

207 370 -1-

Verfahren zur Herstellung von Aminderivaten von Glyzerin
und Propandiolen

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Aminderivaten von Di-O-(n-höheren-alkyl und -alkenyl)-glyzerinen und -propandiolen sowie deren pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzen, welche zur Bekämpfung von Vireninfektionen bei Säugetieren vorteilhaft sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Virusinfektionen, welche Säugetiere einschließlich Menschen befallen, sind normalerweise ansteckende Krankheiten, die große menschliche Leiden und wirtschaftlichen Verlust bedingen. Unglücklicherweise ist das Auffinden von Verbindungen mit Antivirusaktivität sehr viel komplizierter und

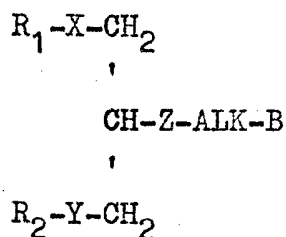
schwieriger als das Auffinden von antibakteriellen Mitteln und Antipilzmitteln. Dies ist teilweise der engen Strukturähnlichkeit von Viren mit der Struktur von bestimmten, essentiellen Zellbestandteilen wie Ribonuclein- und Deoxyribonucleinsäuren zuzuschreiben. Dennoch sind zahlreiche, nicht zu den Viren gehörige, "Antivirenmittel" in der Literatur beschrieben, d.h. Substanzen, welche "entweder einen schützenden oder therapeutischen Effekt bis zum klar nachweisbaren Vorteil bei dem mit Viren befallenen Gast bilden können, oder es handelt sich um irgendwelche Materialien, welche in signifikanter Weise die Antikörperbildung fördern, die Antikörperaktivität verbessern, die nicht-spezifische Resistenz verbessern, die Konvaleszenz beschleunigen oder Symptome unterdrücken", siehe Herman et al., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103 (1960), 625. Die Liste der angegebenen Antivirenmittel umfaßt - um einige wenige aufzuzählen - Interferon und synthetische Materialien wie Amantadinhydrochlorid, Pyrimidine, Biguanide, Guanidin, Pteridine und Methisazon. Wegen des ziemlich engen Bereiches von Vireninfektionen, welche durch jedes dieser derzeit im Handel erhältlichen Antivirenmittel behandelt werden kann, sind neue synthetische Antivirenmittel als potentiell wertvolle Ergänzungen der "Waffen" der medizinischen Technologie willkommen.

Die Zellen von Säugetieren bilden als Ansprechen auf Virusinfektionen eine Substanz, welche es den Zellen möglich macht, der Vermehrung einer Vielzahl von Viren zu widerstehen. Diese Viren resistierenden oder Viren störenden Substanzen werden als "Interferone" bezeichnet. Die Interferone sind Glycoproteine, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften verschieden sein können, welche jedoch alle die gleichen biologischen Eigenschaften zeigen, nämlich daß sie einen großen Bereich von nicht miteinander verwandten Viren hemmen, daß sie keine toxischen oder anderen schädlichen Effekte auf Zellen besitzen und daß sie artspe-

zifisch sind, siehe Lockart, Frontiers of Biology, Vol. 2, "Interferons", herausgegeben von Finter, W. B. Saunders Co., Philadelphia (1966), S. 19/20.

Bislang wurde jedoch noch keine praktische, wirtschaftliche Methode zur Herstellung von exogenem Interferon für die routinemäßige, klinische Anwendung gegen Vireninfektionen entwickelt. Eine alternative Annäherung zur Bildung von Interferon wurde daher verfolgt, wobei diese die Applikation einer "Nichtvirens substanz" bei dem zu schützenden oder zu behandelnden Säugetier umfaßt, welche die Bildung von Interferon in den Zellen stimuliert oder induziert. Das auf diese Weise gebildete Interferon wird als "endogenes" Interferon bezeichnet.

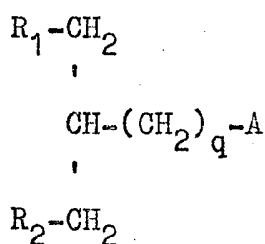
In der US-Patentschrift 2 738 351 ist angegeben, daß Verbindungen der folgenden allgemeinen Formel



worin jeder der Reste R_1 und R_2 ein Alkyl-, Aalkyl-, Aryl-, Cycloalkyl-, nitrosubstituierter Aryl-, halogensubstituierter Aryl-, alkylsubstituierter Aryl- oder alkoxysubstituierter Aryl-Rest ist, jeder der Reste X, Y und Z Sauerstoff, Schwefel oder Sulfonyl sein kann, ALK ein geradkettiger oder verzweigt-kettiger Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist und B Di(nieder)-alkylamino, Piperidino, Morpholino, Pyrrolidino, (Niederalkyl)-pyrrolidino, N'-Alkyl-piperazino oder Pipecolino sein kann, Mittel zur lokalen Anaesthetie sind. Weiterhin werden alternative synthetische Wege in Spalte 1, Zeilen 57-70 dieser US-Patentschrift diskutiert und Zwischenprodukte der oben angegebenen Formel genannt,

worin B. Amino und (Niederalkyl)-amino ist. Jedoch enthält keine der spezifisch angegebenen Verbindungen dieser US-Patentschrift einen R_1 - oder R_2 -Alkylrest höher als n-Pentyl. Weiterhin sind in keiner dieser Verbindungen die beiden Reste R_1 und R_2 Alkyl und beide Reste X und Y Sauerstoff.

Verbindungen mit Wirkung als Insektizide und Mitizide (Milbenvertilgungsmittel) der folgenden Formel

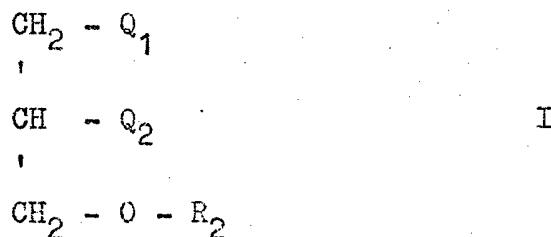


worin R_1 und R_2 unter anderem jeweils Niederalkylthio sein können, $q = 0$ bis 5 ist und A u.a. ein 1-Piperidino oder Di(niederalkyl)-amino sein kann, sind in dem japanischen Patent J7-6042-177 beschrieben.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

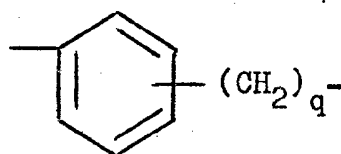
Es wurde nun gefunden, daß bestimmte, neue Amin- und Amidinderivate von Di-O-(n-höheren-alkyl und -alkenyl)-glyzerinen und -propandiolen in der Lage sind, Vireninfektionen bei Säugetieren zu bekämpfen.

Die neuen, erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen die Formel:



und der pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze davon, worin Q_1 und Q_2 entweder $-O-Y-NHR_3$ oder $-O-R_1$, jedoch verschieden sind worin bedeuten:

R_1 und R_2 einen n-Alkylrest mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen oder einen n-Alkenylrest mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen, welcher keine Doppelbindung in der 1-Stellung aufweist; Y einen Alkylenrest mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen, wobei die zwei Wertigkeiten an unterschiedlichen Kohlenstoffatomen vorliegen, einen ortho-, meta- oder para-Phenylendimethylenrest



worin q eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und die übriggebliebene Bindung an O gebunden ist,

R_3 ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen darstellt.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Säureadditionssalze der neuen antiviralen Verbindungen der Formel (I).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen zeigen eine Antivirenaktivität gegenüber einer großen Vielzahl von Viren in vivo bei Säugetieren und in vitro bei Kulturen aus Säugetiergewebe. Wenigstens ein wesentlicher Anteil dieser Aktivität ergibt sich aus der Fähigkeit dieser Verbindungen zur Induktion der Bildung von Interferon in den Zellen, d.h. von endogenem Interferon.

Unter "pharmazeutisch annehmbaren" Säureadditionssalzen sind solche Salze zu verstehen, welche bei den applizierten Dosierungen nicht toxisch sind. Die pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze, welche eingesetzt werden

können, umfassen solche wasserlöslichen und wasserunlöslichen Salze wie Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Acetat-, Hexafluorophosphat-, Citrat-, Gluconat-, Benzoat-, Propionat-, Butyrat-, Sulfosalicylat-, Maleat-, Laurat-, Malat-, Fumarat-, Succinat-, Oxalat-, Tartrat-, Amsonat-(4,4'-Diamino-stilben-2,2'-disulfonat), Pamoat-(1,1'-Methylen-bis-2-hydroxy-3-naphthoat), Stearat-, 3-Hydroxy-2-naphthoat-, p-Toluolsulfonat-, Methansulfonat-, Lactat- und Suramin-salze.

Eine bevorzugte Gruppe von Verbindungen der Formel (I) besteht aus den Hydrochloridsalzen der Basen. Eine andere bevorzugte Gruppe von Verbindungen der Formel I besteht aus Verbindungen, worin R_1 und R_2 jeweils ein n-Alkylrest mit 14 bis 18 Kohlenstoffatomen sind.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von Verbindungen der Formel I besteht aus solchen Verbindungen, worin R_1 und R_2 jeweils ein n-Alkylrest mit 14 bis 18 Kohlenstoffatomen sind und diese die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen aufweisen.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von Verbindungen der Formel I besteht aus solchen Verbindungen, worin R_1 und R_2 jeweils ein n-Hexadecylrest sind.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von erfindungsgemäßen Verbindungen besteht aus solchen Verbindungen der Formeln I worin R_3 ein Wasserstoffatom ist und Y ein geradkettiger Alkylenrest mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen ist.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von Verbindungen der Formel I besteht aus solchen Verbindungen, worin R_3 ein Wasserstoffatom ist und Y ein ortho-, meta- oder para-Phenylen-dimethylenrest ist.

Besonders wertvoll sind die folgenden Verbindungen und ihre pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze:

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-aminopropyl)-glyzerin

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glyzerin

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glyzerin
1,2-Di-O-(n-tetradecyl)-3-O-(meta-aminomethylbenzyl)-glyzerin
1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(meta-aminomethylphenyl)-glyzerin
1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(para-aminomethylphenyl)-glyzerin
1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(para-aminomethylphenyl)-glyzerin.

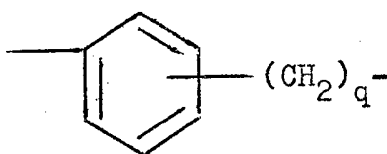
Die Verbindungen der Formel I können aus dem geeigneten 1,2-Di-O-(n-höheren-alkyl oder -alkenyl)-glyzerin und 1,3-Di-O-(n-höheren-alkyl oder -alkenyl)-glyzerin als Ausgangsmaterialien nach dem Fachmann an sich bekannten Methoden hergestellt werden. Beispielsweise können hergestellt werden:

- a) Verbindungen, worin $R_3 = H$ und $Y = 3$ -Propylen sind, durch Kondensation des Ausgangsmaterials mit Acrylnitril in wäßriger Lösung unter stark basischen Bedingungen unter Bildung des 2-Cyanoäthylderivates, das dann hydriert wird;
- b) Verbindungen, worin $R_3 = H$ und $Y = 4$ -Butylen sind, durch Hinzufügung eines Allylrestes an das Ausgangsmaterial durch Umsetzung hiervon mit einem Allylhalogenid unter stark basischen Bedingungen, Hydroborierung des Allylderivates, Oxidation des erhaltenen Zwischenproduktes mit Wasserstoffperoxid in basischer, wäßriger Lösung zu dem 3-Hydroxypropylderivat, Umsetzung des 3-Hydroxypropylderivates mit einem Sulfonylchlorid, RSO_2Cl , z.B. p-Toluolsulfonylchlorid, unter basischen Bedingungen zur Bildung des entsprechenden Sulfonatesters, z.B. des Tosylates, Substitution einer Cyanogruppe für die RSO_3 -Gruppe durch Umsetzung mit Natriumcyanid und anschließendes Reduzieren des erhaltenen 3-Cyanopropylderivates;
- c) Verbindungen, worin $m = 1$, $R_3 = H$ und $Y = 2$ -Propylen sind, unter Befolgung der Arbeitsweise (b) bis einschließlich der Wasserstoffperoxidoxidationsstufe, Iso-

lation des 2-Hydroxypropyloxidations-Nebenproduktes und dann Durchführung der restlichen Stufen der Arbeitsweise (b) unter Verwendung von Natriumazid anstelle von Natriumcyanid an dem 2-Hydroxypropylderivat;

d) Verbindungen, worin $R_3 = H$ und $Y = \text{Phenylendimethylen}$ sind, durch Umsetzung des Ausgangsmaterials mit einem Cyanobenzylhalogenid unter stark basischen Bedingungen und anschließende Reduktion des erhaltenen Cyanobenzylderivates mit einem Hydridreagens wie Lithiumaluminiumhydrid;

e) Verbindungen, worin $R_3 = H$, Y der Rest



und $q = \text{eine ganze Zahl von 1 bis 3}$ sind, durch Umsetzung des Ausgangsmaterials mit einem Sulfonylchlorid, RSO_2Cl , z.B. p-Toluolsulfonylchlorid, unter basischen Bedingungen unter Bildung des entsprechenden Sulfonatesters, z. B. des Tosylates, von Di-O-(n-höherem-alkyl oder -alkenyl)-glyzerin Substitution einer Cyanophenoxy- oder ω -Cyanoalkylphenoxygruppe für die RSO_3 -Gruppe durch Umsetzung mit z.B. Natriumcyanophenolat und anschließende Hydrierung des erhaltenen Cyanophenyl- oder Cyanoalkylphenylderivates des Di-O-(n-höheren-alkyl oder -alkenyl)-glyzerinausgangsmaterials;

f) Verbindungen, worin $m = 1$, $R_3 = n\text{-Alkyl}$ sind, durch Acylierung der entsprechenden Verbindung, worin $R_3 = H$ ist, mit einem Acylhalogenid unter basischen Bedingungen

gen und anschließende Reduktion des erhaltenen N-Acyl-derivates;

Dem Fachmann auf dem Gebiet ist klar, daß weitere Verbindungen der Formel I unter Anwendung von offensichtlichen Variationen der zuvor aufgeführten Synthesemethoden hergestellt werden können.

Säureadditionssalze der Basen der Formel I können nach konventionellen Arbeitsweisen hergestellt werden, z.B. durch Vermischen der Amin- oder Amidinverbindung in einem geeigneten Lösungsmittel mit der erforderlichen Säure und Gewinnung des Salzes durch Eindampfen oder Ausfällen bei Zugabe eines Nichtlösungsmittels für das Salz. Hydrochloridsalze können in einfacher Weise durch Durchleiten von Chlorwasserstoff durch eine Lösung der Aminverbindung in einem organischen Lösungsmittel hergestellt werden. Wie aus den folgenden Beispielen ersichtlich, besitzen zahlreiche der isolierten Hydrochlorid- oder Dihydrochloridsalze der Basen der Formeln I-V die Neigung, einen beträchtlichen Wassergehalt aufzuweisen. Ob dieses festgestellte, "eingeschlossene" Wasser willkürlich während der Kristallisation eingeschlossen wird oder der Bildung von echten Molekülhydraten entspricht oder wegen des Vorhandenseins irgendeiner anderen Erscheinung vorliegt, ist nicht bekannt. Auf jeden Fall können die "eingeschlossenes" Wasser enthaltenden Salze in wirksamer Weise ohne vorherige Entwässerung formuliert und appliziert werden.

Die 1,2-Di-O-(n-höheren-alkyl)-glyzerinausgangsmaterialien können nach der Methode von M.Kates et al., Biochemistry, 2 (1963), 394 hergestellt werden. Die 1,3-Di-O-(n-höheren-alkyl)-glyzerinausgangsmaterialien können nach der Methode von R. Damico et al., J. Lipid Res., 8 (1967) 63 hergestellt werden. Die 1,2- und 1,3-Di-O-(n-höheren-alkenyl)-glyzerinausgangsmaterialien können nach der Methode von W. J. Bau-

man und H. K. Mangold, J. Org. Chem., 31 (1966) 498 hergestellt werden.

Die Antivirenaktivität der erfindungsgemäßen Verbindungen wurde unter Verwendung von zwei unabhängigen Arbeitsweisen bestimmt. Bei der ersten Arbeitsweise wurde die Testverbindung bei Mäusen auf intraperitonealem Wege 18 bis 24 Stunden vor der Applikation einer lethalen Dosis von Encephalomyocarditisvirus (EMC-Virus) appliziert. Die Überlebenswerte wurden während 10 Tagen nach der Virenapplikation beobachtet und mit den Werten für Tiere, welche keine Substanzbehandlung erhalten hatten, verglichen. Die Arbeitsweise, bei welcher der Wirkstoff 18 bis 24 Stunden vorher gegeben wurde und zwar an einem vollständig verschiedenen Platz von der Virusinjektion, wurde so ausgewählt, daß lokale Effekte zwischen Wirkstoff und Virus ausgeschaltet wurden und nur solche Verbindungen identifiziert wurden, welche ein systematisches Antivirenansprechen ergaben.

Bei der zweiten Arbeitsweise wurden Monoschichten von Nasalpolypzellen von Menschen, welche auf Mikrotiterplatten gezüchtet wurden, mit der Testverbindung etwa 18 Stunden vor der Behandlung mit einer lethalen Dosis von Vesicularstomatitis hervorruhenden Viren (VSV-Viren) behandelt. Die Testverbindung wurde vor der Virusbehandlung von den Monoschichten gewaschen. Kulturflüssigkeit, welche aus den Platten nach einer nach der Virenbehandlung verstrichenen Inkubationsperiode extrahiert worden war, wurde auf die Menge an anfüzierenden Viren, welche in Mikrotiterplatten von L-929-Mäusefibroblasten vorlagen, titriert. Der Vergleich wurde mit den Virenausbeutewerten von Kulturflüssigkeit, die von nichtgeschützten Polypzellen extrahiert worden war, angestellt.

Weiterhin wurden zahlreiche der erfindungsgemäßen Verbindungen auf ihre Fähigkeit untersucht, die bekannte Anti-

virenaktivität von Polyinosin- :Polycytidyl- Säure zu erhöhen. Schließlich wurden bestimmte Verbindungen weiterhin auf ihre Fähigkeit untersucht, zirkulierendes Interferon in Mäusen nach parenteraler Applikation zu induzieren, wobei die von W. W. Hoffman et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 3 (1973), 498-501 beschriebene Arbeitsweise angewandt wurde.

Die parenterale, örtliche oder intranasale Applikation der zuvor beschriebenen Amine bei einem Säugetier vor der Exposition des Säugetiers gegenüber einem infizierenden Virus ergibt eine rasche Resistenz gegenüber dem Virus. Vorzugsweise sollte die Applikation etwa 2 Tage bis etwa 1 Tag vor der Exposition mit dem Virus stattfinden, obwohl dies etwas von der speziellen Aminart und dem besonderen, infizierenden Virus abhängig ist.

Wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen appliziert werden, werden sie am einfachsten und wirksamsten in dispergierter Form in einem annehmbaren Träger appliziert. Unter der Angabe "daß diese Verbindung dispergiert ist" ist zu verstehen, daß die Teilchen Molekülgröße besitzen können und in einer echten Lösung in einem geeigneten Lösungsmittel gehalten werden, oder daß die Teilchen eine kolloidale Größe besitzen können und in einer flüssigen Phase in Form einer Suspension oder einer Emulsion dispergiert sind. Der Ausdruck "dispergiert" bedeutet weiterhin, daß die Teilchen mit einem festen Träger vermischt oder hierin verteilt sein können, so daß die Mischung in Form eines Pulvers oder eines Stäubepulvers vorliegt. Diese Angabe bedeutet ebenfalls, daß Mischungen umfaßt werden, welche zur Verwendung als Sprays geeignet sind, einschließlich Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen der erfindungsgemäßen Mittel.

Bei der parenteralen (subkutanen, intramuskulären, intraperitonealen) Applikation werden die erfindungsgemäßen Ver-

bindung in einer Menge von etwa 1 mg/kg Körpergewicht bis etwa 250 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Der vorteilhafte Bereich beträgt von etwa 5 mg/kg bis etwa 100 mg/kg Körpergewicht und der bevorzugte Bereich von etwa 5 mg bis etwa 50 mg/kg Körpergewicht. Die Dosierung hängt selbstverständlich von dem zu behandelnden Säugetier und der besonderen, eingesetzten Aminverbindung ab, und wird durch das für die Applikation vorgesehen Individuum festgelegt. Im allgemeinen werden zu Beginn kleine Dosismengen unter allmählicher Steigerung der Dosierung eingesetzt, bis der optimale Dosierungswert für den besonderen Patienten, der behandelt werden soll, festgelegt ist.

Für die parenterale Injektion geeignete Träger können entweder wäßrige Träger wie Wasser, isotonische Salzlösung, isotonische Dextroselösung, Ringer-Lösung sein, oder es kann sich um nicht-wäßrige Träger wie fette Öle pflanzlichen Ursprungs (Baumwollsaatöl, Erdnußöl, Maisöl, Sesamöl) oder andere nicht-wäßrige Träger, welche die Wirksamkeit der Präparation nicht stören und in dem verwendeten Volumen oder dem angewandten Verhältnis nicht toxisch sind, handeln, z.B. Glyzerin, Äthanol, Propylenglykol, Sorbit. Zusätzlich können vorteilhafterweise Mittel hergestellt werden, welche für eine zum Zeitpunkt vor der Applikation geeignete Herstellung von Lösungen eingesetzt werden. Solche Mittel können flüssige Verdünnungsmittel wie beispielsweise Propylenglykol, Diäthylcarbonat, Glyzerin, Sorbit enthalten.

Bei Anwendung des intranasalen Applikationsweges gemäß der Erfindung kann jede praktische Methode zum Inkontaktbringen des Antivirumittels mit dem Respirationstrakt des Säugetieres angewandt werden. Effektive Methoden umfassen die Applikation des Mittels durch Intranasaltropfen oder Nasopharyngealtropfen und durch Inhalation bei Abgabe aus einer Vernebelungsapparatur oder als Aerosol. Solche Applikationsmethoden sind in der Praxis wichtig, da sie eine einfa-

che, sichere und wirksame Methode zur Durchführung der Erfindung liefern. Für die intranasale Applikation des Mittels, üblicherweise in einem annehmbaren Träger, ist eine Konzentration des Mittels zwischen 1,0 mg/ml und 100 mg/ml zufriedenstellend. Konzentrationen im Bereich von etwa 30 bis 40 bis 50 mg/ml ermöglichen die Applikation eines geeigneten Volumens an Material.

Für den örtlichen Auftrag werden die Antivirenmittel vorteilhafterweise in einem annehmbaren Träger angewandt, um eine einfache Applikation und eine Kontrolle der Applikation und eine bessere Absorption zu ermöglichen. In diesem Fall sind Konzentrationen im Bereich von etwa 1,0 mg/ml bis etwa 250 mg/ml ebenfalls zufriedenstellend. Im allgemeinen wird bei den zuvor genannten beiden Applikationsmethoden eine Dosis innerhalb des Bereichs von etwa 1,0 mg/kg bis etwa 250 mg/kg Körpergewicht und vorzugsweise von etwa 5,0 mg/kg bis etwa 50 mg/kg Körpergewicht appliziert.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können alleine eingesetzt werden, d.h. ohne andere Arzneimittel, als Mischungen von mehr als einer der hier beschriebenen Verbindungen oder in Kombination mit anderen medizinischen Mitteln wie Analgetika, Anaesthetika, Antiseptika, kongestionsvermindernden Mitteln, Antibiotika, Vaccinen, Puffermitteln und anorganischen Salzen, um die erwünschten pharmakologischen Eigenschaften sicherzustellen. Weiterhin können sie in Kombination mit Hyaluronidase appliziert werden, um eine örtliche Reizung zu vermeiden oder zumindest auf ein Mindestmaß herabzusetzen und um die Absorptionsrate der Verbindung zu erhöhen. Hyaluronidasegehalte von wenigstens etwa 150 (U.S.P.) Einheiten sind in diesem Falle wirksam, obwohl höhere oder geringere Gehalte selbstverständlich auch verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen, welche in Wasser unlöslich sind einschließlich der Verbindungen, die nur eine niedrige und/oder schwierige Löslichkeit in Wasser besitzen, werden für optimale Ergebnisse in Formulierungen appliziert, z.B. als Suspensionen oder Emulsionen, welche die Bildung von Teilchengrößen von weniger als 20 μ m ermöglichen. Die Teilchengröße der Formulierungen beeinflusst ihre biologische Aktivität anscheinend durch die bessere Absorption der aktiven Verbindungen. Bei der Formulierung dieser Verbindungen bzw. Materialien werden verschiedene grenzflächenaktive Mittel und Schutzkolloide verwendet. Geeignete grenzflächenaktive Mittel sind die partiellen Ester von üblichen Fettsäuren wie Laurinsäure, Ölsäure, Stearinsäure mit Hexitanhydriden, die von Sorbit abstammen und die Polyoxyäthylenderivaten solcher Esterprodukte. Solche Produkte sind im Handel erhältlich (Warenbezeichnung "Spans" bzw. "Tweens", erhältlich von ICI United States Inc., Wilmington, Del., USA). Celluloseäther, insbesondere Cellulosemethyläther (Warenbezeichnung Methocel, erhältlich von Dow Chemical Co., Midland, Mich. USA) sind hochwirksam als Schutzkolloide zur Verwendung in Emulsionen, welche die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten.

Die hier beschriebenen, wasserlöslichen Verbindungen werden für optimale Ergebnisse in wäßriger Lösung appliziert. Typischerweise werden sie in einer mit Phosphat gepufferten Salzlösung geben. Die in Wasser unlöslichen Verbindungen werden in Formulierungen des zuvor beschriebenen Typs oder in verschiedenen anderen Formulierungen, wie zuvor beschrieben, appliziert. Dimethylsulfoxid dient als geeigneter Träger für in Wasser unlösliche Verbindungen. Eine repräsentative Formulierung für solche Verbindungen umfaßt das Formulieren von 25 bis 100 mg des gewählten Wirkstoffes als Emulsion durch Schmelzen und Vermischen mit gleichen Teilen Polysorbate 80 und Glyzerin, zu welchem warmes (80 °C) Wasser unter kräftigem Einmischen zugesetzt wird. Natriumchlorid wird

als konzentrierte Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,14 M zugesetzt, und Natriumphosphat, pH = 7, wird bis zu einer Endkonzentration von 0,01 M zugegeben, um beispielsweise die folgende repräsentative Zusammensetzung zu erhalten:

	<u>mg/ml</u>
Wirkstoff	50,0
Polysorbat 80	50,0
Glyzerin	50,0
Monobasisches Natriumphosphat (wasserhaltig)	1,4
Natriumchlorid	7,9
Wasser	<u>842,0</u>
	1.001,3

In bestimmten Fällen, wo ein Verklumpen der Wirkstoffteilchen auftritt, wird eine Ultraschallbehandlung angewandt, um ein homogenes System zu erhalten.

Ausführungsbeispiele:

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerinhydrochlorid

A. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoäthyl)-glyzerin

Ein Gemisch von 80 g = 148 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-glyzerin, 149 kg = 28,1 mol Acrylnitril und 1,2 l 2N Natriumhydroxidlösung wurden auf 50 °C erwärmt. Es wurden 19,2 g einer 40 Gew.-%igen wäßrigen Lösung = 29,15 mmol Tetrabutylammoniumhydroxid langsam hinzugegeben, wodurch die Temperatur des Gemisches durch die exotherme Reaktion

auf etwa 80 °C bis 90 °C anstieg. Das Reaktionsgemisch wurde dann 20 Minuten ohne weitere Erwärmung von außen gerührt, anschließend wurde auf 20 °C abgekühlt und es wurden 1,0 l Wasser hinzugegeben. Es wurde ein festes Material, nämlich ein Gemisch aus nicht-umgesetztem und cyanoäthylisiertem 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-glyzerin isoliert und erneut mit 1,49 kg = 28,1 mol Acrylnitril, 1,2 l wäßriger 2N Natriumhydroxidlösung und 19,2 g 40 Gew.-%iger wäßriger Lösung = 29,15 mmol Tetrabutylammoniumhydroxid für 20 Minuten unter Rühren bei 50 °C, anschließendes Abkühlen und Zugabe von 1,0 l Wasser behandelt. Die erhaltenen Feststoffe von 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoäthyl)-glyzerin wurden abfiltriert, nacheinander mit Wasser, Methanol und Acetonitril gewaschen und getrocknet, wobei 82 g (Ausbeute = 93 %) Material mit F. 45-46 °C erhalten wurden.

IR (CHCl₃) 2250 cm⁻¹

NMR (CDCl₃) δ 3,92 (t, 2, NCCH₂CH₂O-); 3,33-3,67 (m, 9, -OCH(CH₂OCH₂C₁₅H₃₁)₂-); 2,62 (t, 2, NCCH₂CH₂O-) und 0,75-1,58 (m, 62, aliphatische Protonen).

NMR = kernmagnetische Resonanz

B. Titelverbindung

Ein Gemisch von 20,5 g = 34,5 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(2-cyanoäthyl)-glyzerin, 200 ml Tetrahydrofuran, 10 ml Äthanol und 3 g Raneynickel-Katalysator wurde mit Ammoniakgas bei 0 bis 5 °C gesättigt und dann bei 3,5 bar in einer Paar-Hydriervorrichtung 3 Stunden bei Zimmertemperatur hydriert. Das Gemisch wurde dann filtriert, der Katalysator wurde mit 50 ml Tetrahydrofuran gewaschen und das gesamte Filtrat wurde im Vakuum zu einem Öl eingedampft. Diese Arbeitsweise wurde drei weitere Male mit frischen Reaktionspartnern und Katalysator wiederholt, wobei eine Gesamtmenge von 77 g Öl erhalten wurde. Dieses Öl wurde in 500 ml Äther aufgelöst, und die Lösung wurde mit 500 ml wäßriger

2 Gew.-%iger Ammoniumhydroxidlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum unter Bildung eines Feststoffes eingedampft. Der Feststoff wurde in 300 ml Methanol aufgelöst, und die Lösung wurde mit Chlorwasserstoffgas gesättigt und dann im Vakuum zu einem Feststoff eingedampft. Dieser Feststoff wurde aus Äthylacetat kristallisiert, wobei 63 g (Ausbeute 72 %) der gewünschten Verbindung mit einer geringen Menge an Verunreinigung und F. 69-70 °C erhalten wurde. Dieses Material wird dann zweimal aus 800 ml 1:1 Isopropanol:Acetonitril umkristallisiert, wobei 47,5 g (Ausbeute 54 %) Produkt mit F. 58-59 °C erhalten wurden.

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, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) und 0,90-1,32 (m, 62, aliphatische Protonen)

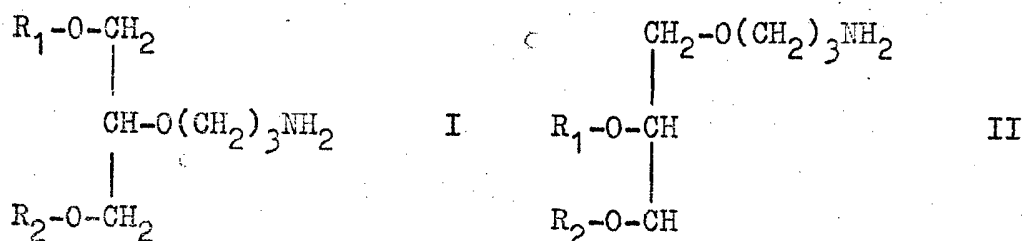
Elementaranalyse:

berechnet: C = 72,04 H = 12,73 N = 2,21 %

gefunden: C = 71,80 H = 12,41 N = 2,30 %

Beispiele 2 bis 7

In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurden die folgenden Verbindungen hergestellt, indem das entsprechende 1,3- oder 1,2-Di-O-(n-höhere-alkyl)-glyzerin als Ausgangsmaterial verwendet wurde:



<u>Bsp.</u>	<u>Formel</u>	<u>R₁-</u>	<u>R₂-</u>	<u>Molekül- formel</u>
2	I	<u>n</u> -dodecyl	<u>n</u> -dodecyl	$C_{30}H_{63}O_3N \cdot HCl \cdot 3/2H_2O$
3	I	<u>n</u> -tetradecyl	<u>n</u> -tetradecyl	$C_{34}H_{71}O_3N \cdot HCl \cdot H_2O$
4	I	<u>n</u> -octadecyl	<u>n</u> -octadecyl	$C_{42}H_{87}O_3N \cdot HCl$
5	I	<u>n</u> -tetradecyl	<u>n</u> -tetradecyl	$C_{34}H_{71}O_3N \cdot HCl$
6	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	$C_{38}H_{79}O_3N \cdot HCl \cdot 3/4H_2O$
7	I	<u>n</u> -octadecyl	<u>n</u> -octadecyl	$C_{42}H_{87}O_3N \cdot HCl \cdot H_2O$

Elementaranalyse

<u>Bsp.</u>	<u>F. (°C.)</u>	<u>berechnet (%)</u>			<u>gefunden (%)</u>		
		<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
2	76-77	65.60	12.29	2.54	65.45	11.91	2.61
3	57-58	68.47	12.50	2.35	68.51	11.24	2.29
4	64-65	73.04	12.84	2.03	72.96	12.56	1.99
5	90-91	70.60	12.55	2.42	70.74	12.85	2.68
6	76-78	70.54	12.77	2.16	70.42	12.17	2.07
7	67-69	71.19	12.80	1.98	70.95	12.19	1.91

Beispiel 8

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-äthylaminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid

A. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-acetamidopropyl)-glyzerin 1,0 g = 1,6 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid wurden zu einem Gemisch von 830 mg = 6,0 mmol Kaliumcarbonat und 75 ml Benzol hinzugesetzt. Dann wurden 150 mg = 1,9 mmol Acetylchlorid zugegeben, und die erhaltene Mischung wurde für 1 Stunde unter Rückfluß gerührt. Es wurden weitere 150 mg = 1,9 mol Acetylchlorid zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde für eine weitere Stunde unter Rückfluß gerührt. Die TLC-Analyse zeigte, daß die Reaktion im wesentlichen abgeschlossen war. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt, es wurden 75 ml Wasser hinzugegeben, und das erhaltene Gemisch wurde mit Äther (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft, wobei 800 mg (Ausbeute 79 %) der genannten Verbindung mit F. 53.54 °C erhalten wurden.

IR (CHCl_3) 3400 und 1670 cm^{-1}

NMR (CDCl_3) δ 1,97 (s, 3, $-\text{NHCOCH}_3$)

B. Titelverbindung

700 mg = 1,1 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-acetamidopropyl)-glyzerin wurden in 100 ml Äther aufgelöst und mit 500 mg = 13 mmol Lithiumaluminiumhydrid behandelt. Es wurden dann 100 ml Wasser hinzugegeben, und das Gemisch wurde mit Äther (2 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert, mit Chlorwasserstoffgas behandelt und im Vakuum zu einem Feststoff eingedampft, der aus heißem Äthylacetat umkristallisiert wurde. Hierbei wurden 470 mg (Ausbeute 66 %) der Verbindung mit F. 61-62 °C erhalten.

NMR (CDCl_3) δ 1,47 (t, 3, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$)

Elementaranalyse:

berechnet: C = 72,51 H = 12,78 N = 2,11 %
gefunden: C = 72,47 H = 12,56 N = 2,03 %

Beispiel 9

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-isopropylaminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid

700 mg = 1,1 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid wurden in einer Lösung von 1,05 ml Essigsäure, 350 mg = 4,3 mmol Natriumacetat und 1,3 ml Aceton aufgelöst. Es wurden 1,25 g = 33 mmol Natriumborhydrid in kleinen Portionen zugesetzt, bis die TLC-Analyse zeigte, daß die gesamte 3-Aminopropylverbindung verbraucht worden war. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 20 ml wäßriger 2N Natriumhydroxidlösung und 20 ml Wasser behandelt und mit Äther (3 x 40 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert, mit Chlorwasserstoffgas behandelt und dann im Vakuum zu einem Feststoff eingedampft, der aus heißem Äthylacetat umkristallisiert wurde. Hierbei wurden 210 mg (Ausbeute 28 %) der genannten Verbindung erhalten, die etwa $1/2$ Mol H_2O pro Mol enthielt und F. 72-73 °C aufwies.

NMR ($CDCl_3$) δ 1,42 (d, 6, $-NHCH(CH_3)_2$)

Elementaranalyse:

berechnet: C = 71,82 H = 12,79 N = 2,04 %
gefunden: C = 71,92 H = 12,46 N = 1,94 %

Beispiel 10

1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(4-aminobutyl)-glyzerinhydrochlorid

A. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-hydroxypropyl)-glyzerin 6,5 ml = 68,5 mmol eines Boranmethylsulfidkomplexes (BMS-Komplex) wurden bei 0 bis 5 °C zu einer Lösung von 10,82 g = 18,6 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-allyl-glyzerin, in 190 ml Hexan hinzugegeben, und die erhaltene Lösung wurde 3 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann erneut auf 0 bis 5 °C abgekühlt, und es wurden 17,3 ml Äthanol tropfenweise zur Zersetzung des zurückgebliebenen BMS hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde dann mit 13 ml wäßriger 3N Natriumhydroxidlösung und 11 ml 30 Gew.-%iger wäßriger Wasserstoffperoxidlösung behandelt, 16 Stunden unter Rückfluß gerührt, abgekühlt und auf Eiswasser, das Natriumbisulfit enthielt, gegossen. Die Eiswasserlösung wurde gerührt, bis sie einen negativen Stärke-Jod-test für Peroxide ergab, dann wurde mit Äther (3 x 200 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit 200 ml Wasser und 200 ml gesättigter wäßriger Natriumchloridlösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Produkt wurde durch Chromatographie über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol:Äthanol gereinigt, wobei 5 g (Ausbeute 45 %) der Verbindung mit F. 29 °C erhalten wurden.

NMR ($CDCl_3$) δ 3,80 (t, J = 5 Hz, 2, $-OCH_2CH_2CH_2OH$) und 3,75 (t, J = 5 Hz, 2, $-OCH_2CH_2CH_2OH$).

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

8,0 g = 13,4 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-hydroxypropyl)-glyzerin wurden bei 10 °C zu einer Lösung von 5,25 g = 27,5 mmol p-Toluolsulfonylchlorid und 10 ml Pyridin in 200 ml Methylenchlorid hinzugegeben, und das Gemisch wurde

60 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurden 200 ml Wasser hinzugesetzt, die Methylenchloridphase und die wäßrige Phase wurden getrennt und die wäßrige Phase wurde mit Methylenchlorid (2 x 150 ml) extrahiert. Die drei Methylenchloridschichten wurden vereinigt, mit Wasser (2 x 150 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Tosylat wurde durch Chromatographie über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol gereinigt, wobei 3,0 g (Ausbeute 30 %) eines Öles erhalten wurden. IR (CHCl_3) 1130 und 1350 cm^{-1}

NMR (CDCl_3) δ 7,53 (q, 4, Protonen am Phenylring); 4,15 (t, 2, $-\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 3,63 (t, 2, $-\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); 3,42 (m, 9, $-\text{oCH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_{15}\text{H}_{31})_2$); 2,45 (s, 3, $\text{Ar}-\text{CH}_3$); 1,90 (m, 2, $-\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) und 0,90-1,50 (m, 62, aliphatische Protonen)

C. 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-cyanopropyl)-glyzerin
3,0 g = 4,0 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O- β -(p-tosyloxy)-propyl- γ -glyzerin wurden in einer Lösung von 0,5 g = 10 mmol Natriumcyanid in 50 ml N,N-Dimethylformamid aufgelöst, und die erhaltene Lösung wurde 16 Stunden bei 80 °C gerührt, abgekühlt, mit 100 ml Wasser verdünnt und mit Äther (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden nacheinander mit 1N Salzsäure (3 x 75 ml), gesättigter wäßriger Natriumbicarbonatlösung (3 x 75 ml), 75 ml Wasser und 75 ml gesättigter, wäßriger Natriumchloridlösung gewaschen, dann über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum unter Bildung eines wachsartigen Feststoffes eingedampft, der in der nächsten Stufe ohne weitere Reinigung verwendet wurde. Es wurden 2,0 g (Ausbeute 83 %) erhalten.

IR (CHCl_3) 2250 cm^{-1}

D. Titolverbindung

800 mg = 21 mmol Lithiumaluminiumhydrid wurden zu einer Lösung von 2,0 g = 3,3 mmol 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-cyanopropyl)-glyzerin in 100 ml Äther gegeben, und das

Gemisch wurde 60 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Es wurde ausreichend Wasser zum Abstoppen der Reaktion vorsichtig zugesetzt, anschließend wurden 100 ml Wasser zugegeben. Das erhaltene Gemisch wurde für eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur gerührt und dann mit Äther (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit gesättigter wäßriger Natriumchloridlösung (3 x 75 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und zu einem Öl im Vakuum eingedampft, dieses Öl wurde durch Chromatographie über Kieselgel unter Elution mit Benzol:Äthanol gereinigt und dann in Äthanol aufgelöst. Die Lösung wurde mit Chlorwasserstoffgas behandelt und dann im Vakuum unter Erhalt eines Feststoffes eingedampft, dieser wurde aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei 444 mg (Ausbeute 21 %) Produkt mit F. 61,5-63,5 °C erhalten wurden.

NMR (CDCl_3) 3,67 (t, 2, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 3,55 (m, 9, $-\text{OCH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_{15}\text{H}_{31})$); 3,10 (t, 2, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NH}_2$) 1,50-2,00 (m, 4, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) und 0,80-1,50 (m, 62, aliphatische Protonen)

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 72,23	H = 12,74	N = 2,16 %
gefunden:	C = 72,53	H = 12,42	N = 2,10 %

Beispiel 11

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-aminomethylbenzyl)-glyzerinhydrochlorid

A. 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glyzerin
1,056 g einer 50 Gew.-%igen Dispersion in Mineralöl =
22 mmol an Natriumhydrid wurden zu einer Lösung von 9,73 g
= 18 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-glyzerin in 150 ml Tetrahydrofuran hinzugegeben, und die erhaltene Lösung wurde
20 Minuten bei Zimmertemperatur unter Stickstoff gerührt.

Es wurden 4,0 g = 20 mmol m-Cyanobenzylbromid hinzugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur unter Stickstoff gerührt. Dann wurden vorsichtig 200 ml Wasser zugesetzt, und das erhaltene Gemisch wurde mit Äthylacetat (3 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten Äthylacetatextrakte wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum zu 12 g Öl eingedampft, dieses wurde durch Chromatographie über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol:Hexan gereinigt, wobei 8,0 g (Ausbeute 68 %) eines Öles erhalten wurden.

IR (CHCl_3) 2230 cm^{-1}

B. Titelverbindung

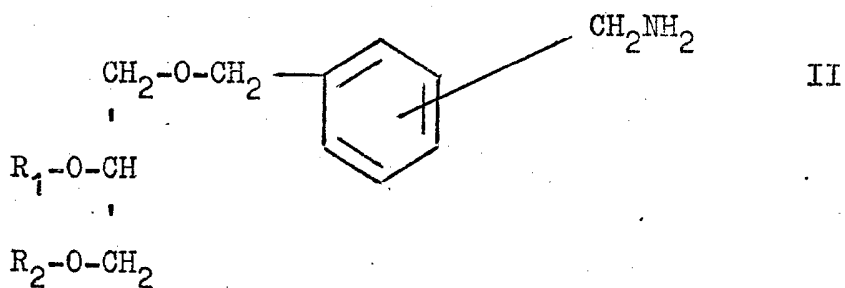
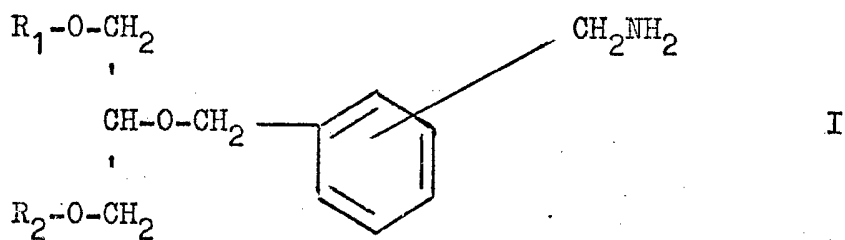
Eine Lösung von 1,0 g = 1,5 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(3-cyanobenzyl)-glyzerin in 10 ml Äther wurde langsam unter Stickstoff zu einer Suspension von 0,057 g = 1,5 mmol Lithiumaluminiumhydrid in 40 ml Äther zugesetzt, und das erhaltene Gemisch wurde für 1 Stunde unter Rückfluß und Stickstoffatmosphäre gerührt und dann abgekühlt. Es wurden 50 ml Wasser vorsichtig zugegeben, und das Gemisch wurde mit Äther (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum zu einem Öl eingedampft, dieses wurde durch Chromatographie über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol:Äthanol gereinigt und dann in Äthylacetat aufgelöst. Die Lösung wurde mit Chlorwasserstoffgas behandelt und dann im Vakuum unter Bildung eines Feststoffes eingedampft, dieser wurde aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei 220 mg (Ausbeute 21 %) Produkt mit F. 88-90 °C erhalten wurden.

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 74,14	H = 11,87	N = 2,01 %
gefunden:	C = 74,35	H = 11,54	N = 2,15 %

Beispiele 12 bis 23

In gleicher Weise wie in Beispiel 11 wurden die folgenden Verbindungen hergestellt, wobei das geeignete 1,3- oder 1,2-Di-O-(n-höhere-alkyl oder -alkenyl)-glyzerin und Cyano-benzylbromid als Ausgangsmaterialien verwendet werden:



<u>Bsp.</u>	<u>Formel</u>	<u>R₁-</u>	<u>R₂-</u>	<u>Substitution am Phenylring</u>	<u>Molekül- formel</u>	<u>F. (°C)</u>
12	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	<u>ortho</u>	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	71-73
13	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	<u>meta</u>	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	77-79
14	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	<u>para</u>	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl·H ₂ O	77-78
15	I	<u>n</u> -tetradecyl	<u>n</u> -tetradecyl	<u>ortho</u>	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl·1/4H ₂ O	71-72
16	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	<u>ortho</u>	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	79-80
17	I	<u>n</u> -tetradecyl	<u>n</u> -tetradecyl	<u>meta</u>	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl	87-88
18	I	<u>n</u> -octadecyl	<u>n</u> -octadecyl	<u>meta</u>	C ₄₇ H ₈₉ O ₃ N·HCl	73-75
19	I	<u>n</u> -octadec-9-enyl	<u>n</u> -octadec-9-enyl	<u>meta</u>	C ₄₇ H ₈₅ O ₃ N·HCl·1/2H ₂ O	öl
20	I	<u>n</u> -tetradecyl	<u>n</u> -tetradecyl	<u>para</u>	C ₃₉ H ₇₃ O ₃ N·HCl	132-135
21	I	<u>n</u> -hexadecyl	<u>n</u> -hexadecyl	<u>para</u>	C ₄₃ H ₈₁ O ₃ N·HCl	117-119
22	I	<u>n</u> -octadecyl	<u>n</u> -octadecyl	<u>para</u>	C ₄₇ H ₈₉ O ₃ N·HCl	67-69
23	I	<u>n</u> -octadec-9-enyl	<u>n</u> -octadec-9-enyl	<u>para</u>	C ₄₇ H ₈₅ O ₃ N·HCl·3/4H ₂ O	öl

Elementaranalyse

<u>Bsp.</u>	<u>berechnet (%)</u>			<u>gefunden (%)</u>		
	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
12	74.14	11.87	2.01	73.89	11.43	1.99
13	73.20	11.85	1.98	73.17	11.53	2.28
14	72.28	11.83	1.96	72.52	11.46	1.90
15	72.63	11.48	2.17	72.62	11.81	2.43
16	74.14	11.87	2.01	73.94	11.25	2.02
17	73.14	11.65	2.19	72.86	11.44	2.11
18	74.99	12.06	1.86	74.97	11.73	1.83
19	74.50	11.57	1.85	74.40	11.08	2.08
20	73.14	11.65	2.19	72.84	11.30	2.26
21	74.14	11.87	2.01	74.33	11.55	2.15
22	74.99	12.06	1.86	74.50	11.30	1.91
23	74.06	11.54	1.83	74.00	10.99	1.93

Beispiel 24

1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(4-aminomethylphenyl)-glyzerinhydrochlorid

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

In gleicher Weise wie in Beispiel 11 B. wurde die genannte Verbindung durch Umsetzung von 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-glyzerin mit p-Toluolsulfonylchlorid hergestellt. Die Reinigung wurde durch Umkristallisation aus Äthylacetat durchgeführt. Die Verbindung hatte F. 53-55 °C.

IR (CHCl₃) 1360 und 1180 cm⁻¹

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

Ein Gemisch aus 1,4 g = 2,0 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(p-tosyl)-glyzerin, 0,5 g = 3,5 mmol Natrium-4-cyanophenolat und 100 ml Xylol wurde 16 Stunden unter Rückfluß gerührt. Da die Reaktion noch nicht abgeschlossen war, wurde das Xylol durch Destillation entfernt und durch 100 ml N,N-Dimethylformamid ersetzt, und die erhaltene Lösung wurde für weitere 16 Stunden bei 150 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann abgekühlt, mit 100 ml Wasser verdünnt und mit Äther (2 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden aufeinanderfolgend mit 100 ml 3N Salzsäure, 100 ml wäßriger 10 Gew.-%iger Natriumbicarbonatlösung und 100 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum zu einem Öl eingedampft, dieses wurde durch Chromatografie über Kieselerdegel unter Elution mit Benzol gereinigt, wobei 0,65 g (Ausbeute 50 %) der Verbindung mit F. 53-55 °C erhalten wurden.

IR (CHCl₃) 2210 cm⁻¹

C. Titelverbindung

0,60 g = 0,93 mmol 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-(4-cyanophenyl)-glyzerin wurde zu einer Suspension von 0,3 g = 7,9 mmol Lithiumaluminiumhydrid in 25 ml Äther hinzugegeben, und

das erhaltene Gemisch wurde für 30 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurden vorsichtig 25 ml Wasser zugesetzt, die Ätherphase und die wäßrige Phase wurden getrennt und die wäßrige Phase mit Äther (3 x 25 ml) und Äthylacetat (25 ml) extrahiert. Die fünf organischen Extrakte wurden miteinander vereinigt, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum zu einem Öl eingedampft, dieses wurde in Äther aufgelöst. Die Lösung wurde mit Chlorwasserstoffgas behandelt, wodurch die Ausfällung eines Feststoffes hervorgerufen wurde. Es wurden 0,41 g (Ausbeute 64 %) der Verbindung mit F. 110-112 °C erhalten.

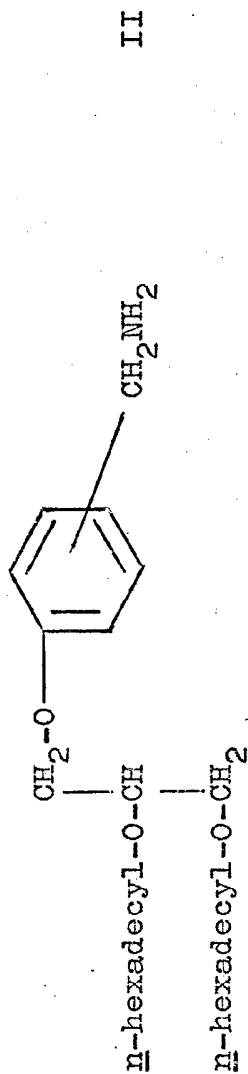
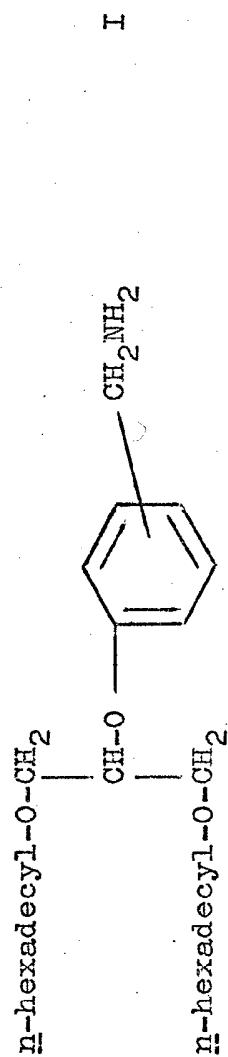
NMR (CDCl_3) δ 4,02 (s, 2, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$)

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 73,91	H = 11,81	N = 2,05 %
gefunden:	C = 73,62	H = 11,71	N = 2,14 %

Beispiele 25 bis 27

In ähnlicher Weise wie in Beispiel 24 B-C wurden die folgenden Verbindungen aus dem Tosylat, das wie in Beispiel 26 A hergestellt war, und Natriumcyanophenolat hergestellt:



Bsp.	Struk-	Substitution am Phenylring	Molekülformel	F. (°C)	Elementaranalyse					
					berechnet (%)			gefunden (%)		
					C	H	N	C	H	N
25	I	meta	$\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$	78-80	73,91	11,81	2,05	74,11	11,64	2,44
26	I	para	$\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$	120-122	73,91	11,81	2,05	73,94	11,37	2,04
27	II	meta	$\text{C}_{42}\text{H}_{79}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$	84-86	73,91	11,81	2,05	74,00	11,34	2,04

Beispiel 28

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

In ähnlicher Weise wie in Beispiel 24 wurde die genannte Verbindung unter Verwendung von Natrium-4-(2-cyanoäthyl)-phenolat anstelle von Natrium-4-phenolat hergestellt. Die Verbindung hat F. 153-155 °C.

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 74,37	H = 11,91	N = 1,97 %
gefunden:	C = 74,13	H = 11,44	N = 2,08 %

Beispiel 29

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

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

In ähnlicher Weise wie in Beispiel 10 A und 10 B wurde 1,2-Di-O-(n-hexadecyl)-3-O-allyl-glyzerin mit BMS umgesetzt, und die erhaltenen 2-Hydroxypropyl- und 3-Hydroxypropylverbindungen wurden in ihre entsprechenden Tosylate umgewandelt. In dieser Stufe wurde keine Trennung durchgeführt, das Gemisch der Tosylate wurde direkt in der nächsten Stufe verwendet.

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

Das erhaltene Gemisch von 3,0 g = 4,0 mmol Tosylaten wurden in 50 ml N,N-Dimethylacetamid aufgelöst und mit einer Lösung von 0,326 g = 5,0 mmol Natriumazid in 5 ml Wasser während 16 Stunden bei 90 °C behandelt. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt, mit 200 ml Wasser verdünnt und mit Äther (2 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden

mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum zu einem Öl eingedampft. Es wurden 2 g (Ausbeute 81 %) eines Gemisches der 2-Azidopropyl- und 3-Azidopropylverbindungen erhalten, das ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

IR (CHCl_3) 2100 cm^{-1}

C. Titelverbindung

Das erhaltene Gemisch von 2 g = 3,2 mmol Aziden wurde in 100 ml Äther aufgelöst, mit 0,4 g = 10,5 mmol Lithiumaluminiumhydrid behandelt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Überschüssiges Hydrid wurde durch vorsichtige Zugabe von 10 ml Äthanol und 150 ml Wasser zerstört und das Gemisch wurde dann mit Äther (2 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum zu 1,8 g eines Öles konzentriert, das durch Chromatografie über Kieselerdegel unter Elution durch Benzol:Äthanol gereinigt und anschließend zu dem Hydrochloridsalz durch Auflösen und Behandlung mit Chlorkwasserstoffgas umgewandelt wurde. Das Salz wurde aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei 0,21 g (Ausbeute 10 %) der Verbindung mit F. 56-58 °C erhalten wurden, wobei die Feststoffe etwa $1/2 \text{ mol H}_2\text{O}$ pro Mol der genannten Verbindung enthielten.

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 71,03	H = 12,70	N = 2,18 %
gefunden:	C = 71,11	H = 12,91	N = 2,16 %

Beispiel 30

1,2-Di-O-(n-octadecyl)-3-O-(2-aminopropyl)-glyzerinhydrochlorid

In ähnlicher Weise wie in Beispiel 29 A wurde 1,2-Di-O-

(n-octadecyl)-3-O-(2-hydroxypropyl)-glyzerin aus 1,2-Di-O-(n-octadecyl)-3-O-allyl-glyzerin hergestellt. Die genannte Verbindung wurde aus 1,2-Di-O-(n-octadecyl)-3-O-(2-hydroxypropyl)-glyzerin in gleicher Weise wie in Beispiel 40 B-C hergestellt, der Feststoff enthielt 1 mol H₂O pro Mol des genannten Produktes, hatte F. 65-67 °C und folgende

Elementaranalyse:

berechnet:	C = 71,19	H = 12,80	N = 1,98 %
gefunden:	C = 71,12	H = 12,52	N = 1,92 %

Beispiel 31

In-Vivo-Aktivität von 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-amino-propyl)-glyzerin-hydrochlorid gegen EMC-Virus

Die Formulierung als Emulsion wurde durch Schmelzen und Vermischen von gleichen Teilen der genannten Verbindung, von Polysorbat 80 und Glyzerin und anschließendes Dispergieren des Gemisches in heißem Wasser unter kräftigem Vermischen hergestellt. Die Formulierung wurde dann auf Endkonzentrationen von 0,14M Natriumchlorid und 0,01M Natriumphosphat, pH = 7, eingestellt. Weitere Verdünnungen wurden mit 0,14M Natriumchlorid-0,01M Natriumphosphat, pH = 7, Pufferlösung hergestellt.

Drei Gruppen von 10 weiblichen Albinomäusen (20 - 25 g Körpergewicht) wurden intraperitoneal 0,5-ml-Injektionen gegeben, welche Dosierungsmengen von 1,5, 5 bzw. 15 mg der genannten Verbindung/kg Körpergewicht enthielten. Eine vierte Kontrollgruppe von 10 Mäusen erhielt keine solche Injektion. 18 bis 24 Stunden später wurden alle vier Gruppen eine subkutane 0,2-ml-Injektion gegeben, welche das 20-fache des LD₅₀-Wertes von Encephalomyocarditis-Virus (EMC-Virus) enthielt, wobei der LD₅₀-Wert der Dosiswert

ist, welche eine Todesrate von 50 % bei ungeschützten Mäusen in 10 Tagen bewirkt. Die Überlebensdaten wurden während der nächsten 10 Tage aufgezeichnet und die relative Überlebensrate (S_r) wurde berechnet.

Dosierungswert der S_r (Durchschnitt von 7 Experimenten)
 genannten Verbindung

15 mg/kg	61
5 "	45
1,5 "	24

Die Antivirusaktivität wird als relative Überlebensrate (S_r) bei Experimentalgruppen im Vergleich zu der Kontrolle am 10. Tag nach der Virusapplikation ausgedrückt. Der Wert S_r wird durch folgende Formel definiert:

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

worin bedeuten:

- S_r = relative Überlebensrate
- S_x = prozentuale Überlebensrate nach 10 Tagen bei der Experimentalgruppe
- x_i = Anzahl von überlebenden Tieren am i-ten Tag bei der Experimentalgruppe
- e_i = Anzahl von überlebenden Tieren am i-ten Tag bei der Kontrollgruppe

Beispiele 32 bis 49

In gleicher Weise wie in Beispiel 31 beschrieben, wurde die In-Vivo-Aktivität gegenüber EMC-Virus für die im folgenden aufgeführten Verbindungen bestimmt.

Bsp.	Verbindung, hergestellt in Beispiel	S _r beim Dosiswert (mg/kg)				
		15	5	1.5	0.5	
32	11	71	49	20	6	
33	12	62	47	18	-	
34	13	80	72	20	-	
35	14	74	46	4	-	
36	15	57	42	3	-	
37	16	64	58	15	-	
38	17	74	44	34	-	
39	18	46	7	6	-	
40	19	45	5	4	-	
41	20	70	36	3	-	
42	21	37	31	12	0	
43	22	44	30	8	-	

<u>Bsp.</u>	<u>Verbindung, hergestellt in Beispiel</u>	<u>S_r beim Dosiswert (mg/kg)</u>				
		<u>15</u>	<u>5</u>	<u>1.5</u>	<u>0.5</u>	
44	23	68	43	2	-	
45	24	66	45	17	-	
46	25	68	28	33	-	
47	26	60	63	16	-	
48	27	53	34	16	7	
49	28	56	35	20	6	

Beispiel 50

Reduzierung der Virusausschüttung bei Polypenzellen vom Menschen in vitro durch 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid

Das Wachstumsmedium wurde hergestellt durch Ergänzung von 100 ml Eagle-Medium essentieller Bestandteile mit 2 ml 100-fach konzentrierter antibiotischer-antimykotischer Lösung, 1 ml 200 mM Glutaminlösung, 1 ml 100-fach konzentrierter Lösung nicht essentieller Aminosäuren, 1 ml 100 mM Natriumpyruvatlösung und durch Hitze inaktiviertem, fetalem Kalbserum (10 %). Jedes Loch der Mikrotiterplatten mit 96 Löchern wurde mit etwa 50.000 Menschen-Nasalpolypzellen, suspendiert in 0,2 ml Wachstumsmedium beimpft. Die Platten wurden dann für 8-10 Tage bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ zur Bildung von Monoschichten von Zellen inkubiert.

Am Ende der Zellwachstumsperiode von 8-10 Tagen wurden zusammenfließende Monoschichten aus den Platten viermal mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen und unmittelbar danach mit 0,2 ml pro Loch an Aufrechterhaltungsmedium behandelt, das 10, 5,0, 1,0, 0,5, 0,1 bzw. 0 µg/ml der genannten Verbindung enthielt. Das Aufrechterhaltungsmedium war mit dem zuvor beschriebenen Wachstumsmedium identisch, mit der Ausnahme, daß der Gehalt des fetalen Kalbsserums 2 % betrug. Die Platten wurden für weitere 18 Stunden bei 37 °C inkubiert, und die Monoschichten wurden viermal mit mit Phosphat gepufferter Salzlösung zur Entfernung der genannten Verbindung gewaschen, mit einer Zusammensetzung, welche etwa das 1000-fache des TCID₅₀-Wertes - d.h. des Dosierungswertes, der eine 50 %ige Infektionsrate bei nicht geschützten Kulturen hervorruft - enthielt an vesicularem Stomatitisvirus (VSV) für eine zweistündige Adsorptionsperiode (37 °C) behandelt, viermal mit Phosphat gepufferter Salzlösung zur Entfernung von nicht

adsorbierten Virusteilchen gewaschen und erneut mit 0,2 ml des Aufrechterhaltungsmediums pro Loch versetzt. Die Platten wurden dann 7 Stunden bei 37°C inkubiert und die Kulturflüssigkeit aus 5-8 Replikatzellen, die von jeder Platte geerntet worden waren, wurden in Röhrchen eingefroren aufbewahrt und dann auf die Menge an infektiösen Viren, die in Mikrotiterplatten von L-929-Mäusefibroblasten vorhanden waren, titriert. Die L-929-Mäusekulturen wurden mikroskopisch eingestuft und etwa 3 bis 4 Tage später analysiert, wobei die folgenden prozentualen Abnahmen der Virusaussbeute (bezogen auf die Kontrolle) für die fünf Konzentrationen der genannten, untersuchten Verbindungen bestimmt wurde:

Prozentuale Reduktion der Virusaussbeute

Konzentration (µg/ml) an genannter Verbindung

<u>10</u>	<u>5.0</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>	<u>0.1</u>
94 %	90 %	84 %	75 %	<68 %

Beispiele 51 bis 54

In gleicher Weise wie in Beispiel 50 wurde die Reduktion der Virusaussbeute auf menschliche Polypzellen in vitro für die folgenden Verbindungen bestimmt:

Bsp.	Verbindung, hergestellt in Bsp.	a) prozentuale Reduktion der Virusausschüttung Konzentration (µg/ml)					
		10	5.0	1.0	0.5	0.1	
51	6	+	+	-	-	ND	
52	8	ND	±	-	-	ND	
53	10	+	±	-	ND	ND	
54	11	+	+	-	-	-	
55	15	+	-	-	ND	ND	
56	16	+	+	-	-	-	
57	17	+	±	-	-	-	
58	19	+	±	-	-	-	
59	20	+	±	-	-	-	
60	25	+	+	-	-	-	
61	27	+	+	-	ND	ND	
62	28	+	+	-	ND	ND	
63	29	+	+	-	ND	ND	
64	30	ND	+	-	ND	ND	

Beispiel 65

Fähigkeit von 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid zur Induktion von zirkulierendem Interferon

Ein Gemisch von gleichen Gewichten der genannten Verbindung, Polysorbat 80 und Glyzerin wurde zusammengeschmolzen und dann in heißer 0,14M Natriumchloridlösung, welche 0,01M Natriumphosphat, pH = 7 (PBS) enthielt, homogenisiert. Die erhaltene Öl-in-Wasser-emulsion wurde für die Applikation einfach mit PBS verdünnt.

Weibliche Schweizer-Mäuse (20-25 g Körpergewicht) wurden intraperitoneal (0,5 ml) mit einer Menge der zuvor genannten, verdünnten Emulsion injiziert, welche 25 mg der genannten Verbindung/kg Körpergewicht enthielt. Acht, zwölf, sechzehn und zwanzig Stunden nach der Injektion wurden Plasmaproben aus vier Mäusen abgenommen und zusammengegeben. Reihenverdünnungen in L-15 (Leibovitz)-Medium, das 5 % fetales Kalbsserum enthielt, wurden in Mikrotiterplatten über Nacht bei 37 °C auf zusammenhängenden Monoschichten von L-929-Mäuse-fibroblasten inkubiert. Die Monoschichten wurden dann mit proteinfreiem Medium gewaschen, mit dem 10-fachen der TCID₅₀-Wertes, d.h. des die 50 %ige Infektionsrate bei nicht geschützten Kulturen hervorrufenden Dosiswertes, an vesiculären Stomatitisviren (VSV) für eine einstündige Adsorptionsperiode (37 °C) behandelt, gewaschen, mit L-15-Medium, das 5 % fetales Kalbsserum enthielt, erneut behandelt und dann wiederum für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die L-929-Kulturen wurden dann mikroskopisch auf Viruscytopathologie untersucht und analysiert, wobei der Plasmainterferongehalt, der reziproke Wert der Plasma-verdünnung, welche 50 %igen Schutz an L-929-Monoschichten ergibt, bestimmt wurde.

Ein zweites Experiment wurde unter Befolgung der zuvor genannten Arbeitsweise mit der Ausnahme durchgeführt, daß den Mäusen 10 mg der genannten Verbindung/kg Körpergewicht injiziert wurde, und daß Proben einer peritonealen Wäsche bei vier Mäusen genommen und zusammengegeben wurden, und zwar 6, 9, 12, 15 und 18 Stunden nach der Injektion. Die Proben wurden durch Exposition der Peritonealmembran genommen; wobei 1 ml an ausgeglichener Hank-Salzlösung, die 100 Penicillineinheiten/ml und 100 µg Streptomycin/ml enthielt, in dem Peritonealhohlraum injiziert wurde, das Abdomen kurz massiert wurde und dann die Peritonealwäsche abgesaugt wurde.

Die folgenden Daten wurden bei diesen beiden Experimenten erhalten:

Interferon- quelle	Interferongehalte (Einheiten/ml) Zeit (h) nach der Injektion							
	6	8	9	12	15	16	18	20
Plasma	-	34	-	67	-	52	-	40
Peritonealwäsche	<16	-	768	320	448	-	448	-

Beispiele 66 bis 69

In gleicher Weise wie in Beispiel 65 wurde die Fähigkeit zur Induktion von zirkulierendem Interferon für die im folgenden angegebenen Verbindungen bestimmt:

Bsp.	Verbindung, hergestellt in Bsp.	Interferon-Gehalte (Einheiten/ml) ^a			Interferon-Gehalte (Einheiten/ml) ^b		
		Zeit (h) nach der Injektion	Zeit (h) nach der Injektion	Zeit (h) nach der Injektion	Zeit (h) nach der Injektion	Zeit (h) nach der Injektion	Zeit (h) nach der Injektion
		8	12	16	20	24	28
66	11	< 20	23	75	90	< 13	< 13
67	12	20	71	54	68	< 18	< 18
68	13	< 18	138	217	163	< 13	< 13
69	21	< 20	28	60	70	< 13	< 13

(a) Interferonquelle : Plasma

(b) Interferonquelle : Peritonealwäsche

Beispiel 70

Erhöhung der durch Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly(I:C)) induzierten Zellresistenz gegen Vireninfektion durch 1,3-Di-O-(n-hexadecyl)-2-O-(3-aminopropyl)-glyzerin-hydrochlorid

Wachstumsmedium wurde durch Ergänzung von 100 ml Eagle-Medium minimaler essentieller Bestandteile mit 2 ml 100-fach konzentrierter antibiotischer-antimykotischer Lösung, 1 ml 200 mM Glutaminlösung und durch Hitze inaktiviertem, fetalem Kalbsserum (5 %) hergestellt. Mäuse-L-929-fibroblasten wurden im Wachstumsmedium suspendiert, und jedes Loch von Mikrotiterplatten mit 96 Löchern wurden mit 0,2 ml der Suspension, welche 20 000 bis 30 000 Zellen enthielt, beimpft. Die Platten wurden für 2 bis 4 Tage bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ zur Ausbildung von Monoschichten der Zellen inkubiert. Die Platten wurden viermal mit mit Phosphat gepufferter Salzlösung unmittelbar vor der Behandlung gewaschen.

Poly(I:C) wurde bei Konzentrationen von 5,0, 1,0, 0,2 und 0,04 µg/ml in dem zuvor beschriebenen Medium ohne das Kalbsserum hergestellt. 0,1 ml jeder Verdünnung wurde in einer Schachbrettanordnung auf den L-929-Zellenmonoschichten mit 0,1 ml Verdünnungen, welche 20,0, 4,0, 0,8, 0,16 und 0,032 µg der genannten Verbindung pro ml des vom Serum freien Mediums enthielten, zusammengegeben. Die Kontroll-Löcher wurden entweder Poly(I:C) oder der genannten Verbindung alleine exponiert. Die Platten wurden 6 Stunden bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ inkubiert, viermal mit mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen und erneut mit 0,1 ml pro Loch an Wachstumsmedium, das 2 % fetales Kalbsserum enthielt, versetzt. Nach weiterer 18-stündiger Inkubation wurden die Platten auf Toxizität eingestuft und dann mit 0,1 ml pro Loch einer Suspension von vesiculäre Stomatitis-Viren (VSV-Suspension), welche das 10-fache bis 30-fache des TCID₅₀-Wertes, d.h. Gewebekultur-

infektionsdosis, welche eine 50 %ige Infektionsrate bewirkt, versetzt. Die Platten wurden für weitere 3 bis 4 Tage inkubiert und dann mikroskopisch auf cytopathogenen Infekt (CPE) untersucht. Zellen, welche vor der Virusinfektion geschützt waren, waren frei von CPE. Die minimale Schutzdosis (MPD) für Poly(I:C) alleine wurde aufgezeichnet, und das Ausmaß der erhöhten oder gesteigerten Antiviruseffektivität, welche durch die Kombination mit der genannten Verbindung hervorgerufen wurde, wurde für jeden Verdünnungswert der genannten Verbindung bestimmt.

Erhöhung der durch Poly(I:C)-induzierten Zellresistenz gegen Vireninfektion

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) der genannten Verbindung

<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

Anmerkung: Die Kombination von Poly(I:C) mit der genannten Verbindung ergibt den gleichen Antiviruseffekt wie die angegebene Erhöhung der Poly(I:C)-konzentration um das angegebene Vielfache.

Beispiele 71 bis 92

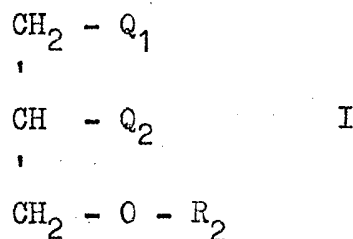
In gleicher Weise wie in Beispiel 70 wurde die Erhöhung der durch Poly(I:C)-induzierten Zellresistenz gegenüber Vireninfektion für die im folgenden angegebenen Verbindungen bestimmt:

Bsp.	Verbindung, hergestellt in Beispiel	Poly(I:C)-Förderung ^a Konzentration (µg/ml)			
		20	4.0	0.8	
71	6	+	+	-	
72	7	+	+	-	
73	11	+	+	±	
74	12	+	+	±	
75	13	+	+	±	
76	14	+	+	±	
77	15	+	+	±	
78	16	+	+	±	
79	17	+	+	±	
80	18	+	+	±	
81	19	+	±	-	
82	20	+	+	±	

Bsp.	Verbindung, hergestellt in Beispiel	Poly(I:C)-Förderung ^a Konzentration (µg/ml)			
		20	4.0	0.8	
		+	+	+	
83	21	+	+	+	
84	22	+	+	-	
85	23	+	-	-	
86	24	+	+	-	
87	25	+	+	-	
88	26	+	+	-	
89	27	+	+	+	
90	28	+	+	-	
91	40	+	+	+	
92	41	+	+	-	

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren für die Herstellung einer Verbindung der Formel:

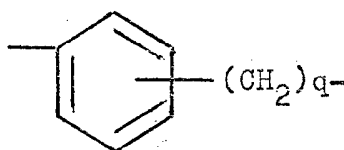


und der pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalze davon, worin Q_1 und Q_2 entweder $-\text{O}-\text{Y}-\text{NHR}_3$ oder $-\text{O}-\text{R}_1$, jedoch verschieden sind,

R_1 und R_2 je aus der normales Alkyl mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen und normales Alkenyl ohne Doppelbindung in der 1-Stellung mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen umfassenden Gruppe ausgewählt sind,

Y aus der Alkylen mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen, wobei die beiden Valenzen an verschiedenen Kohlenstoffatomen vorhanden sind,

ortho-, meta- und para-Phenylendimethylen und

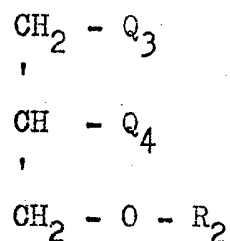


worin q eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und die linke Bindung an O gebunden ist, umfassenden Gruppe ausgewählt ist, und

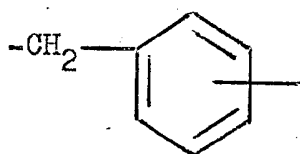
R_3 aus der Wasserstoff und Alkyl mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen umfassenden Gruppe ausgewählt ist, gekenn-

zeichnet dadurch, daß es die folgenden Verfahrensschritte umfaßt:

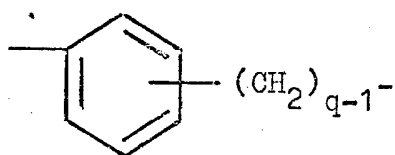
(a) Reduzieren einer Verbindung der Formel



worin Q_3 und Q_4 entweder $-\text{O}-\text{R}_1$ oder $-\text{O}-\text{Y}'-\text{CN}$ bzw. $-\text{O}-\text{R}_1$ oder $-\text{O}-\text{Y}-\text{N}_3$, jedoch verschieden sind, worin Y' aus der Alkylen mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen,



worin die linke Bindung an O gebunden ist, und



worin die linke Bindung an O gebunden ist,

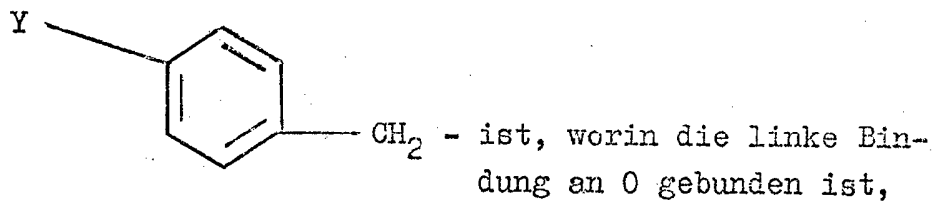
umfassenden Gruppe ausgewählt ist, zur Gewinnung einer Verbindung der Formel I, worin R_3 Wasserstoff ist;

(b) wenn gewünscht, Alkylieren der entstandenen Verbindung der Formel I, worin R_3 Wasserstoff ist; und

(c) wenn gewünscht, Umwandeln der aus Schritt (a) oder (b) hervorgegangenen Verbindung der Formel I oder II in ein pharmazeutisch-annehmbares Säureadditionssalz davon.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_2 je normales Alkyl mit 14 bis 18 Kohlenstoffatomen sind.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_2 je n-Hexadecyl sind.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Verbindung unter denjenigen mit der Formel I ausgewählt ist.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß Y ein geradkettiges Alkyl mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen und R_3 Wasserstoff ist.
6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß Y ortho-, meta- oder para-Phenylendimethylen und R_3 Wasserstoff ist.
7. Verfahren nach Punkt 6, gekennzeichnet dadurch, daß Y meta-Phenylidimethylen ist.
8. Verfahren nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_2 je n-Hexadecyl sind und Y n-Propylen ist.
9. Verfahren nach Punkt 8, gekennzeichnet dadurch, daß die Verbindung die Formel I hat.

10. Verfahren nach Punkt 7, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_2 je n-Hexydecyl sind.
11. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß R_1 und R_2 je n-Hexadecyl sind,



und R_3 Wasserstoff ist.