



# PATENTSCHRIFT 144 540

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                     |      |          |  |
|------|---------------------|------|----------|--|
| (11) | 144 540             | (44) | 22.10.80 | Int. Cl. <sup>3</sup><br>3(51) C 07 D 211/26 |
| (21) | AP C 07 D / 212 895 | (22) | 15.05.79 |  |
| (31) | 906,260             | (32) | 15.05.78 | (33) US                                      |

---

(71) siehe (73)

(72) Kraska, Allen R., Dipl.-Chem., US

(73) Pfizer Inc., New York, US

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 1130 Berlin, Frankfurter Allee 286

---

(54) Verfahren zur Herstellung von  
Di-O-n-alkylglyzerinderivaten

---

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen 1,2- und 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinderivaten, die als nicht-spezifische Stimulantien von durch Zellen vermittelter Immunität bei warmblütigen Tieren vorteilhaft sind. Sie sind unter anderem brauchbar bei der Stimulierung von Antitumoraktivität. Beispiele der erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen sind 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glyzerin und 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-formylbenzyl)-glyzerin.

- 1 - 212 895

Verfahren zur Herstellung von  
Di-O-n-alkylglyzerinderivaten

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer 1,2- und 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinderivaten, welche als nicht-spezifische Stimulanten von durch Zellen vermittelter Immunität bei warmblütigen Tieren vorteilhaft sind. Diese neuen Verbindungen und verwandte Verbindungen haben sich insbesondere als brauchbar bei der Stimulierung von Antitumoraktivität, insbesondere bei der Verbindung zusammen mit einer konventionellen, cytoreduzierenden Therapie, herausgestellt. Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen sind ebenfalls als Hilfsstoffe für Vaccinen brauchbar, d.h. sie sind vorteilhaft in Verbindungen mit bekannten, immunologischen Substanzen, um deren immunogenes Ansprechen zu induzieren oder zu verbessern.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Es ist bekannt, daß biologische Vaccinen wie *Corynebacterium parvum* und BCG, ein lebensfähiger Stamm von *Mycobacterium bovis*, und das synthetische Levamisol als Immunstimulantien des Restikuloendotheliomsystems brauchbar sind und daß sie in der Lage sind, die Widerstandsfähigkeit von warmblütigen Tieren gegenüber Tumoren zu erhöhen. Jedoch war die Verwendung dieser Mittel wegen der Leber-Nieren-Toxizität, der Granulombildung, der Neutropenie und unstatigen, therapeutischen Effekten eingeschränkt. Daher besteht ein fortwährendes Interesse an der Entwicklung von nicht-biologischen, systemisch aktiven Immunstimulantien. Weiterhin ist die Entwicklung von Verbindungen von Interesse, welche als Zusatzstoffe oder Hilfsstoffe für Vaccine brauchbar sind, um die Effekte von konventionellen Vaccinen zu induzieren oder zu fördern. Hinsichtlich einer Diskussion der Stimulierung von durch Zellen vermittelter Immunität und Antitumoraktivität wird auf die folgenden Literaturstellen verwiesen:

Herberman, Adv. Cancer Res., 19 (1971), 207; Jordan und Merigan, Ann. Rev. Pharmacol., 15 (1975), 157; Levy und Wheelock, Adv. Cancer Res., 20 (1972), 131; und Sinkovics, Post Graduate Medicine, 59 (1976), 110.

In der US-PS 2 738 351 sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin jeder der Reste  $R_1$  und  $R_2$  ein Alkylrest, nicht-substituierter oder substituierter Aryl- oder Aralkylrest ist, jeder der Reste X, Y und Z Sauerstoff, Schwefel oder ein Sulfonylrest sein kann, A1K ein geradkettiger oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, und B ein Di-(nieder)-alkylamino-, Piperidino-, Morpholino-, Pyrrolidino-, Niederalkylpyrrolidino-, N'-Alkylpiperazino- oder Pipecolinorest ist, als Lokalanaesthetika beschrieben. Bei der Erläuterung von anderen Syntheswegen in dieser Patentschrift sind weiterhin Zwischenprodukte der zuvor angegebenen Formel genannt, worin B ein

Aminorest und Niederalkylaminorest ist. Jedoch enthält keine der spezifisch in dieser Patentschrift genannten Verbindungen einen Alkylrest  $R_1$  oder  $R_2$ , der größer als der n-Pentylrest ist. Weiterhin sind bei keiner dieser Verbindungen die beiden Reste  $R_1$  und  $R_2$  Alkylreste und die beiden Reste X und Y Sauerstoffatome.

Insektizid und mitizid wirkende Verbindungen der allgemeinen Formel II, worin die Reste  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unter anderem Niederalkylthioester,  $q = 0$  bis 5 und A unter anderem ein 1-Piperidino- oder Di-niederalkylaminorest sein können, sind in der JP.-PS J7-6042-177 beschrieben.

In der US-Patentanmeldung 825 535 sind unter anderem Verbindungen der Formeln (III), (IV) oder (V), worin R ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist und  $R_1$  und  $R_2$  jeweils n-Alkylreste mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen sind. Diese Verbindungen sind als brauchbare Antivirussmittel bezeichnet.

Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Verbindungen der Formel (VI) oder (VII), worin  $R_1$  und  $R_2$  jeweils ein n-Alkylrest mit 8 bis 11 Kohlenstoffatomen und X ein Rest mit der Formel (VIII) oder (IX) ist, worin R ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, sowie die pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze hiervon.

Bei einer Gruppe von interessierenden Verbindungen ist X der 4-Aminomethyl-4-phenyl-piperidinorest. Von solchen Verbindungen sind Verbindungen bevorzugt, worin  $R_1$  und  $R_2$  die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen besitzen, und insbesondere Verbindungen, worin  $R_1$  und  $R_2$  jeweils der n-Decylrest sind. Am meisten bevorzugt von dieser Gruppe sind Ver-

bindungen der Formel (VI).

Weiterhin von Interesse sind solche Verbindungen, worin X der (1-Hydroxy-2-alkylaminoäthyl)-benzyloxyrest ist. Besonders bevorzugt sind solche Verbindungen, worin  $R_1$  und  $R_2$  die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen besitzen, und insbesondere solche Verbindungen, worin  $R_1$  und  $R_2$  der n-Decylrest sind, Der Rest R ist vorzugsweise ein Nieder-n-alkylrest mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, insbesondere der Äthylrest. Verbindungen der Formel (VI) sind am meisten bevorzugt.

Ziel der Erfindung im weiteren Sinn ist die Bereitstellung von Mitteln für ein Verfahren zur Stimulierung der nicht-spezifischen, durch Zellen vermittelten Immunität bei einem Warmblüter, wobei sich das Verfahren dadurch auszeichnet, daß dem Tier eine die Immunität stimulierende, wirksame Menge einer Verbindung einer der allgemeinen Formeln (X) oder (XI), worin  $R_3$  und  $R_4$  jeweils ein n-Alkylrest mit 8 bis 20 Kohlenstoffatomen sind, und X ein Rest der Formel (VIII) oder (XI) ist, worin ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, oder eines der pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze hiervon appliziert wird. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei welchem eine Verbindung appliziert wird, in der der Rest X in der applizierten Verbindung der 4-Aminomethyl-4-phenyl-piperidinorest ist, und insbesondere solche Verbindungen, worin  $R_1$  und  $R_2$  jeweils die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen besitzen und insbesondere n-Decylrest sind, wobei die Applikation von Verbindungen der Formel (X) am meisten bevorzugt ist.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die neuen Verbindungen sind Derivate von 1,2-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinen oder 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinen, und sie können in einfacher Weise aus solchen Verbindungen nach dem

Fachmann an sich bekannten Methoden hergestellt werden. Ausgangsmaterialien in Form von 1,2-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinen können entsprechend der Beschreibung von Kates et al., Biochemistry, 2 (1963), 394 hergestellt werden. Die Ausgangsmaterialien in Form von 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinen können nach der Methode von Damico et al., J. Lipid Res., 8 (1967), 63 hergestellt werden.

Erfindungsgemäß herzustellende Verbindungen, worin der Rest X ein 4-Aminomethyl-4-phenyl-piperidinorest ist, können beispielsweise aus solchen 1,2- und 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinen hergestellt werden, indem zunächst das Tosylderivat des Ausgangsmaterials durch Reaktion mit p-Toluolsulfonylchlorid und Pyridin in einem reaktionsinerten Lösungsmittel wie Methylenchlorid bei einer Temperatur von etwa -10°C bis 40°C und vorzugsweise von 10°C bis 25°C hergestellt wird. Das Tosylderivat wird dann mit 4-Cyano-4-phenylpiperidin durch gemeinsames Erhitzen der Reaktionsteilnehmer auf etwa 75°C bis 250°C umgesetzt. Dies wird vorzugsweise ohne Zugabe eines Lösungsmittels durchgeführt, jedoch kann gegebenenfalls ein reaktionsinertes Lösungsmittel wie Dimethylformamid eingesetzt werden. Das erhaltene Nitril wird dann zu dem gewünschten Amin reduziert, beispielsweise unter Verwendung von Raney-Nickel und Wasserstoff.

Verbindungen, in welchen der Rest X ein (1-Hydroxy-2-alkylaminoäthyl)-benzyloxyrest ist, können durch Umsetzung der 1,2- oder 1,3-(Di-O-n-alkyl)-glyzerinausgangsmaterialien unter Bildung eines Cyanobenzylderivates hergestellt werden. Dies kann durch Umsetzung mit einem geeigneten Cyanobenzylhalogenid wie Cyanobenzylbromid in Anwesenheit eines Alkalimetallhydrids, z.B. Natriumhydrid, in einem reaktionsinerten Lösungsmittel, im allgemeinen einem Äther wie Tetrahydrofuran, unter einer Stickstoffatmosphäre und bei einer Temperatur zwischen etwa 20°C und 65°C durchgeführt werden. Das Cyanobenzylderivat wird dann zu dem ent-

sprechenden Formylbenzylderivat mit einem Alkylaluminiumhydrid, wie Diisobutylaluminiumhydrid, in Benzol unter Stickstoff bei etwa 15°C bis 35°C reduziert. Das erhaltene Formalbenzylderivat wird dann zu dem 1,2-Epoxyäthylbenzylderivat durch Reaktion mit einem in Dimethylsulfoxid suspendierten Alkalimetallhydrid in Anwesenheit von Trimethylsulfoniumjodid bei einer Temperatur von etwa -5°C bis 10°C umgewandelt. Wenn der Rest ein Alkylrest ist, wird die gewünschte Verbindung durch Reaktion des 1,2-Epoxyäthylbenzylderivates mit einem Amin  $RNH_2$  bei einer Temperatur von etwa 75°C bis 135°C gebildet. Wenn R ein Wasserstoffatom ist, wird das Epoxid durch Reaktion mit Natriumazid in Dioxan bei Rückflußtemperatur geöffnet, dann folgt die Reduktion zum gewünschten Amin durch Inkontaktbringen mit einem Reduktionsmittel wie Lithiumaluminiumhydrid oder Natriumaluminiumhydrid in Äther bei einer Temperatur von etwa 20°C bis 35°C.

Pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze der entsprechend der zuvor gegebenen Beschreibung gebildeten Amine können nach konventionellen Methoden hergestellt werden, z.B. durch Vermischen des geeigneten Amins und der geeigneten Säure in einem inerten Lösungsmittel und Gewinnung des Salzes durch Eindampfen des Lösungsmittels oder durch Ausfällung des Salzes. Die Hydrochloridsalze können in einfacher Weise durch Durchleiten von Chlorwasserstoffgas durch eine Lösung des Amins in einem inerten Lösungsmittel hergestellt werden. Die auf diese Weise erhaltenen Hydrochlorid-Dihydrochloridsalze neigen dazu, eine geringe Menge an Kristallisationswasser oder an eingeschlossener Wasser zu enthalten. Dies ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung nicht schädlich, solche Verbindungen können ohne weitere Entwässerung formuliert und appliziert werden. Die neuen Verbindungen umfassen daher sowohl die hydratisierten als auch die nichthydratisierten Verbindungen, Geeignete, pharmazeutisch annehmbare Säuresalze umfassen solche wasserlös-

lichen und wasserunlöslichen Salze wie die Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Hexafluorosphosphat-, Ziträt-, Gluconat-, Benzoat-, Propionat-, Butyrat-, Sulfosalicylat-, Maleat-, Laurat-, Malat-, Fumarat-, Succinat-, Oxalat-, Tartrat-, Amsonat-, (4,4'-Diamino-stylbin-2,2'-disulfonat)-, Pamoat-, (1,1'-Methylen-bis-2-hydroxy-3-naphthoat)-, Stearat-, 3-Hydroxy-2-naphthoat-, p-Toluolsulfonat-, Methansulfonat-, Lactat- und Suraminsalze.

Die durch die Formel (X) und (XI) wiedergegebenen Verbindungen, d.h. die erfindungsgemäßen, neuen Verbindungen der Formeln (VI) und (VII) und die höheren Alkylätherhomologe, welche in der US-PA 825 535 beschrieben sind, haben sich als Mittel für die nichtspezifische Stimulierung der durch Zellen vermittelten Immunität bei warmblütigen Tieren herausgestellt, und insbesondere sind sie bei der Stimulierung des Reticuloendotheliensystems brauchbar. Die zuvor beschriebenen Verbindungen können bei einem warmblütigen Tier auf einer Vielzahl von konventionellen Wegen appliziert werden, insbesondere intravenös oder intraperitoneal, wobei Dosismengen von etwa 0,5 bis 5 mg/kg Körpergewicht des zu behandelnden Lebewesens geeignet sind, wenn die Applikation auf diesen Wegen erfolgt. Jedoch kann der Arzt die besondere, für den einzelnen Patienten am meisten geeignete Dosierung bestimmen, wobei dies von dem zu behandelnden Lebewesen und der besonderen, eingesetzten Verbindung abhängig ist. Im allgemeinen werden kleine Dosen zu Beginn appliziert und diese können allmählich gesteigert werden, um die optimale Dosierung für den betreffenden Patienten festzulegen. Die Immunfähigkeit des Lebewesens wird im allgemeinen im Anschluß an die Applikation überwacht, wobei konventionelle auf dem Fachgebiet angewandte Arbeitsweisen eingesetzt werden, beispielsweise Untersuchungen der Monocytenaktivierung und der Macrophagenaktivierung, die im folgenden noch näher erläutert werden. Typischerweise wird die maximale Aktivierung etwa 24 bis 48 Stunden nach der anfänglichen Appli-



kation beobachtet und bei fehlender Applikation von weiteren Dosismengen nimmt die Aktivierung bis auf den Anfangswert während einer weiteren Periode von 24 bis 48 Stunden wieder ab. Daher hält eine Applikation einer zweiten Dosis ungefähr 24 bis 72 Stunden nach der Anfangsapplikation den gewünschten Wert der Immundefähigkeit aufrecht. Im allgemeinen werden 2 bis 4 Dosen auf diese Weise appliziert, und das Ansprechen des Lebewesens auf die Behandlung bestimmt. Weitere Dosen können dann, falls erforderlich, entsprechend der zuvor gegebenen Beschreibung appliziert werden.

Die Verbindungen können in pharmazeutischen Präparationen oder Arzneimitteln zugesetzt werden, welche die Verbindung oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel enthalten. Ein besonders bevorzugter Typ von pharmazeutischem Träger für diesen Zweck ist ein Träger in Form eines sterilen Fettes oder einer Lipidemulsion. Der letztgenannte Trägertyp hat sich als besonders wirksam für die parenterale und intravenöse Applikation herausgestellt, wodurch der therapeutische Index auf einen Wert von etwa 15 bis 25 erhöht wird, während bei Formulierungen mit einem grenzflächenaktiven Mittel (Tween 80) - Glyzerin-Wasser therapeutische Indices von etwa 3 bei Mäusen und Ratten in ersten Tests mit den Niederalkyläthern gemäß der Erfindung beobachtet wurden, beispielsweise mit 4-Aminomethyl-1-[2,3-di-n-octyloxy)-n-propyl]-4-phenylpiperidin. Solche Vorteile wurden auch für andere Verbindungen, welche zusammen mit Fett-Emulsionsträgern verwendet wurden, berichtet, siehe beispielsweise Fortner et al., American Journal of Hospital Pharmacy, 32 (1975), 502 und Jeppsson et al., First International Conference on Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Paris-Süd, Juni 1977. Ein Beispiel eines besonders geeigneten Trägers ist eine auf Sojabohnenöl basierende 10 %ige Fettemulsion, die im Handel erhältlich ist (Bezeichnung Intralipid von Cutter Laboratories, Berkely,

Kalifornien, USA). Jedoch können auch andere ähnliche Träger geeignet sein, und sie können in einfacher Weise vom Fachmann hergestellt werden.

Verbindungen der Formeln (X) und (XI) sind ebenfalls als Hilfsstoffe für Vaccinen brauchbar, und sie können für dieselben Zwecke eingesetzt und nach denselben Methoden appliziert werden, wie bei derzeit bekannten Hilfsstoffen bzw. Zusatzstoffen, siehe z.B. die Literaturstelle "Immunological Adjuvants", World Health Organization, Technical Report Series, No. 595. Beispielsweise sind die erfindungsgemäßen Verbindungen brauchbar mit Vaccinen wie Vaccinen gegen Influenza, Maul- und Klauenseuche und Diphtherie, wobei dies jedoch keine Beschränkung bedeutet. Die Verbindung kann in der Vaccinedosis in einer Menge von etwa 1 bis 20 mg pro Vaccinedosis, vorzugsweise in einen pharmazeutisch annehmbaren Träger eingegeben werden, beispielsweise einem Fett oder einer Lipidemulsion oder Glyzerin. Die Dosis Vaccine-Hilfsstoff wird dann dem Lebewesen in der für die besondere Vaccine konventionellen Weise appliziert, im allgemeinen als Einzeldosis, welche subkutan oder intramuskulär zugeführt wird. Alternativ kann der Hilfsstoff unabhängig von der Vaccine und entweder gleichzeitig oder vorzugsweise etwa 8 bis 24 Stunden vor der Applikation der Vaccine gegeben werden.

Die die Immunität stimulierende Aktivität und Antitumoraktivität der hier geschriebenen Verbindungen kann nach pharmakologischen Tests bestimmt werden. Geeignete Tests umfassen die Bestimmung der peritonealen Makrophagenaktivierung, die Bestimmung der Tumorzurückweisung (Sarcoma-180J-Modell), die Bestimmung der verzögerten, kutanen Hypersensitivität und die Bestimmung der peripheren Monocytenaktivierung. Solche Tests werden im folgenden noch vollständiger beschrieben und anhand von Beispielen gezeigt, zusammen mit hierbei erzielten Ergebnissen für Verbindungen der vorliegenden Er-

findung. Weiterhin werden noch geeignete Tests für die Bestimmung der Aktivität als Vaccinehilfsstoff angegeben.

Ausführungsbeispiele:

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert, wobei diese jedoch nur spezifische Ausführungsformen betreffen.

Beispiel 1

4-Cyano-1-[2,3-(di-n-decyloxy)-n-propyl]-4-phenyl-piperidin

20 g = 0,0189 mol 1,2-(Di-O-n-decyl)-3-O-(p-tosyl)-glyzerin, hergestellt aus 1,2-Di-O-(n-decyl)-glyzerinchlorid, sowie 4,5 g = 0,024 mol 4-Cyano-4-phenylpiperidin wurden zusammengegeben und 20 Minuten auf 180°C erhitzt. Es wurden 50 ml Wasser und 100 ml Äther zu dem abgekühlten Produkt zugesetzt. Die Ätherschicht wurde isoliert und mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung (2 x 100 ml), 1N Salzsäure (100 ml), Wasser (2 x 100 ml), gesättigter Natriumbicarbonatlösung (100 ml) und Wasser (100 ml) gewaschen. Die Ätherlösung wurde dann über Magnesiumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle behandelt, filtriert und zu 10 g eines Öles eingeeengt. Das Öl wurde auf Kieselerdegel absorbiert, dieses wurde dann mit Hexan (3 x 200 ml), Toluol (3 x 200 ml), Chloroform (3 x 200 ml) und Äthylacetat (3 x 200 ml) gewaschen. Die Äthylacetatfraktionen wurden eingeeengt, wobei die reine Cyanoverbindung in Form eines Öles erhalten wurde.  
IR-Spektrum (Reinsubstanz) 2220 cm<sup>-1</sup>.

Beispiel 2

4-Aminoäthyl-1-[2,3-(di-n-decyloxy)-n-propyl]-4-phenyl-piperidin

1,2 g = 0,0022 mol des in Beispiel 1 hergestellten Nitrils wurden in 50 ml Äthanol aufgelöst und die Lösung wurde dann mit Ammoniakgas gesättigt, Diese Lösung wurde bei einem Druck von 345 kPa während 3 Stunden unter Verwendung von 0,7 g Raney-Nickel als Katalysator hydriert. Nach dem Abschluß der Reduktion wurde das Gemisch filtriert, und das Filtrat wurde unter vermindertem Druck zu 1,1 g eines Öles eingeeengt. Dieses wurde über Kieselerde gel unter Elution mit Benzol:Äthanol chromatografiert, in das Hydrochloridsalz umgewandelt und aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei 0,32 g (Ausbeute 24 %) des reinen Hydrochlorides mit F. 138-140°C erhalten wurden.

Analyse auf  $C_{35}H_{64}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot 3/4H_2O$ :

berechnet: C = 66,59 H = 10,78 N = 4,44 %

gefunden: C = 66,46 H = 10,56 N = 4,43 %

### Beispiel 3

4-Cyano-1-[2,3-(di-n-hexadecyloxy)-n-propyl]-4-phenylpiperidin

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(p-tosyl)-glyzerin wurde durch Umsetzung von 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-glyzerin mit p-Toluolsulfonylchlorid hergestellt. Die Reinigung wurde durch Umkristallisation aus Äthylacetat durchgeführt. F. 53-55°C; IR-Spektrum ( $CHCl_3$ ) 1360 und 1180  $cm^{-1}$

Ein Gemisch aus 6,96 g = 10 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(p-tosyl)-glyzerin, 2,23 g = 10 mmol 4-Cyano-4-phenylpiperidinhydrochlorid, 2 ml Triäthylamin und 40 ml N,N-Dimethylformamid wurde 1t Stunden bei 95°C bis 100°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann abgekühlt, mit 200 ml Wasser verdünnt und mit Äthylacetat (3 x 150 ml) extrahiert. Der

vereinigte Äthylacetatextrakt wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zu 6 g eines Öles eingedampft. Dieses Öl wurde durch Säulenchromatografie unter Elution mit Benzol:Äthylacetat chromatografiert.  
Öl; IR-Spektrum ( $\text{CHCl}_3$ )  $2220 \text{ cm}^{-1}$ .

#### Beispiel 4

#### 4-Aminomethyl-1-2,3-(di-n-hexadecyloxy)-n-propyl-4-phenylpiperidin-dihydrochlorid

Eine Lösung von 2,5 g = 3,6 mmol 4-Cyano-1-2,3-(di-n-hexadecyloxy)-n-propyl-4-phenylpiperidin in 100 ml Äther wurde mit 0,4 g = 10,5 mmol Lithiumaluminiumhydrid behandelt, und das erhaltene Gemisch wurde 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde vorsichtig mit 100 ml Wasser behandelt und mit Äther (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zu einem Öl eingedampft. Dieses Öl wurde mittels Kieselerdegelchromatografie unter Elution mit Benzol:Äthanol gereinigt und dann in Chloroform aufgelöst. Diese Lösung wurde mit Chlorwasserstoffgas behandelt und dann im Vakuum unter Bildung eines Feststoffes eingedampft. Dieser Feststoff wurde auf Äthylacetat umkristallisiert, wobei 1,1 g Feststoff mit einer Ausbeute von 40 %, der etwa  $4/4 \text{ mol H}_2\text{O}$  pro mol der Verbindung enthielt, erhalten wurden.

F.  $132 - 134^\circ\text{C}$ .

#### Elementaranalyse:

berechnet: C = 70,60 H = 11,53 N = 3,50 %

gefunden: C = 70,74 H = 11,34 N = 3,40 %

Beispiel 5

Unter Befolgung der Arbeitsweise der Beispiele 1 bis 4 wurden Verbindungen der Formel (XII) hergestellt:

| $R_3, R_4$     | F. (°C)    | Molekülformel                                 | berechnet (%)                | gefunden (%)                 |
|----------------|------------|---|------------------------------|------------------------------|
| $C_{16}H_{33}$ | 40-42      | $C_{47}H_{88}O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$        | C 73,53<br>H 11,94<br>N 3,64 | C 73,77<br>H 11,77<br>N 3,85 |
| $C_{18}H_{37}$ | 115-117    | $C_{51}H_{96}O_2 \cdot 2HCl$                  | C 71,95<br>H 11,60<br>N 3,29 | C 71,67<br>H 11,19<br>N 3,38 |
| $C_{14}H_{29}$ | 140-142    | $C_{43}H_{80}O_2N_2 \cdot 2HCl$               | C 69,46<br>H 11,25<br>N 3,75 | C 69,45<br>H 11,00<br>N 3,45 |
| $C_8H_{17}$    | 176-178(d) | $C_{31}H_{56}O_2N_2 \cdot 2HCl \cdot 1/2H_2O$ | C 65,24<br>H 10,42<br>N 4,90 | C 65,27<br>H 9,90<br>N 4,95  |

sowie der Formel (XIII):

| $R_3R_4$       | F. (°C) | Molekülformel                                 | berechnet (%)                | gefunden (%)                 |
|----------------|---------|---|------------------------------|------------------------------|
| $C_{10}H_{21}$ | 190-192 | $C_{35}H_{64}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot 3/4H_2O$ | C 66,58<br>H 10,78<br>N 4,43 | C 66,70<br>H 10,20<br>N 4,27 |

In vergleichbarer Weise können weitere Verbindungen gemäß der Erfindung aus dem geeigneten 1,2- oder 1,3-(Di-n-O-alkyl)-glyzerin über die Tosylderivate hergestellt werden.

Beispiel 6

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glycerin

1,056 g = 0,022 mol Natriumhydrid als 50 %ige Dispersion in Mineralöl wurden zu einer Lösung von 1,2-Di-O-n-hexadecylglyzerin in 150 ml Tetrahydrofuran zugesetzt und 20 Minuten unter Stickstoff gerührt. Es wurden 4,0 g = 0,020 mol m-Cyanobenzylbromid zu dem Gemisch hinzugegeben und bei Zimmertemperatur über Nacht reagieren gelassen. Dann wurden vorsichtig 200 ml Wasser zugesetzt, und das wäßrige Gemisch wurde mit Äthylacetat (3 x 150 ml) extrahiert. Die Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei 12 g eines Öles erhalten wurden. Dieses Öl wurde über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol/Hexan (8/2) chromatografiert, wobei 8,0 g reines 1,2-Di-O-n-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glycerin in Form eines Öles erhalten wurden. IR-Spektrum ( $\text{CHCl}_3$ )  $2230 \text{ cm}^{-1}$ .

Beispiel 7

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-formylbenzyl)-glycerin

5,0 g = 7,6 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glycerin wurden mit 1,17 g = 0,2 mmol Diisobutylaluminiumhydrid in 25 ml Benzol unter einer Stickstoffatmosphäre 16 Stunden bei Umgebungstemperatur reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 4,22 ml Methanol und 2,5 ml Wasser behandelt und 30 Minuten gerührt, bis alles nicht umgesetzte Hydrid zersetzt war. Das Gemisch wurde filtriert, mit Benzol (3 x 25 ml) extrahiert, und die vereinigten Benzolextrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck eingeeengt. Das erhaltene Öl wurde mittels Kieselerdegelchromatografie unter Elution mit Benzol

gereinigt, wobei reines 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-formalbenzyl)-glyzerin mit einer Ausbeute von 40 % als Öl erhalten wurde.

IR-Spektrum ( $\text{CHCl}_3$ )  $1700\text{ cm}^{-1}$ ;

NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,1 (s, 1, ArCHO)

#### Beispiel 8

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[3-(1,2-epoxyäthyl)-benzyl]-glyzerin

3,23 g = 0,067 mol Natriumhydrid in Form einer 57 %igen Dispersion in Mineralöl wurden in 117 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und auf 70 bis 75°C unter einer Stickstoffatmosphäre für etwa 45 Minuten erwärmt, bis die Wasserstoffentwicklung aufhörte. Es wurden 88 ml Tetrahydrofuran zugegeben, und das Gemisch wurde auf 0 bis 5°C abgekühlt. Dann wurden 13,67 g = 0,067 mol Trimethylsulfoniumjodid in Portionen zugegeben, hieran schloß sich die rasche Zugabe von 7,0 g = 0,0106 mol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-formylbenzyl)-glyzerin in 58 ml Tetrahydrofuran an. Das Gemisch wurde dann bei Zimmertemperatur 16 Stunden gerührt, in 200 ml Wasser gegossen und mit Äther (3 x 180 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit Wasser (2 x 100 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (100 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck zu 7,0 g eines blaßgelben Öles eingeeengt; Ausbeute 98 %. Dieses Öl war nach der Dünnschichtchromatografie ausreichend rein für die weitere Reaktion, die in Beispiel 9 beschrieben ist.



Beispiel 9

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[3-(1-hydroxy-2-t-butylamino-äthyl)-benzyl]-glyzerin-hydrochlorid

30 ml t-Butylamin und 2,0 g = 2,97 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[3-(1,2-epoxyäthyl)-benzyl]-glyzerin wurden in eine Stahlbombe eingefüllt und 9 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde das t-Butylamin unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Öl wurde mittels Kieselerdegelchromatografie unter Elution mit Benzol/Äthanol gereinigt. Die gewünschten Fraktionen wurden mit gasförmiger Chlorwasserstoffsäure gesättigt, unter vermindertem Druck eingeengt und aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei 630 mg (Ausbeute 27%) reines 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-[3-(1-hydroxy-2-t-butylaminoäthyl)-benzyl]-glyzerin mit F. 49 - 51°C erhalten wurden. NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,47 (s, 9, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ).

Beispiel 10

1,3-Di-O-(n-decyl)-2-O-[3-(1-hydroxy-2-äthylaminoäthyl)-benzyl]-glyzerin-hydrochlorid

30 ml Äthylamin und 2,018 g = 4,13 mmol 1,3-Di-O-(n-decyl)-2-O-[3-(1,2-epoxyäthyl)-benzyl]-glyzerin wurden in eine Stahlbombe eingefüllt und 16 Stunden bei 965 kPa erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch aus der Bombe mit Äther herausgewaschen, und das Produkt wurde durch Entfernung des Lösungsmittels und überschüssigen Äthylamins unter vermindertem Druck isoliert.

Das erhaltene Öl, 2,4 g, wurde dann in Äther aufgelöst, mit 2 %iger wäßriger Ammoniumhydroxidlösung, Wasser und gesättigter wäßriger Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet und zu 1,8 g eines gelben Öles eingeengt. Das Produkt wurde mittels Kieselerdegelchromatografie unter Elution mit Toluol/

Äthanol = 12/1 gereinigt und in das Hydrochloridsalz umgewandelt. Es wurden 0,794 g Produkt mit einer Ausbeute von 33 % und F. 55 - 57°C erhalten.

NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,87 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>); 1,3 (s, 32H, aliphatische Protonen); 1,45 (1, J=7Hz, 3H, -NHCH<sub>3</sub>); 3,15 (q, J=7Hz, 2H, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,45 -3,58 (m, 11H, (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CHOR, CHOHCH<sub>2</sub>NH-); 4,65 (s, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>O-); 5,17-5,50 (m, 1H, Ar-CHOH-) und 7,33 (s, 4H, Ar-H).

### Beispiel 11

Unter Befolgung der Arbeitsweisen der Beispiele 6 bis 10 wurden die Verbindungen der Formeln (XIV) und (XV) hergestellt:

Formel (XIV):

| R                                 | -OC <sub>16</sub> H <sub>33</sub><br>Stellung | F. (°C) | Molekülformel  |
|-----------------------------------|---|---------|--|
| CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 2,3   | 53-55   | C <sub>47</sub> H <sub>89</sub> O <sub>4</sub> N.HCl.3/4H <sub>2</sub> O<br>berechn. C, 72,17; H, 11,79; N, 1,79<br>gefunden C, 72,11; H, 11,55; N, 1,92 |
| C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>  | 1,3   | 43-45   | C <sub>48</sub> H <sub>91</sub> O <sub>4</sub> .HCl.H <sub>2</sub> O<br>berechn. C, 71,99; H, 11,82; N, 1,75<br>gefunden C, 72,06; H, 11,43; N, 1,71     |
| CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | Ö1  | Ö1      | C <sub>39</sub> H <sub>73</sub> O <sub>4</sub> N.HCl.1/2H <sub>2</sub> O<br>berechn. C, 70,39; H, 10,21; N, 2,10<br>gefunden C, 70,36; H, 10,77; N, 2,22 |
| CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   |   | 64-65   | C <sub>38</sub> H <sub>71</sub> O <sub>4</sub> .HCl<br>berechn. C, 71,04; H, 11,14; N, 2,18<br>gefunden C, 71,04; H, 10,99; N, 2,08                      |

In ähnlicher Weise können weitere der erfindungsgemäßen Verbindungen aus dem geeigneten Epoxid und Amin hergestellt werden.

### Beispiel 12

#### Sarcom-180J-Modell für die Bestimmung der Tumorzurückweisung

6 weibliche CD-1-Mäuse von 20 bis 25 g pro Gruppe erhielten 10<sup>6</sup> Zellen von S-180J, welche 5 bis 8 Tage alt waren durch intraperitoneale Applikation. Am folgenden Tag auf die Tumoreinimpfung erhielten die Mäuse 0,1 ml der in einem Fettemulsionsträger (Bezeichnung Intralipid von Cutter Laboratories) formulierten Testverbindung in der gewünschten Dosis, und die Tiere wurden dann bis zum Eintritt des Todes oder für längstens 40 Tage beobachtet. Die Ergebnisse sind als erhöhte prozentuale Lebensspanne (%ILS) entsprechend der folgenden Definition angegeben:

$$\%ILS = \frac{\text{Mittlere Überlebenszeit der mit Wirkstoff behandelten Mäuse}}{\text{Mittlere Überlebenszeit der nicht behandelten Kontrollmäuse}} \times 100$$

Die bei dem zuvor beschriebenen Test erzielten Ergebnisse waren wie folgt:

Tabelle I (Formel XVI)

| $R_3, R_4$                        | <u>%ILS</u>   |          |          |           |
|-----------------------------------|---------------|----------|----------|-----------|
|                                   | Dosis (mg/kg) |          |          |           |
|                                   | <u>0,25</u>   | <u>1</u> | <u>4</u> | <u>16</u> |
| n-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 113           | 109      | 154(1)   | 192(4)    |
| n-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 127           | 139(1)   | 110      | 108       |

Tabelle I (Formel XVI) Forts.

| $R_3, R_4$                        | %ILS          |          |          |           |
|-----------------------------------|---------------|----------|----------|-----------|
|                                   | Dosis (mg/kg) |          |          |           |
| n-C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | <u>0,25</u>   | <u>1</u> | <u>4</u> | <u>16</u> |
|                                   | 129(1)        | 116      | 133      | 109       |
| n-C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | 110           | 105      | 104      | 127       |
| n-C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> | 119           | 158(2)   | 98       | 109       |

Die Ergebnisse im zuvor beschriebenen Test, erhalten mit erfindungsgemäßen (1-Hydroxy-2-alkylaminoäthyl)-benzyloxy-analogen, formuliert in einem Gemisch aus grenzflächenaktivem Stoff (Tween 80)-Glyzerin-Wasser sind in der folgenden Tabelle II zusammengestellt:

Tabelle II (Formel XIV)

| R                                 | -OC <sub>16</sub> H <sub>33</sub><br>Stellung | %ILS          |           |           |
|-----------------------------------|---|---------------|-----------|-----------|
|                                   |   | Dosis (mg/kg) |           |           |
|                                   |   | <u>5</u>      | <u>15</u> | <u>50</u> |
| CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 2,3   | 174(1)        | 135       | 147(1)    |
| C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>  | 2,3   | 166(2)        | 181(4)    | 182(4)    |
| C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>  | 1,3   | 159(1)        | 171(3)    | 157(2)    |

Die Zahlen in Klammern in den zuvor genannten Tabellen I und II sind die Anzahl der Tiere mit einer Überlebenszeit von 40 Tagen.

### Beispiel 13

#### Bestimmung der peritonealen Macrophagenaktivierung

Mäusen wurde intraperitoneal Salzlösung oder die Testverbindung injiziert. Die Macrophagen wurden 72 Stunden später

durch intraperitoneale Injektion von 3ml von 8 % fetalem Kalbsserum-92 % RPMI-1640-Medium (Grand Island Biological Co., N.Y.) ( $1640_{92}$  FCS<sub>8</sub>) plus 5 Einheiten/ml an Heparin geerntet, wobei die Temperatur aller Medien auf 37°C gehalten wurde, 1 bis 2 Minuten gespült, geöffnet und die gesamte peritoneale Flüssigkeit wurde mit einer sterilen, mit Silikon überzogenen Pipette in ein 50-ml-Kunststoffrohr, das in Eis gehalten wurde, abgesaugt. Die Macrophagen wurden unter Verwendung eines Hämocytometers ausgezählt, und auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml mit der  $1640_{92}$ -FCS<sub>8</sub>-Lösung eingestellt. Die Zellen wurden dann in Lochplatten,  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Loch angeordnet und 1 bis 2 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen, und die Zellen wurden einmal mit dem Medium gewaschen, wobei die Macrophagen am Boden der Löcher hafteten. L-1210-Zellen, geerntet aus dem Bauchwasser von DBA-Mäusen ungefähr 5 Tage nach der Impfung, in der Lösung  $1640_{92}$  FCS<sub>8</sub> wurden dann zugesetzt, und zwar 1 ml mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml zu jedem Loch, und bei 37°C für 24 bis 30 Stunden in einer Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid inkubiert. Die Zellen wurden dann mit  $^3\text{H}$ -Tdr (1,0 Ci/ml; Amersham/Searles) für 6 Stunden bei 37°C bestrahlt, die überstehende Flüssigkeit wurde unter Verwendung eines Zellenerntegerätes, Reeve-Angel-Filter, abgesaugt und fünfmal mit Salzlösung gewaschen. Die Filterscheiben wurden trocknen gelassen und in Szintillationsbehältern mit LSC-Szintillationsflüssigkeit (5,0 g PPO und 0,2 g POPOP/Liter Toluol; Yorktown Research) angeordnet. Das Auszählen wurde während 2 Minuten unter Verwendung eines Beckman-LS-250-Zählers durchgeführt. Die bei dieser Arbeitsweise erhaltenen Ergebnisse waren wie folgt:

Tabelle III (Formel XVI)

| $R_3R_4$         | Dosis (mg/kg) | % Hemmung der<br>DNA-Synthese |
|------------------|---------------|-------------------------------|
| $n-C_{10}H_{21}$ | 1,25          | 76                            |
| $n-C_{10}H_{21}$ | 0,625         | 94                            |
| $n-C_{10}H_{21}$ | 0,313         | 56                            |
| $n-C_{14}H_{29}$ | 25            | 90                            |

Beispiel 14

Bestimmung der peripheren Blutmonocytenaktivierung

Ratten wurde intravenös die Testverbindung oder Salzlösung bei den Kontrolltieren injiziert. Die Monocyten wurden 72 Stunden später durch Abziehen von 2 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen und Verdünnen mit 2 ml Salzlösung geerntet. Die erhaltene Lösung wurde sorgfältig mit 3 ml LSM (lymphocyten-Trennmedium - Bionetics) überschichtet und bei 800 Upm für 40 Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Zum Sammeln der getrübbten, zentralen Schicht, welche die Monocyten und die Lymphocyten enthielt, wurde eine Pipette verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit Hanks-Gleichgewichts-Salzlösung gewaschen, erneut in der Lösung  $1640_{92}^{82}FCS_8$  suspendiert, in Lochplatten angeordnet und bei  $37^{\circ}C$  in 50 Kohlendioxid für 1,5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann kräftig mit dem Medium zur Entfernung von nicht-anhaftenden Zellen gewaschen. Die zurückbleibenden Monocyten wurden wieder mit dem Medium versetzt, und es wurden Ll210-Zellen bei einem Verhältnis von wirksamen Zellen:Zielzellen von 15:1 zugesetzt. Unter Befolgung der in Beispiel 13 beschriebenen Arbeitsweise wurden die Zellen mit  $^3H$ -Tdr gepulst und in einem Szintillationszähler ausgezählt.

Unter Anwendung dieser Arbeitsweise ergaben 1,25 mg/kg an 4-Aminomethyl-1-[2,3-(di-n-decyloxy)-n-propyl]-4-phenylpiperidin eine 8 %ige Hemmung der DNA-Synthese.

#### Beispiel 15

#### Test auf Vaccineverbesserung-Hämagglutinationshemmung

Influenzavirus tritt mit roten Blutzellen unter Herbeiführung einer Agglutination in Wechselwirkung. Falls Antivirus-Antikörper in einer Serumprobe vorliegen, werden die Wechselwirkungen von Virus-roten-Zellen, welche zur Agglutination führen, verhindert. Daher zeigt das Fehlen einer Agglutination von roten Blutzellen die Anwesenheit von Antivirus-Antikörpern an, und die Bestimmung des Hämagglutinationstiters, wie sie im folgenden noch beschrieben wird, ist daher ein Maß für den Gehalt an Antikörper.

Die Testverbindungen bei den gewünschten Dosierungswerten wurden durch Auflösung in 0,3 ml Äthanol formuliert, hieran schloß sich die Zugabe von 0,1 ml grenzflächenaktivem Mittel (Tween 80) an, und das erhaltene Gemisch wurde zu 4,6 ml eines Fettemulsionsträgers (Intralipid von Cutters Laboratories) zugesetzt. Entsprechende Träger ohne Testverbindung wurden ebenfalls hergestellt. Fluogen-Influenzavirus (Parke-Davis and Co.) wurde mit jedem Träger vermischt, um 250 CCA Antigen pro 0,5 ml Injektionsvolumen zu erhalten. Eine Gruppe von weiblichen Hartley-Meerschweinchen (Camm Laboratories) erhielten eine intramuskuläre Injektion mit 0,5 ml des das Fluogen und die Testverbindung enthaltenden Trägers. Eine Kontrollgruppe von Meerschweinchen erhielt eine Injektion mit das Fluogen jedoch keine Testverbindung enthaltenden Träger. 30 Tage nach der primären Sensibilisierung wurden den Tieren eine weitere intramuskuläre Injektion des homologen Antigens, mit welchem sie zu Beginn immunisiert wurden, gegeben. Den Tieren wurde durch intra-

cardiale Punktur mehrere Male nach der primären Sensibilisierung Blut abgenommen. Das Serum wurde unter Anwendung eines CORVAC-integrierten Serumentrennrohrs (Corning Glass Works) abgetrennt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Tritation nach dem Hämagglutinationstest entsprechend der folgenden Beschreibung aufbewahrt.

Testseren, behandelt mit 0,01M Kaliumjodat zur Entfernung von nicht-spezifischen Serumfaktoren, welche die Agglutination hemmen, wurden in zweifachen Reihenverdünnungen in 0,025 ml Volumina in Mikrotiter-Löcher (Linbro Scientific Company, New Haven, Conn., Typ IS-MRC-96), welche 0,025 ml an 0,01M Phosphat gepufferter physiologischer Salzlösung = PBS enthielten, bei pH = 7,2 verteilt. Die Testvirussuspension, welche HA-4-Einheiten pro 0,025 ml PBS enthielt, wurde zu jedem Loch zugesetzt. Zellen (nur PBS) und Antigenkontrollen (PBS und Virusantigen) waren eingeschlossen. Nach dem Inkubieren der Platten bei Zimmertemperatur für 30 Minuten wurden 0,05 ml an mit 0,5 %iger Salzlösung gewaschenen Hühnererythrocyten (Flow Laboratories, Rockville, Md.) in jedes Loch eingegeben. Die Inkubation wurde fortgeführt, bis die Zellkontrolle ein normales Absetzen zeigte. Die mit Perjodat behandelten Seren aus normalen Meerschweinchen waren eingeschlossen, um den Pegel an nicht-spezifischer Agglutinationsinhibierung, welcher bei den mit Kaliumjodat behandelten Testseren zurückblieb, zu bestimmen. Der Titerwert der Hämagglutinationshemmung wurde in Form der höchsten Verdünnung an Serum definiert, welche eine Hämagglutination vollständig hemmte, berichtigt für nicht-spezifische Hemmung.

Die bei den Tests von 4-Aminomethyl-1- $\beta$ -2,3-(di-n-decyloxy)-n-propyl-7-4-phenylpiperidin erhaltenden Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle IV zusammengestellt. Der höhere Hämagglutinationstiter, welcher nach der erneuten intramuskulären Injektion bei solchen Tieren, bei denen die Testver-



bindung appliziert wurde, beobachtet wurde, zeigt die Aktivität der Verbindungen als Hilfsstoff.

Tabelle IV

| Antigen                    | Hämagglutinationstiter |                  |     |      |
|----------------------------|------------------------|------------------|-----|------|
| appliziert am Tag:         | 15 <sup>*</sup>        | 30 <sup>**</sup> | 44  | 75   |
|                            | 0                      | 0                | 40  | 40   |
|                            | 0                      | 0                | 160 | 80   |
|                            | 0                      | 0                | 40  | 10   |
| Fluogen                    | 10                     | 0                | 80  | 10   |
|                            | 10                     | 0                | 80  | 80   |
|                            | 10                     | 0                | 160 | 160  |
|                            | 10                     | 10               | 80  | 1280 |
|                            | 10                     | 10               | 640 | 2560 |
|                            | 10                     | 40               | 640 | 1280 |
| Fluogen und 4-Aminomethyl- | 0                      | 10               | 640 | 1280 |
| 1-[2,3-(di-n-decyloxy)-n-  | 0                      | 20               | 640 | 160  |
| propyl-7-4-phenylpiperidin | 10                     | 10               | 10  | 20   |
| (5 mg)                     | 0                      | 10               | 40  | 10   |
|                            | 10                     | 10               | 10  | 10   |
|                            | 10                     | 0                | 10  | 10   |
|                            | 0                      | 0                | -   | -    |

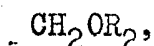
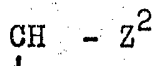
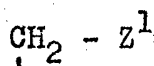
\* Tag nach der primären Sensibilisierung  
 \*\* erneute intramuskuläre Injektion des Homologen-  
 Antigens 30 Tage nach der primären Sensibilisierung.

Die Ergebnisse sind die bei jedem Tier in den jeweiligen Gruppen beobachteten Ergebnisse.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel (XVII) und der pharmazeutisch verträglichen Säureadditionssalze davon, worin einer der Reste  $Y^1$  und  $Y^2$  die allgemeine Formel (VII) hat und der andere  $OR_1$  ist, wobei mit  $R_1$  und  $R_2$  jeweils ein n-Alkylrest mit 8 bis 11 Kohlenstoffatomen bezeichnet ist, gekennzeichnet dadurch, daß man

a) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin einer der Reste  $Z^1$  und  $Z^2$  die Formel (XIX) aufweist und der andere  $OR_1$  ist, reduziert und

- b) falls gewünscht, die erhaltene Verbindung in ein pharmazeutisch verträgliches Säureadditionssalz umwandelt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als Reduktionsmittel Raney-Nickel und Wasserstoff verwendet werden.
  3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß  $R_1$  und  $R_2$  jeweils ein n-Decylrest ist.

Hierzu 3 Seiten Formeln

