,50	11,57	1,85	74,40	11,08	2,08
18	73,14	11,65	2,19	72,84	11,30	2,26
19	74,14	11,87	2,01	74,33	11,55	2,15
20	74,99	12,06	1,86	74,50	11,30	1,91
21	74,06	11,54	1,83	74,00	10,99	1,93

Eksempel 22

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(4-aminomethylphenyl)-glycerol-hydrochlorid.

A. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(p-tosyl)-glycerol.

På lignende måde som beskrevet i eksempel 8B blev den angivne forbindelse fremstillet ved reaktion mellem 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-glycerol og p-toluensulfonylchlorid. Rensning skete ved omkrystallisation med ethylacetat [smp. 53-55°C, ir (CHCl₃) 1360 og 1180 cm⁻¹].

B. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(4-cyanophenyl)-glycerol.

En blanding af 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(p-tosyl)-glycerol (1,4 g, 2,0 mmol), natrium-4-cyanophenolat (0,5 g, 3,5 mmol) og xylen (100 ml) blev omrørt i 16 timer under tilbagesvaling. Da reaktionen endnu ikke var fuldendt, blev xylenet fjernet ved destillation og erstattet med N,N-dimethylformamid (100 ml) og den resulterende opløsning blev omrørt i yderligere 16 timer ved 150°C. Reaktionsopløsningen blev så afkølet, fortyndet med vand (100 ml) og ekstraheret med ether (2 x 100 ml). Den samlede ether-ekstrakt blev vasket, først med 3N saltsyre (100 ml), så med 10vægt% vandig natriumhydrogencarbonatopløsning (100 ml) og derpå vand (100 ml), tørret over MgSO₄, filtreret og inddampet i vakuum til en olie, som blev rensat ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen) [0,65 g, 50%'s udbytte, smp. 53-55°C, ir (CHCl₃) 2210 cm⁻¹].

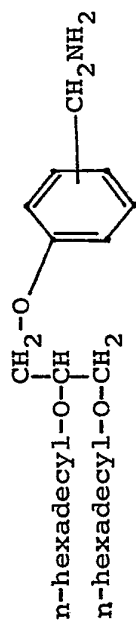
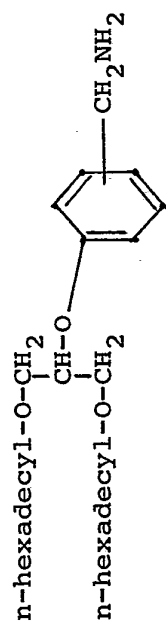
C. Titelforbindelsen.

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(4-cyanophenol)-glycerol (0,60 g, 0,93 mmol) blev sat til en suspension af lithiumaluminiumhydrid (0,3 g, 7,9 mmol) i ether (25 ml), og den resulterende blanding blev omrørt i 30 min. ved stuetemperatur, vand (25 ml) blev så forsigtigt tilsat, etherfasen og den vandige fase blev adskilt, og sidstnævnte blev ekstraheret med ether (3 x 25 ml) og ethylacetat (25 ml). De 5 organiske ekstrakter blev samlet, tørret over MgSO₄, filtreret og inddampet i vakuum til en olie, som blev opløst i ether. Opløsningen blev behandlet med hydrogenchloridgas, hvorved et fast stof udfældedes [0,41 g, 64%'s udbytte, smp. 110-112°C, nmr. (CDCl₃) δ 4,02, (s, 2, -CH₂NH₂), elementær analyse beregnet: 73,91% C, 11,81 % H, 2,05% N, fundet: 73,62% C, 11,71% H, 2,14% N].

Eksempel 23-25

På lignende måde som beskrevet i eksempel 22 B-C blev følgende forbindelser fremstillet ud fra passende tosylater (fremstillet som

i eksempel 22A) og natriumcyanophenolat:



Eksem- pel nr.	Struk- tur	Substitution på phenylringen	Molekylær formel	Smp. (°C)	Analyse			
					Beregnet (%)		Fundet (%)	
					C	H	C	H
23	I	meta	C ₄₂ H ₇₉ O ₃ N·HCl	78-80	73,91	11,81	74,11	11,64
24	I	para	C ₄₂ H ₇₉ O ₃ N·HCl	120-122	73,91	11,81	73,94	11,37
25	II	meta	C ₄₂ H ₇₉ O ₃ N·HCl	84-86	73,91	11,81	74,00	11,34
								2,44
								2,04
								2,04

Eksempel 26

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[4-(3-aminopropyl)phenyl]-glycerol-hydrochlorid.

På lignende måde som beskrevet i eksempel 22 blev den angivne forbindelse fremstillet ved anvendelse af 4-(2-cyanoethyl)phenolat i stedet for natrium-4-phenolat (smp. 153-155°C, elementær analyse beregnet: 74,37% C, 11,91% H, 1,97% N, fundet: 74,13% C, 11,44% H, 2,08% N).

Eksempel 27

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(2-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid.

A. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[2-(p-tosyloxy)propyl]-glycerol.

På lignende måde som beskrevet i eksempel 8 A og B blev 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-allyl-glycerol bragt til reaktion med BMS, og de resulterende 2-hydroxypropyl- og 3-hydroxypropylforbindelser omdannet til deres tilsvarende tosylater. Adskillelse blev ikke foretaget på dette trin. Blandingen af tosylater blev anvendt direkte ved næste trin.

B. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(2-azidopropyl)-glycerol.

Den resulterende blanding af tosylater (3,0 g, 4,0 mmol) blev opløst i N,N-dimethylacetamid (50 ml) og behandlet med en opløsning af natriumazid (0,326 g, 5,0 mmol) i vand (5 ml) i 16 timer ved 90°C. Reaktionsopløsningen blev så afkølet, fortyndet med vand (200 ml) og ekstraheret med ether (2 x 150 ml). Den samlede ether-ekstrakt blev vasket med vand, tørret over MgSO₄, filtreret og indampet i vakuum til en olie (2 g, 81% udbytte, ir (CHCl₃) 2100 cm⁻¹, som var en blanding af 2-azidopropyl- og 3-azidopropylforbindelser, som blev anvendt uden yderligere rensning til næste trin.

C. Titelforbindelsen.

Den resulterende blanding af azider (2 g, 3,2 mmol) blev opløst i ether (100 ml), behandlet med lithiumaluminiumhydrid (0,4 g, 10,5 mmol), og henstod under omrøring i 2 timer ved stuetemperatur. Overskydende hydrid blev ødelagt ved forsigtig tilsætning af ethanol (10 ml) og vand (150 ml), og blandingen blev så ekstraheret med ether (2 x 100 ml). Den samlede etherekstrakt blev tørret over MgSO₄, filtreret og indampet i vakuum til en olie (1,8 g), som blev rensset ved chromatografi på silicagel (eluering med benzen: ethanol) og derpå omdannet til hydrochloridsalt ved opløsning og behandling med hydrogenchloridgas. Saltet blev omkrystalliseret

fra ethylacetat (0,21 g, fast stof indeholde ca. 1/2 mol H₂O per mol produkt, 10%'s udbytte, smp. 56-58°C, elementær analyse beregnet: 71,03% C, 12,70% H, 2,18% N, fundet: 71,11% C, 12,91% H, 2,16% N).

Eksempel 28

1,2-Di-O-(n-octadecyl)-3-O-(2-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid.

På lignende måde som beskrevet i eksempel 27 A blev 1,2-di-O-(n-octadecyl)-3-O-(2-hydroxypropyl)-glycerol fremstillet ud fra 1,2-di-O-(n-octadecyl)-3-O-allyl-glycerol. Det angivne produkt blev fremstillet ud fra 1,2-di-O-(n-octadecyl)-3-O-(2-hydroxypropyl)-glycerol på lignende måde som beskrevet i eksempel 27 B-C (fast stof indeholdende ca. 1 mol H₂O per mol produkt, smp. 65-67°C, elementær analyse beregnet: 71,19% C, 12,80% H, 1,98% N, fundet: 71,12% C, 12,52 % H, 1,92% N).

In vivo aktivitet af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid overfor EMC-virus.

Fremstilling af en emulsion skete ved smeltning og blanding af lige dele af den angivne forbindelse, polysorbat 80 og glycerin og påfølgende dispergering af blandingen i varmt vand under voldsom omrøring. Præparatet blev så indstillet til en endelig koncentration på 0,14M natriumchlorid og 0,01M natriumfosfat, pH 7. Yderligere fortyndinger blev gjort med 0,14M natriumchlorid, 0,01M natriumfosfat, pH 7, pufferopløsning.

3 Grupper af 10 hun-albinomus (20-25 g legemsvægt) blev givet 0,5 ml intraperitoneale injektioner indeholdende mængder på 1,5, 5, og 15 mg af den angivne forbindelse/kg legemsvægt. En fjerde kontrolgruppe på 10 mus fik ingen injektion. 18-24 Timer senere fik alle 4 grupper 0,2 ml subcutan injektion indeholdende 20 gange LD₅₀ dosis, som forårsager 50% dødelighed i ubeskyttede mus i 10 dage, af encephalomyocarditis (EMC) virus. Overlevelsesdata blev opsamlet over de næste 10 dage, og den relative overlevelse (S_r) beregnet:

<u>Dosis af forbindelsen</u>	<u>S_r (gennemsnit af syv forsøg)</u>
15 mg/kg	61
5	45
1,5	24

Antiviral virkning udtrykkes som den relative overlevelse (S_r) i eksperimentelle grupper sammenlignet med kontrollen 10 dage efter smitte. S_r defineres ved hjælp af formelen

$$S_r = \left[\frac{S_x + \sum_{i=1 \text{ til } 10} x_i - \sum_{i=1 \text{ til } 10} e_i}{100 + 100 - \sum_{i=1 \text{ til } 10} e_i} \right] \times 100$$

hvor S_r = den relative overlevelse

S_x = procentisk overlevelse efter 10 dage i den eksperimentelle gruppe

x_i = antallet af overlevende på dag i i den eksperimentelle gruppe

e_i = antallet af overlevende på dag i i kontrolgruppen.

På lignende måde som beskrevet ovenfor blev in vivo-aktiviteten overfor EMC-virus bestemt for de følgende forbindelser.

Forbindelse fremstil- let i eksempel nr.	S _r ved dosis (mg/kg)			
	15	5	1,5	0,5
9	71	49	20	6
10	62	47	18	-
11	80	72	20	-
12	74	46	4	-
13	57	42	3	-
14	64	58	15	-
15	74	44	34	-
16	46	7	6	-
17	45	5	4	-
18	70	36	3	-
19	37	31	12	0
20	44	30	8	-
21	68	43	2	-
22	66	45	17	-
23	68	28	33	-
24	60	63	16	-
25	53	34	16	7
26	56	35	20	6

Reduktion af virusudbytte i humane polypceller in vitro med 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid.

Et dyrkningsmedium blev fremstillet ved til Eagle's minimale essentielle medium (100 ml) at sætte 100X koncentreret antibiotisk-antimycotisk opløsning (2 ml) 200 mM glutaminopløsning (1 ml) 100X koncentreret opløsning af ikke-essentielle aminosyrer (1 ml) 100 mM natriumpyruvat opløsning (1 ml) og varme-inaktiveret kalvefostereserum (10%). Hver fordybning i mikrotiterplader med 96 fordybninger blev podet med ca. 50.000 menneskelige nasale polypceller suspenderet i 0,2 ml vækstmedium. Pladerne blev så inkuberet i 8-10 dage ved 37°C i en 5% CO₂ atmosfære til dannelsen af monolag af cellerne.

Efter cellevækstperioden på 8-10 dage blev sammenløbende monolag på pladerne vasket flere gange med fosfatforpufret saltvand og umiddelbart efter behandlet med 0,2 ml per fordybning af vedligeholdelsesmedium indeholdende 10, 5,0, 1,0, 0,5, 0,1 og 0 µg/ml af den angivne forbindelse. Vedligeholdelsesmediet var identisk med vækstmediet, som er beskrevet i det foregående, med den undtagelse, at mængden af kalvefostereserum er 5%. Pladerne blev inkuberet i yderligere 18 timer ved 37°C, og monolagene blev derpå vasket flere gange med fosfatforpufret saltvand til fjernelse af den angivne forbindelse, smittet med et materiale indeholdende ca. 1000 gange TCID₅₀, d.v.s. den dosis, som forårsager 50%'s infektion i ubeskyttede kulturer, af vesikular stomatitis-virus (VSV) i en 2 timers adsorptionsperiode ved 37°C, vasket 4 gange med fosfatforpufret saltvand til fjernelse af ikke-adsorberede viruspartikler og forsynet med 0,2 ml per fordybning af vedligeholdelsesmediet. Pladerne blev så inkuberet i 7 timer ved 37°C, og dyrkningsvæsken fra 5-8 reproducerede celler taget fra hver plade, oplagret frosne i prøverør og derpå filtreret for mængden af tilstedeværende infektiøs virus i mikrotiterplader af L-929 musefibroblaster. L-929 musekulturerne blev talt mikroskopisk og analyseret ca. 3-4 dage senere med følgende fald i virusudbytte (med hensyn til kontrollen) bestemt for de 5 koncentrationer af den angivne prøveforbindelse:

Procentreduktion af virusudbytte
Koncentration (µg/ml) af den angivne forbindelse.

<u>10</u>	<u>5,0</u>	<u>1,0</u>	<u>0,5</u>	<u>0,1</u>
94%	90%	84%	75%	<68%

På lignende måde som beskrevet ovenfor blev formindskelsen af virusudbytte i humane polypceller in vitro bestemt for de i det følgende angivne forbindelser.

Forbindelse fremstillet i eksempel nr.	% Formindskelse af virus udbytte				
	Koncentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	10	5,0	1,0	0,5	0,1
6	+	+	-	-	ND
a)	ND	±	-	-	ND
b)	+	+	-	ND	ND
8	+	±	-	ND	ND
9	+	+	-	ND	-
13	+	-	-	ND	ND
14	+	+	-	-	-
15	+	±	-	-	-
17	+	±	-	-	-
18	+	±	-	-	-
23	+	+	-	-	-
25	+	+	-	ND	ND
26	+	+	-	ND	ND
27	+	+	-	ND	ND
28	ND	+	-	ND	ND

$+ \equiv > 68\%$ Formindskelse, $\pm \equiv \sim 68\%$ formindskelse
 $- \equiv < 68\%$ formindskelse, ND $\equiv$ ikke bestemt

a: 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-ethylaminopropyl)-glycerol, HCl
 b: 1,2-di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(2-isopropylaminopropyl)-glycerol, HCl

Virkning af 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid til at inducere cirkulerende interferon.

En blanding af lige vægtmængder af den angivne forbindelse, polysorbat 80 og glycerol blev samlet og derpå homogeniseret i varm 0,14M natriumchlorid indeholdende 0,01M natriumfosfat, pH 7, (PBS). Den resulterende olie-i-vand-emulsion blev let fortyndet med PBS til administrering.

Hunmus (med legemsvægt 20 til 25 g) blev injiceret intraperitonealt (0,5 ml) med en mængde af den i det foregående nævnte fortyndede emulsion indeholdende 25 mg af den angivne forbindelse per kg legemsvægt. 8, 12, 16 og 20 timer efter injektion blev prøver af plasma taget fra 4 mus og samlet. Seriefortyndinger i L-15 (Leibovitz) medium indeholdende 5% kalvefosterserum blev inkuberet i mikrotiterplader natten over ved 37°C på sammenløbne monolag af L-929 musefibroblaster. Monolagene blev så vasket med proteinfrit medium, smittet med 10 gange TCID₅₀, d.v.s. den dosis, som forårsager 50%'s infektion i ubeskyttede kulturer, af vesikular stomatitis-virus (VSV) i en adsorptionsperiode på 1 time ved 37°C, vasket, igen behandlet med L-15 medium indeholdende 5% kalvefosterserum og derpå inkuberet igen i 48 timer ved 37°C. L-929 kulturerne blev så talt mikroskopisk for viral cytopatologi og analyseret, og med plasma interferonniveauet blev den reciprokke af plasmafortyndingen, som forårsagede 50%'s beskyttelse af L-929 monolagene, bestemt.

Endnu et forsøg efter den i det foregående nævnte fremgangsmåde med undtagelse af, at musene fik 10 mg af den angivne forbindelse per kg legemsvægt, og prøver af peritoneal vask blev taget fra 4 mus og samlet 6, 9, 12, 15 og 18 timer efter injektion. Prøverne blev taget ved at frilægge peritonealmembranen, injicere 1 ml Hank's afbalancerede saltopløsning indeholdende 100 penicillinenheder/ml og 100 µg streptomycin/ml i peritonealhulen, kort massering af abdomen og påfølgende opsugning af peritonealvasken.

De følgende data blev opnået fra disse to forsøg

Interferon- kilde	Interferonmængder (enhed/ml)							
	Tid (timer) efter injektion							
	6	8	9	12	15	16	18	20
Plasma	-	34	-	67	-	52	-	40
Peritoneal vask	<16	-	768	320	448	-	448	-

På lignende måde som beskrevet ovenfor blev evnen til at inducere cirkulerende interferon bestemt for de i det følgende angivne forbindelser.

Forbindelse fremstil- let i eksempl nr.	Interferonniveau (enheder/ml) ^a				Interferonniveau (enheder/ml) ^b			
	Tid (timer)	8	12	16	Tid (timer)	6	9	12
9	<20	20	23	75	<13	<13	<13	39
10	20	71	54	68	<18	<18	<18	43
11	<18	138	217	163	<13	<13	<13	43
19	<20	28	60	70	<13	<13	<13	91

(a) Interferonkilde - plasma

(b) Interferonkilde - peritonealvask

Forøgelse af den med polyinosin-polycytidylinsyre [poly-(I:C)]-inducerede cellulære modstand mod virale infektioner af 1,3-di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glycerol-hydrochlorid.

Vækstmedium blev fremstillet ved til Eagle's minimum essentielle medium (100 ml) at sætte 100X koncentreret antibiotisk-antimycotisk opløsning (2 ml), 200 mM glutaminopløsning (1 ml) og varme-inaktiveret kalvefosterserum (5%). Muse-L-929 fibroblaster blev suspenderet i vækstmedium og hver fordybning i mikrotiterplader med 96 fordybninger blev podet med 0,2 ml af suspensionen indeholdende 20.000 til 30.000 celler. Pladerne blev inkuberet i 2-4 dage ved 37°C i en 5%'s CO₂ atmosfære til dannelse af monolag af cellerne. Pladerne blev vasket 4 gange med fosfatforpufret saltvand umiddelbart før behandling.

Poly-(I:C) blev fremstillet i koncentrationer på 5,0, 1,0, 0,2 og 0,04 µg/ml i det i det foregående beskrevne medium minus kalveserum. 0,1 ml af hver fortynding blev samlet i et dambrædt-arrangement på L-929 cellemonolagene med 0,1 ml fortyndinger indeholdende 20,0, 4,0, 0,8, 0,16 og 0,032 µg af den angivne forbindelse per ml serumfrit medium. Kontrolfordybninger blev givet enten poly (I:C) eller forbindelsen alene. Pladerne blev inkuberet i 6 timer ved 37°C i en 5% CO₂ atmosfære, vasket 4 gange med fosfatforpufret saltvand og forsynet med 0,1 ml per fordybning af vækstmedium indeholdende 2% kalvefosterserum. Efter yderligere 18 timers inkubering blev pladerne vurderet for toksicitet og derpå smittet med 0,1 ml per fordybning af vesikular stomatitisvirus (VSV) suspension indeholdende 10-30 g TCID₅₀ (vævskultur inficeret med dosis, som forårsager 50%'s infektion). Pladerne blev inkuberet i yderligere 3-4 dage og derpå vurderet mikroskopisk for cytopatogen effekt (CPE). Celler beskyttet for virusinfektion var frie for CPE. Den minimale beskyttende dosis (MPD) af poly-(I:C) alene blev noteret, og mængden af forbedret eller forøget anti-viral virkning forårsaget ved kombination med den angivne forbindelse opført for hvert fortyndingsniveau og forbindelsen.

Forøgelse af poly-(I:C)-induceret cellulær modstand mod virale infektioner.

Koncentration (µg/ml) af forbindelsen

<u>20,0</u>	<u>4,0</u>	<u>0,8</u>	<u>0,16</u>	<u>0,032</u>
125X	125X	125X	5X	<5X

Bemærk: kombination af poly-(I:C) med forbindelsen giver samme anti-virale virkning som forøget poly-(I:C) koncentration med det angivne antal gange.

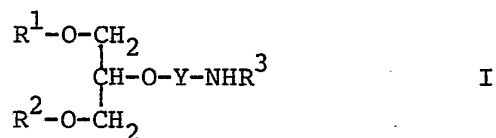
På lignende måde som beskrevet ovenfor blev forøgelsen af den cellulære modstand induceret med poly-(I:C) overfor virale infektioner bestemt med de i det følgende angivne forbindelser.

Forbindelse fremstil- let i eksempel nr.	Poly(I:C) Forøgelse ^a Koncentration (µg/ml)		
	20	4,0	0,8
6	+	+	-
7	+	+	-
9	+	+	±
10	+	+	±
11	+	+	±
12	+	+	±
13	+	+	±
14	+	+	±
15	+	+	±
16	+	±	-
17	-	-	-
18	+	+	±
19	+	+	±
20	+	+	-
21	+	-	-
22	+	+	-
23	+	+	-
24	+	+	-
25	+	+	±
26	+	+	-
27	+	+	±
28	+	+	-

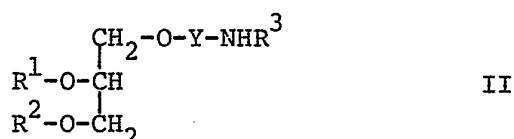
(a) +≡ >5X forøgelse ±≡ ~5X forøgelse
 -≡ <5X forøgelse

P A T E N T K R A V

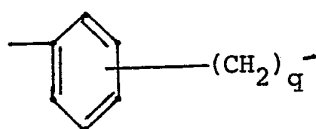
1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af aminderivater af di-O-(n-alkyl- eller alkenyl)-glyceroler med formlen



eller



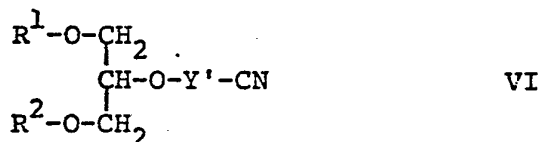
eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, hvor R^1 og R^2 hver er udvalgt fra gruppen bestående af normale alkylgrupper med fra 12-20 carbonatomer og normale alkenylgrupper, hvor dobbeltbindingen ikke er i 1-stillingen, med fra 12-20 carbonatomer, Y er udvalgt fra gruppen bestående af alkylengrupper med fra 2-4 carbonatomer, hvor de to valenser er på forskellige carbonatomer, ortho-, meta- og paraphenylendimethylen, og



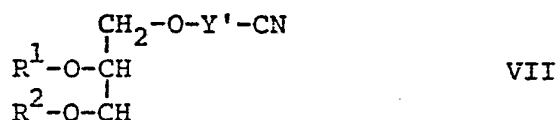
hvor q er et helt tal fra 1-3, og den venstre binding er forbundet til O, og

R^3 er udvalgt fra gruppen bestående af et hydrogenatom og alkylgrupper med fra 2-4 carbonatomer, k e n d e t e g n e t ved, at man til opnåelse af en forbindelse med formlen I eller II, hvor R^3 er et hydrogenatom,

a) reducerer en forbindelse med formlen

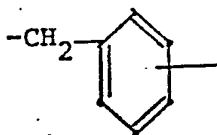


eller

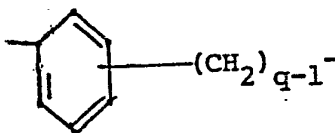


hvor Y' er udvalgt fra gruppen bestående af alkylengrupper med fra 1-3 carbonatomer,

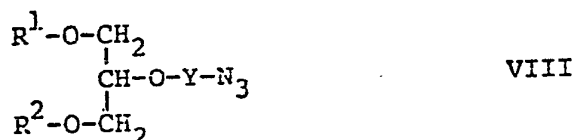
35



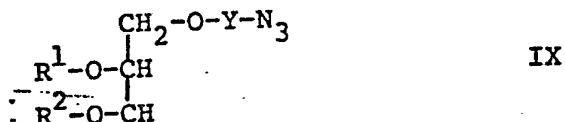
hvor den venstre binding er forbundet til O, og



hvor den venstre binding er forbundet til O, og q har ovennævnte betydning, og hvor R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning eller
b) reducerer en forbindelse med formelen



eller



hvor Y, R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, hvorefter man om ønsket alkylerer den resulterende forbindelse med formlen I eller II, hvor R^3 er et hydrogenatom, og/eller om ønsket omdanner en dannet forbindelse med formlen I eller II til et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at R^1 og R^2 er normale alkylgrupper med fra 14-18 carbonatomer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendetegnet ved, at R^1 og R^2 hver er n-hexadecylgrupper.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at Y er en ligekædet alkylengruppe med fra 2-4 carbonatomer, og R^3 er et hydrogenatom.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at Y er en ortho-, meta- eller para-phenylendimethylengruppe, og R^3 er et hydrogenatom.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendetegnet ved, at Y er en metha-phenylendimethylengruppe.

Fremdragne publikationer: