(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **161025 B**

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **3194/80**

(22) Indleveringsdag: **24 jul 1980**

(41) Alm. tilgængelig: **26 jan 1981**

(44) Fremlagt: **21 maj 1991**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **25 jul 1979 CH 6893/79**

(51) Int.Cl.[5] **C 07 K 5/02**
C 07 H 15/04
C 07 F 9/09

(71) Ansøger: ***CIBA-GEIGY AG; Klybeckstrasse 141; 4002 Basel, CH**

(72) Opfinder: **Lajos *Tarcsay; DE, Gerhard *Baschang; CH, Albert *Hartmann; DE, Jaroslav *Stanek; CH**

(74) Fuldmægtig: **Dansk Patent Kontor A/S**

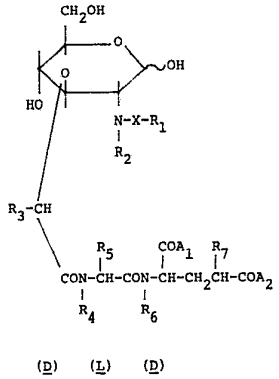
(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af lipophile phosphatidylmuramylpeptider

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3194-80

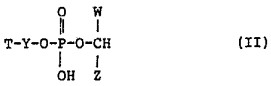
Muramylpeptider med formlen



(I)

(D) (L) (D)

hvori X er carbonyl eller carbonyloxy, R_1 er eventuelt substitueret alkyl eller aryl, R_2, R_4 og R_6 er H eller alkyl, R_3 er H eller alkyl, R_5 er H, alkyl, frit eller funktionelt omdannet hydroxyalkyl, frit eller funktionelt omdannet mercaptoalkyl, eventuelt substitueret aminoalkyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, eventuelt substitueret aryl eller aralkyl, nitrogenholdig heterocyclyl eller heterocyclylalkyl, eller R_4 og R_5 tilsammen er alkylen, R_7 er H eller eventuelt forestret eller amideret carboxyl, og én af grupperne A_1 og A_2 er en gruppe med formlen



(II)

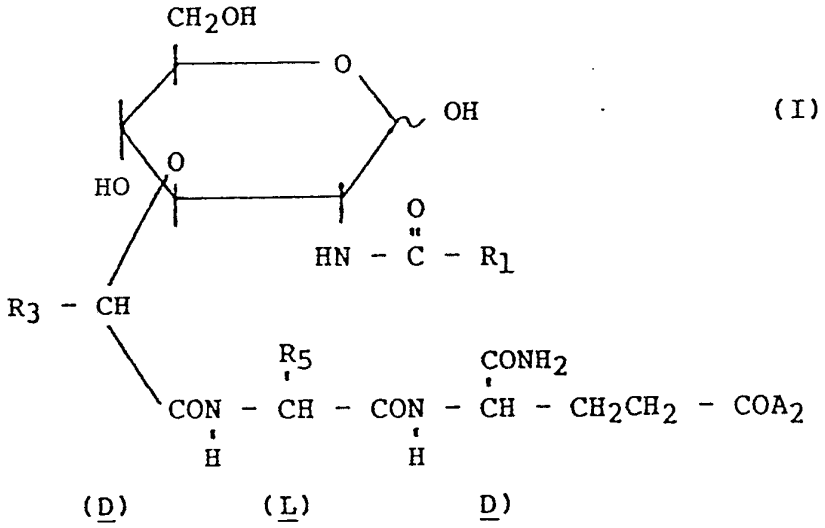
hvori T er -HN eller -O, Y er en eventuelt substitueret alkylengruppe, der også kan være afbrudt af en eller to oxycarbonyl- og/eller aminocarbonylgrupper, W er H, og Z er en 1,2-dihydroxyethyl- eller 2-hydroxyethylgruppe, hvori mindst én af hydroxygrupperne er forestret med en eventuelt umættet, langkædet aliphatisk carboxylsyre eller er forethret med en eventuelt umættet, langkædet aliphatisk alkohol, eller W og Z hver for sig betyder en med en eventuelt umættet, langkædet aliphatisk carboxylsyre forestret eller med en eventuelt umættet, langkædet aliphatisk alkohol forethret hydroxymethylgruppe, og den anden af grupperne A_1 og A_2 betyder fri eller foretheret hydroxy, amino, alkylamino eller carboxamidoalkylamino, eller deres salte fremstilles ved forskellige fremgangsmåder.

Forbindelserne (I) og deres salte har immunpotenserende virkninger.

DK 161025 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte lipofile phosphatidyl-muramylpeptider, der kan anvendes til stimulering af immunitet.

Opfindelsen angår specielt en analogifremgangsmåde til fremstilling af farmakologisk virksomme lipofile phosphatidylmuramylpeptider med den almene formel I



(I)

(D) (L) D)

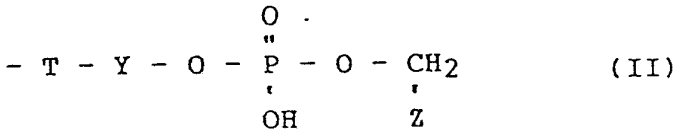
hvori

R_1 betyder et lavalkyl eller phenyl,

R_3 betyder hydrogen eller lavalkyl,

R_5 betyder lavalkyl, og

A_2 betyder en gruppe med formlen II



(II)

hvori

T betyder NH eller O,

Y betyder lavalkylen eller en gruppe med formlen

$-Y_1-CONH-Y_2-$, hvori Y_1 og Y_2 begge betyder lavalkylen, og Z betyder en 1,2-dihydroxyethyl- eller 2-hydroxyethyl-gruppe, i hvilken mindst en af hydroxygrupperne er forestret med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer, idet præfikset "lav" i hvert enkelt tilfælde betegner en gruppe med 1 til 4 carbonatomer,
eller salte deraf.

Lavalkyl er ligekædet eller forgrenet, i en vilkårlig stilling bundet alkyl.

Lavalkylengruppen Y har fortrinsvis 2 eller 3 carbonatomer. I gruppen med formlen

$$-Y_1-CONH-Y_2- \qquad \text{(IIIc)}$$

har lavalkylengrupperne Y_1 og Y_2 tilsammen fortrinsvis mere end 2 carbonatomer. Der foretrækkes aliphatiske carboxylsyrer med 16-22 carbonatomer.

De i sammenhæng med nærværende opfindelse med "lav" betegnede grupper og forbindelser indeholder højst 4 carbonatomer.

I de foregående og i det følgende kan almenbegreberne have følgende betydning:
Lavalkyl er f.eks. n-propyl, n-butyl, isobutyl, sek-butyl eller tert-butyl.

Lavalkoxy er f.eks. n-propoxy, n-butoxy, isobutoxy, sek-butoxy eller tert-butoxy, i første række methoxy eller ethoxy.

Lavalkylendioxy er især methylendioxy, ethylendioxy eller propylendioxy.

Halogen betyder fluor eller brom, fortrinsvis dog chlor.

Lavalkanoyl er især propionyl eller butyryl, i første række dog acetyl.

De omhandlede forbindelser med formlen I kan foreligge i form af isomerblandinger eller i form af rene isomere.

De omhandlede lipofile muramylpeptider har en række værdifulde farmakologiske egenskaber, især en udpræget immunpotenserende virkning.

Således bevirker disse forbindelser in vivo en væsentlig stigning af evnen til at danne antistof hos mus. NMRI-mus immuniseres ved intraperitoneal injektion af 10 μg præcipitatfrit BSA på dag 0. 9, 15 og 29 dage senere udtages serumprøver, som undersøges for deres indhold af anti-BSA-antistoffer ved hjælp af en passiv haemagglutinationsteknik. I den anvendte dosis er opløseligt BSA subimmunogent for modtagedyrene, dvs. at det ikke eller kun i ganske ringe grad er i stand til at udløse en produktion af antistoffer. Yderligere behandling af musene med visse immunpotenserende stoffer før eller efter antigenindgivelsen fører til en stigning i antistoftiteren i serumet. Behandlingens virkning udtrykkes ved den opnåede scoreværdi, dvs. ved summen af $\log_2$ titerdifferenserne på de tre blødningsdage.

Ved denne test er forbindelserne med formlen I ved intraperitoneal eller subkutan indgift af 0,5-5 mg/kg dyr på 5 efter hinanden følgende dage efter immuniseringen med BSA i stand til at forøge antistofproduktionen mod BSA signifikant. De er i denne henseende de gængse hydrofile muramylpeptider langt overlegne.

Også manifestationer af den celleformidlede immunitet kan potenseres af de nævnte forbindelser in vivo:

Medens sensibilisering af marsvin med BSA i inkomplet Freund'sk adjuvans kun fører til humoral antistofdannelse, inducerer iblandingen af de omhandlede lipofile muramylpeptider i et dosisområde på 5-50 µg til antigen-olieemulsionen sentype-overfølsomhed over for BSA: 3 uger efter immuniseringen fører den intrakutane injektion af BSA hos disse dyr til en lokal betændelsesreaktion med erythem og hudfortykkelse, som i løbet af 24-48 timer når maksimum. Disse sentype-reaktioner svarer kvantitativt og kvalitativt til de reaktioner, der sædvanligvis fås ved immunisering med BSA i komplet Freund'sk adjuvans (d.v.s. med tilsætning af mycobakterier). ED_{50}-værdien [det nødvendige antal µg/dyr til induktion af en differens i reaktionsvolumen (erythemflade gange hudtykkelsesforøgelse) ved behandlede og ubehandlede dyr på 200 µl, 24 timer efter udløsning] udgør 10-20 µg.

Især skal fremhæves sådanne lipofile muramylpeptiders evne til, ved indgift sammen med BSA i liposomer (æglicithin/cholesterol 4:1, 4 mg/dyr) og uden den toksiske mineralolie-komponent, hos marsvin at inducere en sentype-overfølsomhed mod BSA. Kvantitativt og kvalitativt er denne sentype-reaktion ligeledes identisk med reaktionen, der fremkaldes ved immunisering med BSA i komplet Freund'sk adjuvans. ED_{50}-værdien udgør 100-300 µg pr. dyr.

Forbindelserne med formlen (I) udviser desuden andre kvalitetsforbedringer i forhold til hydrofile muramyldipeptider:

Balb/c-mus immuniseres ved intraperitoneal injektion af 2×10^4 P815 mastocytomceller på dag 0. På dag 15 undersøges miltcellerne fra de således immuniserede dyr in vitro for tilstedeværelse af cytotoksiske, mod P815 mastocytomceller rettede T-lymphocyter. Dertil markeres P815-målcellerne med ^{51}Cr, og størrelsen af den cytotoksiske reaktion bestemmes ved måling af radioaktiviteten i den ovenstående kulturvæske. I den anvendte dosis er P815 mastocytomcellerne subimmunogene for modtager-musene, d.v.s. at de ikke eller kun i ganske ringe grad inducerer cytotoksiske T-celler. Samtidig intraperitoneal indgift af 1-50 µg af de

nævnte muramylpeptider med formlen I fører til en signifikant stigning i dannelsen af cytotoksiske T-celler (faktor 10-30 i forhold til ubehandlede mus).

De immunpotenserende egenskaber ved forbindelserne med formlen (I) kan også i tilfælde med induktion af specifik immuntolerance mod transplantationsantigener påvises ved immunisering med adjuviserede autoblaster hos mus:

I en blandet lymphocytkultur inkuberes miltlymphocyter fra den kommende transplantat-modtager (C57Bl/6J mus) med bestrålede miltceller fra den kommende transplantat-spender (CBA/J mus). T-Lymphocyter med specifikke receptorer for spenderens histokompatibilitetsantigener prolifereres og bliver til blaster. Disse kan adskilles fra de andre celler ved sedimentation. De specifikke blaster eksprimerer de relevante idiotypiske specifiteter for membranreceptorerne og adjuveres med komplet Freund'sk adjuvans (CFA) som autoimmunogene til induktion af specifik tolerance mod de pågældende transplantationsantigener injiceret i de prospektive transplantat-modtagere (C57Bl/6J). Immuniseringen foretages fire gange med fire ugers mellemrum med autologe anti-CBA/J T-lymphoblaster. Adsorbater af T-autoblaster med forbindelserne med formlen (I) (10^9-blaster suspenderes i en opløsning af 20 mg stof i 20 ml PBS. Efter 2 timers inkubering centrifugeres cellerne og vaskes to gange med PBS) er i stand til at inducere specifik immuntolerance i fraværelse af CFA, hvorved absorbatet er lige så virksomt som lymphoblaster i CFA.

Forbindelserne med formlen (I) er desuden i stand til i koncentrationer på 0,5-100 µg/ml i miltcellekulturer fra normale mus at inducere dannelse af antistofproducerende celler [formering af 19S-plaquedannende celler med en faktor på 10-30 i forhold til kontrolværdien (i fraværelse af stimulerende stoffer)]: Der dannes således i nærværelse af de nævnte forbindelser f.eks. specifikke antistoffer mod fåreerythrocyter, uden at der til kulturerne sættes fåreerythrocyter til immunisering. På den anden side kan de anførte stoffer i samme koncentrationsområde også

forøge den immunologe reaktivitet af T-cellefattige miltcellekulturer (fra kongenital athymiske nu/nu-mus) i forhold til et normalt thymusafhængigt antigen (fåreerythrocyter) (faktor 10-30 i forhold til ubehandlede kontrolkulturer). Med de nævnte forbindelser induceres imidlertid in vitro direkte eller indirekte ikke blot proliferations- og synteseeffekter på B-lymphocyter (d.v.s. på potentielt antistofdannende celler), men der formidles også effekter på T-lymphocyter (hvortil hører regulatorisk aktive hjælpe- og suppressorceller samt cytotoksiske effektorceller). Således kan f.eks. de nævnte forbindelser i et koncentrationsområde på 1-20 µg/ml potensere reaktiviteten af cortisonresistente thymusceller overfor allogene, bestrålede stimulatorlymphocyter i væsentlig grad (indtil 10 gange).

De ovenfor omtalte virkninger fremkommer sandsynligvis indirekte ved, at sådanne lipofile muramylpeptider aktiverer makrophager, som igen fremmer reaktiviteten af T- og B-lymphocyter. Faktisk kan man vise, at de nævnte forbindelser allerede i små koncentrationer (0,5-10 µg/ml) frigør store mængder "colony stimulating activity" (CSA) fra musemakrophager (induktion af op til 150-200 kolonier i løbet af 7 dage fra 10^5 museknoglemarvceller efter tilsætning af 20% ovenstående væske fra i 24 timer med stoffet inkuberede makrophagkulturer i sammenligning med 0-5 kolonier ved tilsætning af ovenstående væsker fra ubehandlede makrophagkulturer]. CSA er en biologisk mediator, der er nødvendig for differentieringen af knoglemarv-stamceller til makrophager og polymorphkernede leucocyter. Derved bevirker de omhandlede forbindelser en forøget tilførsel af celler, der er af central betydning for den uspecifikke resistens og for induktionen, forstærkningen og manifestationen af specifikke (lymphocytformidlede) immunreaktioner.

De omhandlede forbindelsers immunpotenserende virkning kan in vivo påvises på følgende måde: Injektionen af et omhandlet phospholipidderivat af muramylpeptid i løbet af 3-9 timer fører således til en kraftig stigning i CSA-koncentrationen i serum (indtil 120 kolonier pr. 10^5 museknog-

lemarvceller efter tilsætning af med chloroform ekstraheret serum [5% slutkoncentration] sammenlignet med 0-5 kolonier ved ubehandlede dyr). Følgelig opnås ved indgivelse af disse forbindelser in vivo kraftig potensering af antistofdannelsesevnen hos mus.

De omhandlede forbindelsers immunpotenserende virkninger kan også demonstreres i tumormodeller, f.eks. ved Ehrlich Ascites-tumor i mus.

En intraperitoneal injektion af 10^6 syngene Ehrlich Ascitestumorceller fører ved Balb/c-mus i løbet af gennemsnitlig 18 dage til dyrenes død. Injicerer man musene intraperitonealt 10^7 (gruppe 1), 10^6 (gruppe 2) og 10^5 (gruppe 3) Ascites-tumorceller, til hvilke man in vitro har sat de omhandlede forbindelser med formlen (I) [10^9 Ascites-tumorceller suspenderes i en opløsning af 40 mg af prøvestoffet i 20 ml phosphatpufret fysiologisk kogsaltopløsning (PBS), og efter 2 timers inkubering ved 37°C centrifugeres cellerne og vaskes to gange med PBS; ved denne behandling inkorporerer cellerne forsøgsforbindelsen i membranen], er der efter 18 dages forløb ingen tumorvækst. Den 19. dag indgives der hvert af dyrene 10^6 native Ehrlich Ascites-tumorceller intraperitonealt. Der konstateres følgende virkninger:

Gruppe 1: 8 ud af 10 dyr overlever den 80. dag.
Gruppe 2: 6 ud af 10 dyr overlever den 80. dag.
Gruppe 3: dyrene dør ligesom kontroldyrene efter 18 dages forløb.

De omhandlede forbindelser har tilmed lav toksicitet. Selv fem gange intraperitoneal indgift i en dosis på 100 mg/kg/dag i 5 på hinanden følgende dage bevirker tilsyneladende ingen symptomer hos dyrene. Da de til immunstimuleringen ndvendige doser er meget små, er de omhandlede forbindelsers terapeutiske bredde meget stor.

De omhandlede forbindelser kan således forøge den cellulære, især den humorale immunitet væsentligt, såvel i blanding med selve antigenet (adjuvanseffekt i snæver forstand) som ved med hensyn til tid og sted fra antigeninjektionen adskilt tilførsel (systemisk immunpotensering).

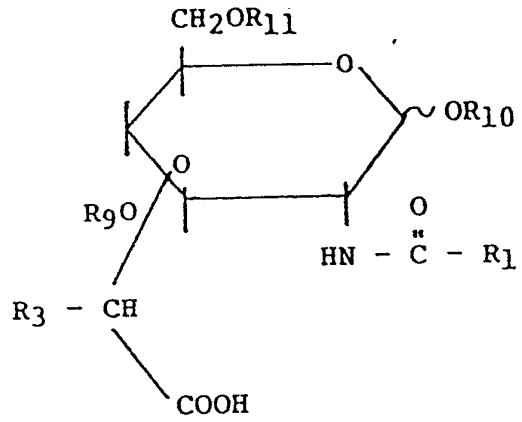
De omhandlede forbindelser kan derfor anvendes som adjuvanser i blanding med vacciner til at forbedre vaccinationsresultatet og den af humorale antistoffer og/eller cellulære immunitet formidlede infektionsbeskyttelse mod bakterielle, virale eller parasitære sygdomsfremkaldere.

Endelig kan de omhandlede forbindelser i blanding med forskellige antigener anvendes som adjuvanser ved den eksperimentelle og industrielle fremstilling af antisera til terapi og diagnostik og ved induktionen af immunologisk aktiverede lymphocyt-populationer til celleoverføringsfremgangsmåder.

Endvidere kan de omhandlede forbindelser også uden samtidig antigentilsætning benyttes til at fremme allerede under tærskelværdien forløbende immunreaktioner hos mennesker og dyr. Forbindelserne er derfor især velegnede til stimulering af legemets forsvar, f.eks. ved kroniske og akutte infektioner eller ved selektive (antigenspecifikke) immunologiske defekter, samt ved medfødte, men også erhvervede almene (d.v.s. ikke antigenspecifikke) immunologiske defekttilstande, som optræder ved alderdom, under svære primærsygdomme og fremfor alt efter behandling med ioniserende stråler eller med immunosuppressivt virkende hormoner. De nævnte forbindelser kan således fortrinsvis også indgives i kombination med antibiotika, kemoterapeutika eller andre lægemidler for at modvirke immunologiske beskadigelser. Endelig kan de omhandlede forbindelser også anvendes til almen profylakse af infektionssygdomme hos mennesker og dyr.

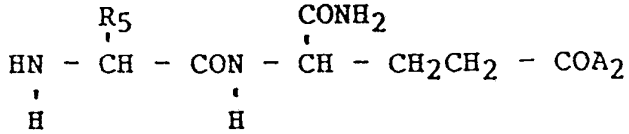
Især angår opfindelsen en analogifremgangsmåde til fremstilling af de hidtil ukendte, i eksemplerne beskrevne muramylpeptider eller salte deraf.

Forbindelserne med formlen I og deres salte kan fremstilles på i og for sig kendt måde. En fremgangsmåde til deres fremstilling er således ejendommelig ved, at man kondenserer en forbindelse med formlen VII



(VII)

hvori
R_1 og R_3 har samme betydning som ovenfor, og
R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,
eller et aktiveret syrederivat deraf,
med en forbindelse med formlen VIII



(VIII)

hvori R_5 og A_2 har samme betydninger som ovenfor,
eller med et aktiveret derivat deraf,
og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes.

Kondensationen gennemføres f.eks. på den måde, at man omsætter syren (VII) i aktiveret form med aminoforbindelsen (VIII), eller at man omsætter syren (VII) med forbindelsen (VIII), hvis aminogruppe foreligger på aktiveret form. Den aktiverede carboxylsyre kan f.eks. være et syreanhydrid, fortrinsvis et blandet syreanhydrid, såsom f.eks. med kulsyrelavalkylester, såsom kulsyreethyl- eller -isobutylester, et syreazid, et syreamid, såsom et imidazolid eller en aktiveret ester. Som aktiverede estere kan især nævnes cyanomethylestere, carboxymethylestere, p-nitrophenylthioestere, p-nitrophenylestere, 2,4,5-trichlorphenylestere, pentachlorphenylestere, N-hydroxysuccinimidestere, N-hydroxyphthalimidestere, 8-hydroxy-quinolinestere, 2-hydroxy-1,2-dihydro-1-carbethoxy-quinolinestere, N-hydroxypiperidinestere eller enolestere, som er dannet med N-ethyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat. Aktiverede estere kan også fremstilles eventuelt med et carbodiimid under tilsætning af N-hydroxysuccinimid eller en usubstitueret eller f.eks. med halogen, methyl eller methoxy substitueret 1-hydroxybenzotriazol eller 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[d]-1,2,3-triazin.

Aminogruppen er eksempelvis aktiveret ved reaktion med et phosphit.

Blandt fremgangsmåderne med omsætning med aktiverede syrer skal især nævnes sådanne med N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat (Woodward Reagens K) eller 2-ethoxy-1,2-dihydro-1-carbethoxy-quinolin eller carbodiimid.

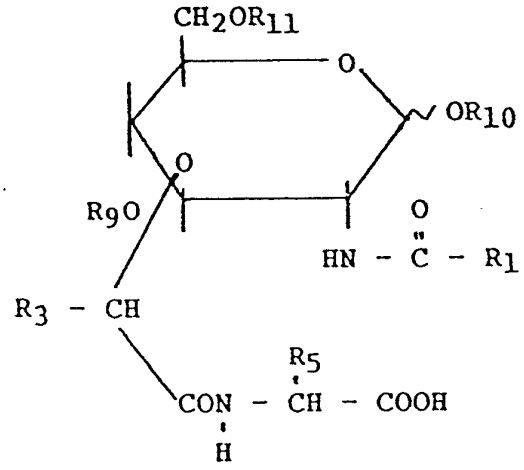
Let fraspaltelige beskyttelsesgrupper er grupper, som er kendt fra peptid- eller kulhydratkemien. Til hydroxygrupper skal især nævnes acylgrupper, f.eks. lavalkanoylgrupper, såsom acetyl, aroylgrupper, såsom benzoyl, og først og fremmest grupper, som er afledt af kulsyrederivater, f.eks. benzyloxycarbonyl eller lavalkoxycarbonyl,

eller alkyl, især tert-butyl, eventuelt med nitro, lavalkoxy eller halogen substitueret benzyl, eventuelt med halogen eller lavalkoxy, såsom methoxy, substitueret triphenylmethyl eller tetrahydropyranyl eller eventuelt substituerede alkylidengrupper, som forbinder oxygenatomerne i 4- og 6-stillingen. Sådanne alkylidengrupper er især en lavalkyliden-, i første række en methylidengruppe, en isopropylidengruppe eller en propylidengruppe, men også en eventuelt substitueret, fortrinsvis i p-stillingen substitueret benzylidengruppe.

Disse beskyttelsesgrupper kan fraspaltes på i og for sig kendt måde, de kan således fjernes ved sur hydrolyse, og benzyl- eller benzylidengrupper kan også fjernes hydrogenolytisk, f.eks. med hydrogen i nærværelse af en ædelmetalkatalysator, såsom en palladium- eller platinkatalysator.

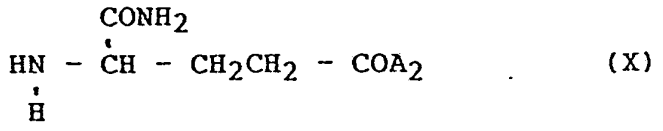
De anvendte udgangsforbindelser er kendte eller kan fremstilles på i og for sig kendt måde.

En anden fremgangsmåde til fremstilling af de omhandlede forbindelser er ejendommelig ved, at man kondenserer en forbindelse med formlen IX



(IX)

hvori
R_1, R_3 og R_5 har samme betydninger som ovenfor, og
R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,
eller et aktiveret syrederivat deraf med en forbindelse med formlen X



(X)

hvori A_2 har samme betydning som ovenfor,
og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes.

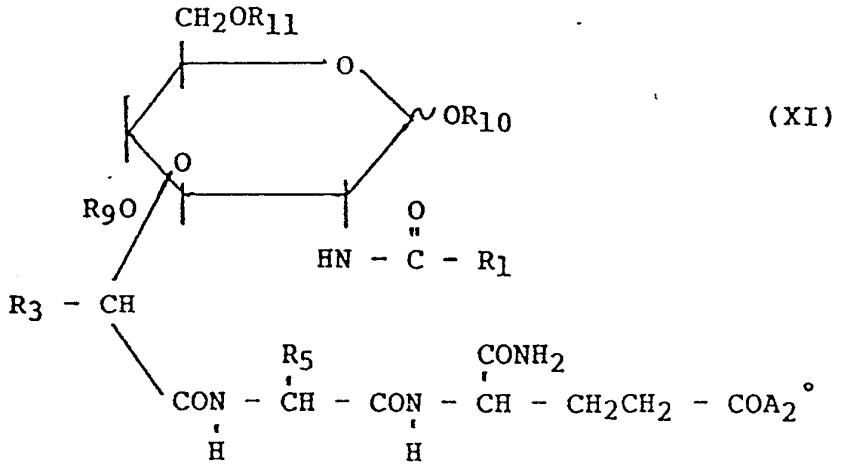
Kondensationen gennemføres f.eks. på den måde, at man omsætter syren (IX) i aktiveret form med aminoforbindelsen (X), eller at man omsætter syren (IX) med forbindelsen (X), hvis aminogrupper foreligger på aktiveret form. Den aktiverede carboxylgruppe kan eksempelvis være et syreanhydrid, f.eks. et blandet syreanhydrid, et syreamid eller en aktiveret ester. Som sådanne anvendes især de ovennævnte syreanhydrider, amider eller estere. Aminogruppen er eksempelvis aktiveret ved omsætning med et phosphit.

Også de let fraspaltelige beskyttelsesgrupper svarer til de ovenfor anførte. De kan fraspaltes på i og for sig kendt måde ved sur hydrolyse, benzyl- eller benzylidengrupperne også hydrogenolytisk, f.eks. med hydrogen i nærværelse af en ædelmetalkatalysator, såsom en palladium- eller platinkatalysator.

Udgangsforbindelserne kan fremstilles på i og for sig kendt måde. Således kan man eksempelvis omsætte tilsvarende i 3-stillingen usubstituerede carbohydrater med en halogen-R_3-acetamido-R_5-eddikesyre, eller man kan

omsætte en forbindelse med formlen VII med en amino-R_5-eddikesyre, hvis carboxylgruppe er beskyttet på den ovenfor viste måde, og fraspalte beskyttelsesgrupperne.

En anden fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori T betyder NH, kon- denserer en forbindelse med formlen XI



(XI)

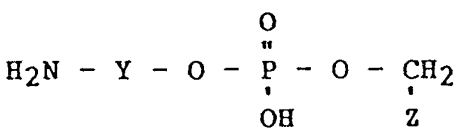
hvori

R_1, R_3 og R_5 har samme betydning som ovenfor,

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe, og

COA_2° betyder en aktiveret carboxylsyregruppe,

med en forbindelse med formlen XII



(XII)

hvori Y og Z har samme betydning som ovenfor,

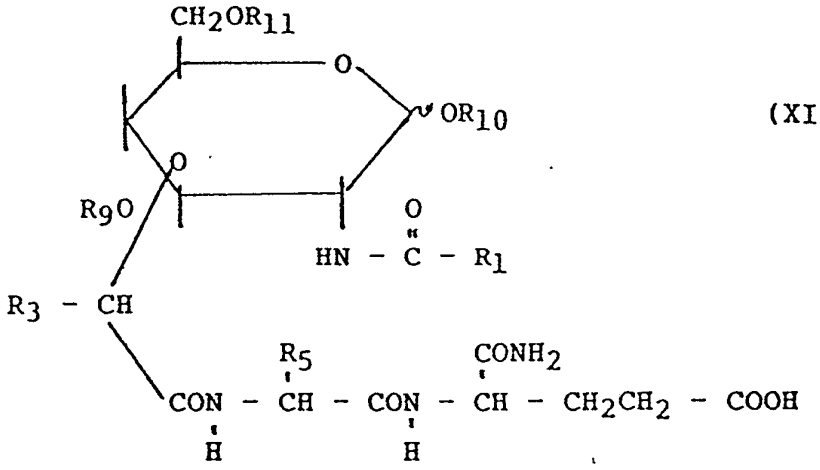
og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes.

Den aktiverede carboxylsyregruppe COA_1^o eller COA_2^o kan eksempelvis være et syreanhydrid, f.eks. med kulsyrelavalkylester, som kulsyreethyl- eller isobutylesteren, et syreazid, et syreamid, såsom et imidazolid, isoxazolid eller en aktiveret ester. Som aktiverede estere skal især nævnes cyanomethylestere, carboxymethylestere, p-nitrophenylthioestere, methoxyethylthioestere, acetylaminoethylthioestere, p-nitrophenylestere, 2,4,5-trichlorphenylestere, N-hydroxysuccinimidestere, N-hydroxyphthalimidestere, 8-hydroxyquinolinestere og N-hydroxypiperidinestere. Aktive estere kan eventuelt også fremstilles med et carbodiimid under tilsætning af N-hydroxysuccinimid eller en usubstitueret eller f.eks. med halogen, methyl eller methoxy substitueret 1-hydroxybenzotriazol eller 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-benzo[d]-1,2,3-triazin.

Som aktive estre foretrækker man sådanne med N-hydroxysuccinimid eller deres C-substitutionsprodukter, såsom N-hydroxy-methylsuccinimid eller -dimethylsuccinimid, eller omsætningen med carbodiimid, såsom carbodiimid selv eller 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid.

De dertil anvendte udgangsstoffer er kendte eller kan fremstilles på i og for sig kendt måde.

En anden fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori T betyder oxygen, forestrer en forbindelse med formlen XIa



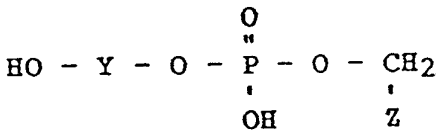
(XIa)

hvori

R_1, R_3 og R_5 har samme betydninger som ovenfor, og

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,

med en forbindelse med formlen XIIa



(XIIa)

hvori Y og Z har samme betydninger som ovenfor, idet syren XIa eller alkoholen XIIa foreligger i en reaktiv form, og eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes.

Denne reaktion kan gennemføres på den måde, at man forestrer den frie syre med alkoholen i nærværelse af et vandfraspaltende mddel, såsom et carbodiimid, f.eks. dicyclohexylcarbodiimid, og en amin, såsom pyridin eller dimethylaminopyridin, en trialkylamin, f.eks. trimethylamin. Man kan imidlertid også omsætte carboxylsyren, f.eks. i form af et salt, såsom et natrium- eller kalium-

salt, med en reaktionsdygtig ester af alkoholen, f.eks. en ester med en stærk uorganisk eller organisk syre, såsom en hydrogenhalogenidsyre, f.eks. hydrogenchloridsyre, hydrogenbromidsyre eller hydrogeniodidsyre, eller en organisk sulfonsyre, såsom p-toluensulfonsyre eller methan- eller ethansulfonsyre.

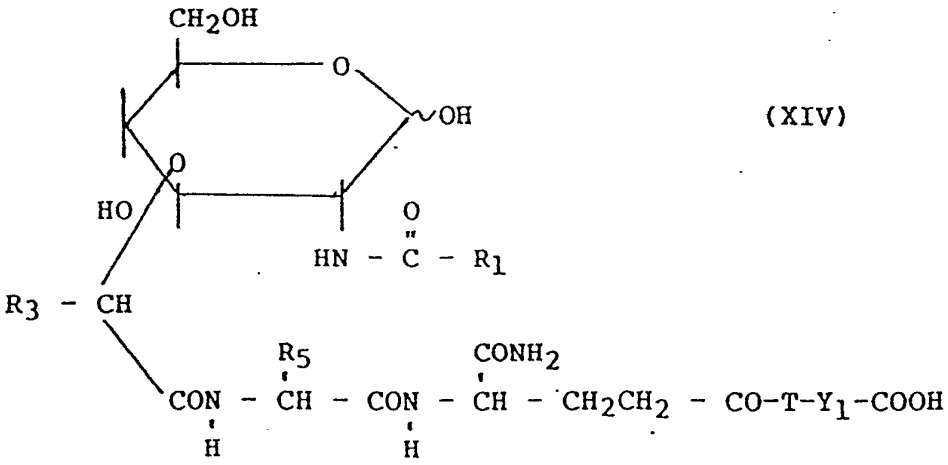
Det er endvidere også muligt eventuelt at omsætte alkoholen i form af et salt, f.eks. et natrium- eller kaliumsalt, med en aktiveret carboxylsyre. Som aktiverede carboxylsyrer anvendes især anhydrider, i første række blandede syreanhydrider, såsom et syreazid eller -halogenid, eller aktiverede estere, såsom cyanomethylestere, carboxymethylestere, p-nitrophenylthioestere, p-nitrophenylestere, 2,4,5-trichlorphenylestere, pentaclorphenylestere, N-hydroxysuccinimidestere, N-hydroxyphthalimidestere, 8-hydroxy-quinolinestere, 2-hydroxy-1,2-dihydro-1-carbethoxy-quinolin-estere, N-hydroxypiperidinestere eller enolestere, som kan fremstilles med N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat. Aktiverede estere kan også eventuelt fremstilles med et carbodiimid eller tilsætning af N-hydroxysuccinimid eller en usubstitueret eller f.eks. med halogen, methyl eller methoxy substitueret 1-hydroxybenzotriazol eller 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-benzo[d]-1,2,3-triazin.

Let fraspaltelige beskyttelsesgrupper er sådanne, som er kendt fra peptid- og kulhydratkemien. Til hydroxygrupper anvendes især acylgrupper, f.eks. lavalkanoylgrupper, såsom acetyl, aroylgrupper, såsom benzoyl, og først og fremmest grupper afledt af kulsyre, f.eks. benzyloxycarbonyl og lavalkoxycarbonyl, eller alkyl, især tert-butyl, eventuelt med nitro, lavalkoxy eller halogen substitueret benzyl, eventuelt med halogen eller lavalkoxy, såsom methoxy, substitueret triphenylmethyl eller tetrahydropyranyl eller eventuelt substituerede alkylidengrupper, som forbinder oxygenatomerne i 4- og 6-stil-

lingen. Sådanne alkylidengrupper er især en lavalkylidengruppe, i første række ethyliden-, isopropyliden- eller propylidengruppen, eller også en eventuelt substitueret, fortrinsvis i p-stilling substitueret benzylidengruppe.

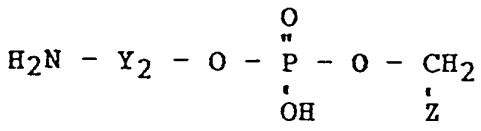
Disse beskyttelsesgrupper kan fraspaltes på i og for sig kendt måde. De kan således fjernes ved sur hydrolyse, og benzyl- eller benzylidengruppen tillige hydrogenolytisk, f.eks. med hydrogen i nærværelse af en ædelmetalkatalysator, såsom en palladium- eller platinkatalysator.

En anden fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori Y betyder en gruppe $-Y_1-CONH-Y_2-$, kondenserer en forbindelse med formlen XIV



(XIV)

hvori R_1, R_3, R_5, T og Y_1 har samme betydninger som ovenfor,
eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf,
med en forbindelse med formlen XVI



(XVI)

hvori Y_2 og Z har samme betydninger som ovenfor, idet de deri forekommende hydroxygrupper eventuelt er beskyttede med let fraspaltelige beskyttelsesgrupper, eller med et aktiveret derivat deraf, og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes.

Let fraspaltelige beskyttelsesgrupper er sådanne, der er kendt fra peptid- eller kulhydratkemien. Til hydroxygrupper anvendes især acylgrupper, f.eks. lavalkanoylgrupper, såsom acetyl, aroylgrupper, såsom benzoyl, og først og fremmest grupper afledt af kulsyre, såsom benzyloxycarbonyl eller lavalkoxycarbonyl, eller alkyl, især tert-butyl, eventuelt med nitro, lavalkoxy eller halogen substitueret benzyl eller tetrahydropyranyl eller eventuelt substituerede alkylidengrupper, som forbinder oxygenatomerne i 4- og 6-stillingen. Sådanne alkylidengrupper er især en lavalkylidengruppe, først og fremmest en ethylidengruppe, en isopropylidengruppe eller en propylidengruppe, eller også en eventuelt substitueret, fortrinsvis i p-stillingen substitueret benzylidengruppe.

Disse beskyttelsesgrupper kan fraspaltes på i og for sig kendt måde. Således kan man fjerne dem ved sur hydrolyse, og benzyl- og benzylidengrupper tillige hydrogenolytisk, f.eks. med hydrogen i nærværelse af en ædelmetalkatalysator, såsom en palladium- eller platinkatalysator.

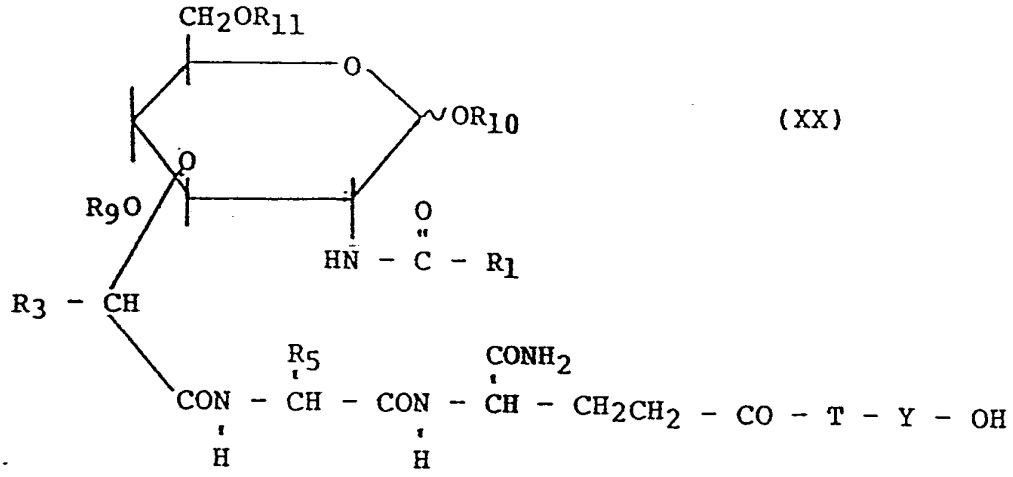
De anvendte udgangsstoffer er kendte forbindelser eller kan fremstilles på i og for sig kendt måde.

Kondensationen gennemføres f.eks. på den måde, at man omsætter forbindelsen (XIV) i form af den aktiverede carboxylsyre med aminoforbindelsen (XVI), eller at man omsætter syren (XIV) med forbindelsen (XVI), hvis aminogruppe foreliggerz på aktiveret form. Den aktiverede carboxylgruppe kan eksempelvis være et syreanhydrid, fortrinsvis et blandet syreanhydrid, såsom f.eks. med kulsyrelavalkylster, som f.eks. kulsyreethyl- eller isobutylester, et syreazid, et syreamid, såsom et imidazolid, isoxazolid eller en aktiveret ester. Som aktiverede estere anvendes især følgende: cyanomethylestere, carboxymethylestere, p-nitrophenylthioestere, p-nitrophenylestere, 2,4,5-trichlorphenylestere, pentachlorphenylestere, N-hydroxysuccinimidestere, N-hydroxyphthalimidestere, 8-hydroxyquinolinestere, 2-hydroxy-1,2-dihydro-1-carboethoxy-quinolinestere, N-hydroxypiperidinestere eller enolestere, som kan fremstilles med N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat. Aktiverede estere kan også eventuelt fremstilles med et carbodiimid under tilsætning af N-hydroxysuccinimid eller en usubstitueret eller f.eks. med halogen, methyl eller methoxy substitueret 1-hydroxybenzotriazol, 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-benzo[d]-1,2,3-triazin.

Aminogruppen er aktiveret f.eks. ved reaktion med et phosphit.

Blandt fremgangsmåderne ved omsætningen med aktiverede syrer anvendes især sådanne med N-ethyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (Woodward Reagens K) eller 2-ethoxy-1,2-dihydro-1-carbethoxy-quinolin eller carbodiimid.

En yderligere fremgangsmåde til fremstilling af forbindelserne med formlen I består i, at man omsætter en forbindelse med formlen XX

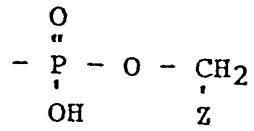


(XX)

hvori

R_1, R_3, R_5, T og Y har samme betydninger som ovenfor, og R_9, R_{10} og R_{11} betyder let fraspaltelige beskyttelsesgrupper,

med en forbindelse, der afgiver en gruppe med formlen XXI

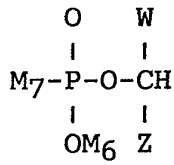


(XXI)

hvori Z har samme betydning som ovenfor,

og fraspalter tilstedeværende beskyttelsesgrupper.

Som forbindelser, der afgiver gruppen med formlen XXI, anvendes især forbindelser med formlen



(XXII)

hvori W og Z har de ovenfor angivne betydninger, M_6 betyder en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe, og M_7 er eventuelt reaktionsdygtigt omdannet hydroxy.

En let fraspaltelig beskyttelsesgruppe M_6 er især lavalkyl, såsom methyl eller ethyl, lavalkenyl, såsom ethenyl eller 1-methyl-propenyl, eller benzyl.

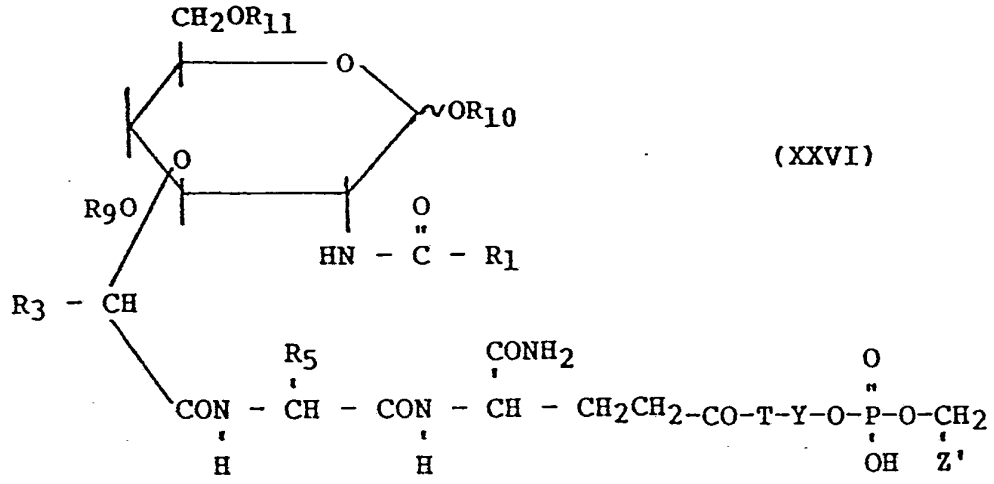
Eventuelt reaktionsdygtigt omdannet hydroxy M_7 er især den fri hydroxygruppe, en med en stærk uorganisk eller organisk syre forestret hydroxygruppe, f.eks. en med en hydrogenhalogenidsyre, lavalkancarboxylsyre eller aryl- eller alkylsulfonsyre, f.eks. p-toluensulfonsyre, methan- eller ethansulfonsyre forestret hydroxygruppe. Den kan imidlertid også være en phenoxy- eller lavalkoxygruppe.

Denne omsætning gennemføres fortrinsvis i nærværelse af et syrebindende middel, såsom pyridin, trilavalkylamin, f.eks. triethylamin eller trimethylamin, en imidazol eller en uorganisk base, såsom natrium- eller kaliumhydroxid, eller natrium- eller kaliumalkoholat, idet man som opløsningsmiddel fortrinsvis anvender et aprot opløsningsmiddel, såsom dimethylsulfoxid eller acetonitril.

Fraspaltningen af en beskyttelsesgruppe M_6 foregår for det meste samtidig med fraspaltningen af de øvrige beskyttelsesgrupper. Disse kan fjernes på i og for sig kendt måde, f.eks. hydrogenolytisk, såsom med hydrogen i nærværelse af en ædelmetalkatalysator, såsom en palladium- eller platinkatalysator, eller ved sur hydrolyse.

Udgangsstofferne er kendte forbindelser og kan fremstilles på i og for sig kendt måde, f.eks. ifølge en af de ovennævnte tilsvarende afledte fremgangsmåder.

Endvidere kan man fremstille forbindelserne med formlen I ved en fremgangsmåde, der er ejendommelig ved, at man forestre en forbindelse med formlen XXVI



(XXVI)

hvori

R_1, R_3, R_5, T og Y har samme betydninger som ovenfor, R_9, R_{10} og R_{11} betyder let fraspaltelige beskyttelsesgrupper, og

Z betyder en 1,2-dihydroxyethylgruppe, hvori en af hydroxygrupperne er forestret med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer, en 1,2-dihydroxyethylgruppe eller en 2-hydroxyethylgruppe, med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer og fraspalter beskyttelsesgrupperne.

Forestringen gennemføres på i og for sig kendt måde. Således anvender man fortrinsvis den aliphatiske carboxylsyre i form af et reaktionsdygtigt derivat, såsom et anhydrid, fortrinsvis et blandet anhydrid, f.eks. med en hydrogenhalogenidsyre.

Fraspaltningen af beskyttelsesgrupperne, som svarer til de ovenfor anførte, gennemføres på i og for sig kendt måde, især ved hydrogenolyse eller ved sur hydrolyse.

Udgangsstofferne kan f.eks. fremstilles ved en af de ovenfor anførte tilsvarende afledte fremgangsmåder.

En yderligere fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man i en forbindelse med formlen I, hvori en eller flere funktionelle grupper er beskyttet med beskyttelsesgrupper, fraspalter disse.

Mulige beskyttelsesgrupper og deres fraspaltning er beskrevet ovenfor. Udgangsforbindelserne fås f.eks. ved, at man afbryder en af de ovenfor beskrevne fremgangsmåder før den fuldstændige fraspaltning af beskyttelsesgrupperne.

Om ønsket omdannes en opnået forbindelse med formlen I efter udførelse af enhver af de ovennævnte fremgangsmåder til et salt deraf.

De ovenfor beskrevne fremgangsmåder gennemføres under anvendelse af i og for sig kendte metoder i fraværelse eller fortrinsvis i nærværelse af fortyndings- eller opløsningsmidler, om nødvendigt under afkøling eller opvarmning, under forhøjet tryk og/eller i en indifferent gasatmosfære, såsom en nitrogenatmosfære.

Ved gennemførelsen af disse fremgangsmåder skal der tages hensyn til alle i molekylet tilstedeværende substituenter, om nødvendigt, især ved tilstedeværelsen af let hydrolyserbare O-acylgrupper, under anvendelse af særlig skånsomme reaktionsbetingelser, såsom korte reaktionstider, anvendelse af milde sure eller basiske midler i lave koncentrationer, støkiometriske mængdeforhold, valg af egnede katalysatorer, opløsningsmidler, temperatur- og/eller trykbetingelser.

Forbindelserne med formlen I kan eksempelvis anvendes i form af farmaceutiske præparater, som indeholder forbindelserne med formlen I. Disse farmaceutiske præparater er præparater til enteral, såsom oral, nasal eller rektal, samt parenteral indgift til varmblodede dyr, og som indeholder det farmakologisk aktive stof alene eller sammen med et farmaceutisk anvendeligt bæremateriale. Doseringen af det aktive stof afhænger af det varmblodede dyrs art, alder og individuelle tilstand samt indgiftsmåden.

Disse farmaceutiske præparater indeholder fra ca. 10 til ca. 95%, fortrinsvis fra ca. 20 til ca. 90%, aktivt stof. De farmaceutiske præparater kan f.eks. foreligge på dosisenhedsform, såsom dragéer, tabletter, kapsler, suppositiorier eller ampuller.

De farmaceutiske præparater fremstilles på i og for sig kendt måde, f.eks. under anvendelse af konventionelle blande-,granulerings-, dragérings-, opløsnings- eller lyofiliseringsfremgangsmåder. Foruden de ovenfor anførte indgiftsformer kan der også fremstilles farmaceutiske præparater, især til oral anvendelse, idet man kombinerer det aktive stof med faste bærestoffer, eventuelt granulerer en fremstillet blanding og forarbejder blandingen eller granulatet, om ønsket eller om nødvendigt efter tilsætning af egnede hjælpestoffer til tabletter eller dragékerner. Det aktive stof kan derved inkorporeres i et kunststofbæremateriale, der afgiver det aktive stof på reguleret måde eller lader det difundere.

Egnede bærestoffer er især fyldstoffer, såsom kulhydrater, f.eks. lactose, saccharose, mannitol eller sorbitol, cellulosepræparater og/eller calciumphosphater, f.eks. tricalciumphosphat eller calciumhydrogenphosphat, endvidere bindemidler, såsom stivelseklister, under anvendelse af f.eks. majs-, hvede-, ris- eller kartoffelstivelse, gelatine, traganth, methylcellulose, hydroxypropyl-methylcellulose, natriumcarboxymethylcellulose og/eller polyvinylpyrrolidon,og/eller, om ønsket, disintegreringsmidler, såsom de ovennævnte stivelsesarter, endvidere carboxymethylstivelse, tværbundet polyvinylpyrrolidon, agar, alginsyre eller et salt deraf, såsom natriumalginat. Hjælpemidler er i første række strømningsreguleringsmidler eller smøremidler, f.eks. kiselsyre, talkum, stearinsyre eller salte deraf, såsom magnesium- eller calciumstearat, og/eller polyethylenglycol. Dragékerner forsynes med egnede, eventuelt mavesaftresistente overtræk, hvorved man blandt andet anvender koncentrerede sukkeropløsninger, som eventuelt indeholder gummiarabicum, talkum, polyvinylpyrrolidon, polyethylenglycol og/eller titandioxid, lakopløsninger i egnede organiske opløsningsmidler eller opløsningsmiddelblandinger eller, til fremstilling af mavesaftresistente overtræk, opløsninger af egnede cellulosepræparater, såsom acetylcellulosephthalat eller hydroxypropylmethylcel-

lulosephthalat. Tabletterne eller dragéovertrækkene kan indeholde farvestoffer eller pigmenter, f.eks. til identificering eller til karakterisering af forskellige doser af aktivt stof.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

Forbindelserne med formlen I kan ikke karakteriseres ved et smeltepunkt, og endvidere er spektroskopiske data, såsom NMR- og IR-data uegnede til karakterisering af forbindelserne.

Endvidere er Rf-værdier uegnede til finkarakterisering på grund af den dominerende natur af lipiddelene.

Da imidlertid udgangsmaterialernes struktur er nøje kendt (jf. tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.655.500, de enkelte anvendte phospholipidkomponenter er kommercielt tilgængelige), og da bindingen mellem phospholipid og muramylpeptid er éntydig, er dermed også sekvensen af byggestenene i slutproduktet og dets struktur éntydigt fastlagt.

I forbindelserne med formlen I kan den over et oxygenatom til phosphor bundne proton let fraspaltes med baser. Sædvanligvis foreligger forbindelserne med formlen I i form af en blanding af de frie forbindelser og deres salte. Således foreligger de i de efterfølgende eksempler beskrevne muramylpeptider med formlen I for ca. 40-55%'s vedkommende som salte. Disse salte, f.eks. natriumsalte, hører til de ifølge opfindelsen fremstillelige slutprodukter. Der foretrækkes farmaceutisk anvendelige, ugiftige salte, f.eks. sådanne metal- eller ammoniumsalte.

Eksempel 1.

Til en opløsning af 1,4 mmol 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og 2,5 ml mmol triethylamin i 25 ml af en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4 sættes dråbevis en opløsning af 2 mmol N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxy-succinimidester i 6,5 ml dimethylacetamid. Efter omrøring i 18 timer ved 20°C inddampes opløsningen ved formindsket tryk til ca. 15 ml, hvorved der dannes en emulsion. Denne emulsion fortyndes med 200 ml vand og frysetørres. Remanensen suspenderes i 30 ml vand og dialyseres extensivt mod vand. Det indre dialysat, som indeholder det ønskede produkt, frysetørres. N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid renses ved kromatografering på en søjle af "Sephadex"® LH-20. Som elueringsmiddel anvendes en blanding af chloroform, methanol, eddikesyre og vand i blandingsforholdet 25:15:4:2. Ved tyndtlagskromatografering på silicagel giver forbindelsen følgende Rf-værdi: 0,31 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4) eller 0,64 (i en blanding af chloroform, methanol, eddikesyre og vand i blandingsforholdet 25:15:4:2).

Den hidtil ukendte forbindelse karakteriseres analytisk ved, at byggestenene - N-acetylmuraminsyre, palmitinsyre, phosphat, L-alanin og D-isoglutaminsyre - bestemmes kvantitativt: N-acetylmuraminsyre bestemmes spektrofotometrisk ved hjælp af Morgan-Elson-reaktionen ifølge modifikationen af J.M. Ghuysen et al.,"Methods in Enzymology" 8, 629 (1966).

Der foretages kvantitativ phosphatbestemmelse ifølge Lowry et al., J. Biol. Chem. 207, 1 (1954).

Palmitinsyre og aminosyrerne bestemmes kvantitativt i et totalhydrolysat (6 N saltsyre, 24 timer, 110°C) ved gaskromatografering eller ved hjælp af en aminosyreanalysator under anvendelse af pentadecansyre eller norleucin

som interne standarder.

De fundne molforhold beregnet på phosphat er som følger:

PO_4"':N-acetylmuraminsyre:L-alanin:D-glutaminsyre:palmitinsyre = 1:0,92:0,91:0,95:2,18.

N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidesteren, der anvendes som udgangsstof, kan eksempelvis fremstilles på følgende måde:

2 mmol N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, 2,2 mmol N-hydroxysuccinimid og 2,2 mmol dicyclohexylcarbodiimid opløses i 6,5 ml dimethylacetamid og omrøres i 18 timer ved 20°C. Det udfældede dicyclohexylurinstof isoleres, og opløsningen anvendes direkte til kondensationen med phospholipidet.

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin, der anvendes som udgangsstof, er et kommercielt tilgængeligt syntetisk præparat.

Eksempel 2.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid ud fra 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidester. Ved tyndtlagskromatografering på silicagel fås følgende Rf-værdier:

0,29 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4) og 0,65 (i en blanding af chloroform, methanol, eddikesyre og vand i blandingsforholdet 25:15:4:2).

Eksempel 3.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-γ-oxymethylcarbonyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid ud fra 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og N-hydroxysuccinimidesteren af N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-γ-carboxymethylester.

Tyndtlagskromatografering på kiselgel giver forbindelsen følgende Rf-værdier: 0,28 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4) og 0,68 (i en blanding af chloroform, methanol, eddikesyre og vand i blandingsforholdet 25:15:4:2).

Eksempel 4.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid ud fra 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester. Ved tyndtlagskromatografering på silicagel opnås følgende Rf-værdi: 0,3 (i systemet chloroform-methanol-vand i blandingsforholdet 65:25:4).

Eksempel 5.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-O-di-hexadecyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid ud fra 1,2-O-hexadecyliden-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidester. Ved tyndtlagskromatografering på kiselgel fås Rf-værdien 0,43 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4).

Den som udgangsstof anvendte 1,2-O-dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin er et kommercielt tilgængeligt

syntetisk præparat.

Eksempel 6.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(3'-palmitoyl-rac-glycero-1'-phosphoryl)ethylamid ud fra 3-palmitoyl-rac-glycero-1-phosphoryl-ethanolamin og N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidester. Ved tyndtlagskromatografering på kiselgel fås Rf-værdien 0,47 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4).

Den som udgangsstof anvendte 3-palmitoyl-rac-glycero-1-phosphoryl-ethanolamin er et kommercielt tilgængeligt syntetisk præparat.

Eksempel 7.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-2'-oleoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid ud fra 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin og N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidester. Ved tyndtlagskromatografering på kiselgel fås Rf-værdien 0,33 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:24:4).

Den som udgangsstof anvendte 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin er et kommercielt tilgængeligt syntetisk præparat.

Eksempel 8.

Analogt med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid ud fra 1-palmitoyl-propandiol-3-phosphoryl-ethanolamin og N-acetyl-

demethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-N-hydroxysuccinimidester.

Ved tyndtlagskromatografering på kiselgel fås Rf-værdien 0,49 (i en blanding af chloroform, methanol og vand i blandingsforholdet 65:25:4).

Den som udgangsstof anvendte 1-palmitoyl-propandiol-3-phosphoryl-ethanolamin er et kommercielt tilgængeligt syntetisk præparat.

Eksempel 9.

Analogt med den i de ovenstående eksempler beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-glycero-phospholipidderivater ved kondensation af N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin med følgende phospholipider:

1,2-O-hexadecyliden-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
3-palmitoyl-rac-glycero-1-phosphoryl-ethanolamin,
1-palmitoyl-propandiol-3-phosphoryl-ethanolamin.

Eksempel 10.

Analogt med den i de ovenstående eksempler beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-glycerophospholipidderivater ved kondensation af N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin med følgende phospholipider:

1,2-O-hexadecyliden-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
3-palmitoyl-rac-glycero-1-phosphoryl-ethanolamin, R_f (slutprodukt) = 0,22 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),
1-palmitoyl-propandiol-3-phosphoryl-ethanolamin.

Eksempel 11.

Analogt med den i de ovenstående eksempler beskrevne fremgangsmåde fremstiller man N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D- isoglutaminyl-L-alanyl-glycerophospholipidderivater ved kondensation af N-acetyldemethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin med følgende phospholipider:

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
R_f (slutprodukt) = 0,39 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),
1,2-O-hexadecyliden-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin,
3-palmitoyl-rac-glycero-1-phosphoryl-ethanolamin,
R_f (slutprodukt) = 0,16 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),
1-palmitoyl-propandiol-3-phosphoryl-ethanolamin.

Udgangsstoffer kan fremstilles på følgende måde:
A) Til en opløsning af 6 g (10 mmol) α-benzyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin og 1,75 ml (11 mmol) bromeddikesyre-benzylester i 100 ml dimethylformamid sættes dråbevis under udelukkelse af fugtighed og under god omrøring 1,87 ml (11 mmol) N,N-diisopropyl-ethylamin opløst i 50 ml dimethylformamid i løbet af 1 1/4 time. Efter omrøring natten over ved stuetemperatur befries reaktionsblandingen for dimethylformamid i højvakuum, og til remanensen sættes 100 ml vand. Den udfældede olie størkner hurtigt og gennemkrystalliserer. Efter omrøring i isbad frasuges suspensionen, de dannede krystaller vaskes med noget vand og tørres over phosphorpentoxid.
Efter resuspendering af krystallerne i petroleumsether, filtrering og tørring ved 50°C fås 6,2 g (85% af det teoretiske) farveløse krystaller med smp. 195-198°C, $[\alpha]_D^{20}$ +1° (c = 1,3, methanol).

B) 6,5 g (8,85 mmol) α-benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin-γ-benzyloxycarbonylmethylester behandles i 200 ml af en blanding af methanol og vand i blandingsforholdet 1:1 i nærværelse af 0,5 g 10%'s palladium-på-kul i 40 timer ved 40°C med hydrogen.

Katalysatoren fjernes fra reaktionsblandingen på sædvanlig måde, og filtratet inddampes til tørhed.

Den fremkomne olie opløses i 75 ml vand mættet med sek-butanol,og der ekstraheres med seks gange 50 ml sek-butanol mættet med vand og én gang med ethylacetat. De organiske faser tilbageekstraheres med vand (som ovenfor), og de rensede vandige faser inddampes til tørhed efter behandling med kul (Darco G 60). Remanensen tilsættes vand og inddampes, dette gentages, hvorefter der lyofiliseres. Man får 4,0 g (82% af det teoretiske) hvidt lyofilisat, $[\alpha]_D^{20}$ +34 $\pm$ 1° (c = 0,8, vand).

C) 6,1 g α-benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin og 3,5 g L-alaninbenzylester-hydrochlorid opløses i 30 ml dimethylformamid, opløsningen afkøles til 0°C, og der tilsættes 1,4 ml triethylamin, 1,1 g N-hydroxysuccinimid og derpå 2,3 g dicyclohexylcarbodiimid.

Efter omrøring i 48 timer ved stuetemperatur filtreres suspensionen, bundfaldet vaskes med lidt dimethylformamid, og filtratet inddampes i højvakuum til tørhed. Remanensen suspenderes i 100 ml vand ved 0°C, bundfaldet frafiltreres og tørres og omkrystalliseres fra en blanding af methanol og vand.

På denne måde fås 5,5 g (74% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{20}$ +70 + 1° (c = 0,5, methanol).

D) 3,4 g α-benzyl-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alaninbenzylester opløst i 100 ml af en blanding af methanol og vand i blandingsforholdet 2:1 behandles i nærværelse af 10%'s palladium-på-kul i 40 timer med hydrogen. Katalysatoren frafiltreres under sugning, filtratet inddampes næsten til tørhed, og efter omrøring af remanensen i 40 ml vand mættet med sek-butanol ekstraheres der med tre gange 40 ml sek-butanol mættet med vand.

Efter tilbageekstraktion af den organiske fase med vand (3 x 40 ml, se ovenfor) inddampes de sammenblandede vandekstrakter, hvorefter de lyofiliseres.

Der fås 2,2 g (80% af det teoretiske) farveløst pulver med $[\alpha]_D^{20}$ +9 ± 1° (c = 1,1, vand).

Eksempel 12.

På analog måde fremstilles de i det følgende anførte forbindelser (analyseværdierne bestemmes som i eksempel 1):

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid, R_f = 0,48 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-muramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)

ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethyl-amid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid, R_f = 0,32 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-palmitoyl-propandiol-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dihexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1'-hexadecyl-rac-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',3'-dipalmitoyl-glycero-2'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-α-glycinamid-γ-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-glutamyl-α-glycinamid-γ-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-alanyl-D-glutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-seryl-D-glutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-demethylmuramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-α-aminobutyryl-D-glutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-valyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-valyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-propionyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-

dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-propionyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid, R_f = 0,16 (chloroform/methanol/vand 65:25:4),

N-acetyl-muramyl-L-prolyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-prolyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-normuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-benzoyl-normuramyl-L-α-aminobutyryl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl) ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid,

N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid.

Eksempel 13.

En opløsning af 1,5 mol N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester i 5 ml dimethylacetamid dryppes til en opløsning af 1 mmol 2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid og 3,5 mmol N-ethylmorpholin i 25 ml chloroform/methanol/vand = 65:25:4 ved stuetemperatur. Efter 8 timers omrøring ved stuetemperatur (ca. 22°C) er reaktionen afsluttet. Der sættes 130 ml vand til reaktionsblandingen.

Efter at de organiske opløsningsmidler er fjernet under formindsket tryk, filtreres den fremkomne vandige opløsning, der stadig kan indeholde nogen methanol, gennem et teflon-milliporefilter (5 μm). Det omrørte filtrat dialyseres i en Amicon ultrafilterringscelle gennem en Amicon YM 10-membran successivt mod 400 ml vand, 200 ml vandig 0,1 M natriumphosphatpuffer/0,1 M natriumchloridopløsning pH 7 og 850 ml vand i diafiltreringsprocessen. Det indre dialysat filtreres gennem et milliporefilter (0,45 μm) og frysetørres, hvorpå der fås N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid, som overvejende eller fuldstændig foreligger i form af sit natriumsalt, R_f = 0,30 (chloroform/methanol/vand = 65:25:4).

Eksempel 14

1 mmol 1α-benzyl-N-acetyl-4,6-isopropylidenmuraminsyre, 0,9 mmol L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2')-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid i en blanding af 15 ml dimethylformamid, 10 ml tetrahydrofuran og 2 ml pyridin sættes 1,2 mmol dicyclohexylcarbodiimid og 1,3 mmol N-hydroxysuccinimid. Efter 24 timer ved stuetemperatur er reaktionen afsluttet. Der tilsættes nogle dråber vand, det dannede dicyclohexylurinstof frafiltreres, og filtratet inddampes til tørhed i vakuum.

Remanensen renses ved kromatografi på kiselgel Merck i chloroform/methanol = 7:3. De fraktioner, der indeholder det ønskede slutprodukt, reagerer på en tyndtlagsplade (kiselgel, Merck) positivt med phosphatreagens ifølge V.E. Vaskovsky og E.Y. Kostetsky, J. Lipid. Res. 9, 396 (1968) og positivt med 2 N svovlsyre i varmen (brunfarvning af sukker). De inddampes og holdes først til fjernelse af beskyttelsesgrupperne i en time ved 50°C i en blanding af 12 ml iseddike og 8 ml vand og hydrogeneres derpå ved stuetemperatur under normalt tryk med 10%'s palladium på carbon. Efter 20 timer er α-benzylgruppen fjernet; katalysatoren filtreres fra, og filtratet inddampes i vakuum til en sirup. Således fås det sirupagtige pyridiniumsalt af N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid, der opløses i 150 ml vand.

Den vandige opløsning filtreres gennem et milliporefilter af teflon (porestørrelse 5 μm). Filtratet dialyseres i en Amicon ultrafiltreringscelle under omrøring gennem en Amicon YM 10-membran ved diafiltreringsfremgangsmåden først mod 400 ml vand, derefter mod 200 ml 0,1 M natrium-phosphatpuffer/0,1 M NaCl, pH 7, og derefter mod 850 ml vand. Det indre dialysat, der indeholder N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipal-mitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamidnatriumsalt filtreres gnnem et milliporefilter med porestørrelse 0,45 μm og frysetørres, R_f = 0,30 (chloroform/methanol/vand = 65:25:4).

Eksempel 15.

Til en opløsning af 0,89 g (1 mmol) D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid og 3,5 mmol N-ethylmorpholin i 25 ml chloro-form/methanol/vand = 65:25:4 dryppes en opløsning af 1,5

mol N-acetylmuramyl-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester i 5 ml dimethylacetamid. Efter 8 timers omrøring ved stuetemperatur er reaktionen afsluttet. Til reaktionsblandingen sættes 130 ml vand. Chloroform og dele af methanolen afdestilleres under formindsket tryk. Den vandige opløsning filtreres gennem et milliporefilter af teflon med porestørrelse 5 µm. Filtratet dialyseres under omrøring i en Amicon ultrafiltreringscelle gennem en Amicon YM 10-membran ved diafiltreringsfremgangsmåden først mod 400 ml vand, derefter mod 200 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer-0,1 M NaCl, pH 7, og endelig mod 850 ml vand. Det indre dialysat filtreres gennem et milliporefilter med porestørrelse 0,45 µm og frysetørres, hvorved man får N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid-natriumsalt-hydrat, der ifølge sine fysiske data er identisk med den i eksempel 13 fremstillede forbindelse.

Eksempel 16.

1,245 g (2 mmol) N-acetyl-1α-O-benzyl-4,6-di-O-isopropylidenmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, 1,500 g (2 mmol) glycolsyre-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid og 0,279 ml (2 mmol) triethylamin opløses i 12 ml af en blanding af dimethylformamid og chloroform (3:1, r/r). Efter tilsætning af 0,613 g (4 mmol) 1-hydroxybenzotriazol og 0,244 g (2 mmol) 4-dimethylamino-pyridin tilsættes 0,454 g (2,2 mmol) dicyclohexylcarbodiimid, og det hele omrøres i 24 timer ved stuetemperatur. Det udfældede dicyclohexylurinstof filtreres fra, og filtratet inddampes til tørhed. Til fjernelse af beskyttelsesgrupperne optages remanensen i 40 ml 80%'s eddikesyre, opløsningen holdes først i 1 time ved 60°C og hydrogeneres derpå ved stuetemperatur under normalt tryk i nærværelse af 10%'s palladium på carbon. Efter 24 timer er α-benzylgruppen fjernet. Katalysatoren filtreres fra, og der inddampes. Det dannede triethylammoniumsalt optages i

dobbeltdestilleret vand og omdannes som sædvanligt til natriumsaltet ved dialyse mod pufret NaCl-opløsning ved pH=7 og derpå mod vand. Efter frysetørring af det gennem et milliporefilter (0,45 μm) filtrerede celleindhold bliver N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-γ-oxymethylcarbonyl-2-(1',2'dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid tilbage som løst pulver i form af et natriumsalt. Forbindelsen udviser på kiselgel følgende R_f-værdier:

R_f = 0,28 (chloroform/methanol/vand = 65:25:4) og
R_f = 0,68 (chloroform/methanol/eddikesyre/vand = 25:15:4:2).

Eksempel 17.

2,50 g (2,5 mmol) 1,4,6-O-tribenzyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid opløses i 20 ml af en blanding af tør pyridin og methylenchlorid (4:1, r/r). Der tilsættes 0,061 g (0,5 mmol) 4-dimethylamino-pyridin (DMAP), og under udelukkelse af fugtighed tildryppes 1,82 ml (6 mmol) palmitinsyrechlorid, opløst i 5 ml methylenchlorid, idet temperaturen holdes mellem 15 og 20°C. Efter 20 timers henstand ved stuetemperatur sættes 2 ml methanol til reaktionsblandingen, og det hele inddampes til tørhed efter 1/2 times omrøring. Remanensen optages i chloroform, pyridin og DMPA fjernes ved ekstraktion med kold 1 N saltsyre, og til dels endnu tilstedeværende palmitinsyre fjernes forsigtigt med fortyndet kaliumhydrogencarbonatopløsning. Chloroformopløsningen inddampes efter tørring med natriumsulfat, der tilsættes to rumfangsdele dimethylformamid, og derpå afhydrogeneres benzylgrupperne i løbet af 30 timer i nærværelse af 10%'s palladium på carbon. Katalysatoren filtreres fra, og filtratet inddampes til tørhed. Remanensen optages efter flere ganges digerering med petroleumsether i dobbelt destilleret vand

(1-2%'s opløsning), dialyseres som sædvanlig først mod pufret natriumchloridopløsning med pH = 7 og derpå mod vand og lyofiliseres ved filtrering gennem et milliporefilter (0,45 μm). Der fås N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamidnatriumsalt, identisk med den i eksempel 13 fremstillede forbindelse.

Eksempel 18.

En blanding af 0,693 g (1 mmol) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorsyre-dinatriumsalt, 1,332 g (2 mmol) N-acetyl-1α-O-benzyl-4,6-O-isopropyliden-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-ethanolamid og 0,908 g (3 mmol) 2,4,6-triisopropyl-benzensulfonylchlorid, alle bestanddele hårdt tørret, opløst i 25 ml tør pyridin opvarmes under omrøring og udelukkelse af fugtighed i kort tid til 35-40°C. Efter 5 timers henstand ved stuetemperatur sættes der 5 ml vand til reaktionsblandingen, og den inddampes til tørhed efter 1/2 times henstand. Efter oparbejdning og fjernelse af beskyttelsesgrupperne analogt med eksempel 16 fås N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid-natriumsalt, identisk med den i eksempel 13 fremstillede forbindelse.

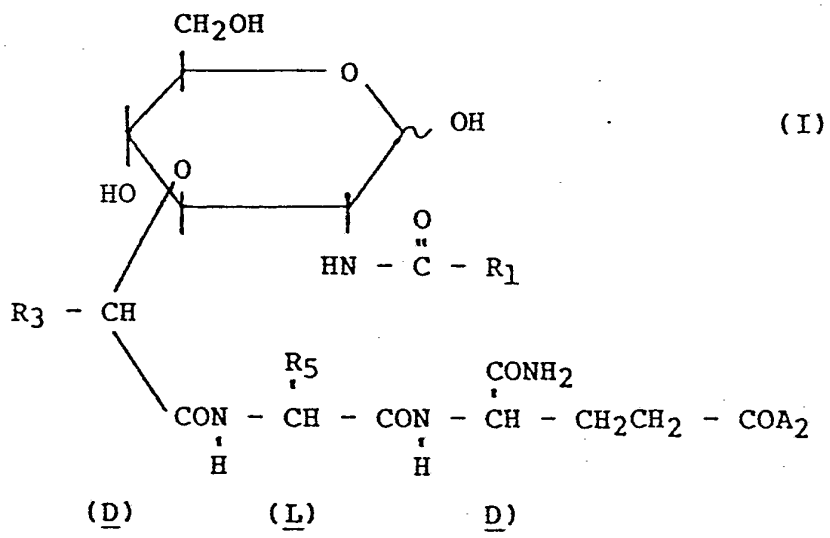
Eksempel 19.

1 mmol N-acetyl-1α-O-benzyl-4,6-di-O-isopropylidenmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid-natriumsalt optages i 40 ml 80%'s eddikesyre, og opløsningen holdes først i en time på 60°C og hydrogeneres derpå ved stuetemperatur under normalt tryk i nærværelse af 10%'s palladium på carbon. Efter 24 timer er α-benzylgruppen fjernet. Katalysatoren filtreres fra, og der inddampes.

Remanensen opløses i 150 ml vand og filtreres gennem et milliporefilter med porestørrelse 5 µm. Filtratet dialyseres i en Amicon ultrafiltreringscelle under omrøring gennem en Amicon YM 10-membran ved diafiltreringsfremgangmåden først mod 400 ml vand, derefter mod 200 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer/0,1 M NaCl, pH 7, og derefter mod 850 ml vand. Det indre dialysat, der indeholder N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid-natriumsalt, filtreres gennem et milliporefilter med porestørrelse 0,45 µm og frysetørres, R_f = 0,30 (chloroform/methanol/vand = 65:25:4).

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af farmakologisk virksomme lipofile phosphatidylmuramylpeptider med den almene formel I



(I)

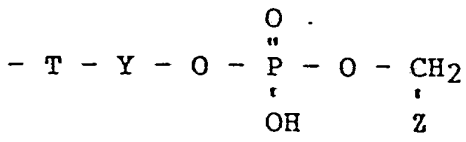
hvori

R_1 betyder et lavalkyl eller phenyl,

R_3 betyder hydrogen eller lavalkyl,

R_5 betyder lavalkyl, og

A_2 betyder en gruppe med formlen II



(II)

hvori

T betyder NH eller O,

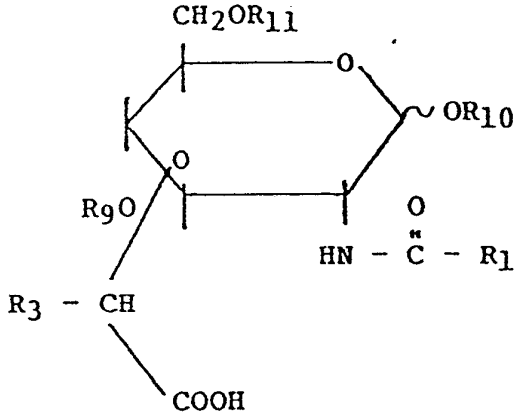
Y betyder lavalkylen eller en gruppe med formlen $-Y_1-CONH-Y_2-$, hvori Y_1 og Y_2 begge betyder lavalkylen, og

Z betyder en 1,2-dihydroxyethyl- eller 2-hydroxyethylgruppe, i hvilken mindst en af hydroxygrupperne er

forestret med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer, idet præfikset "lav" i hvert enkelt tilfælde betegner en gruppe med 1 til 4 carbonatomer,

eller salte deraf, kendetegnet ved, at man på i og for sig kendt måde

a) kondenserer en forbindelse med formlen VII



(VII)

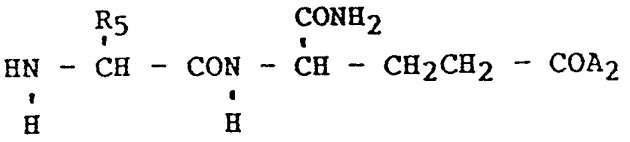
hvori

R_1 og R_3 har samme betydning som ovenfor, og

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,

eller et aktiveret syrederivat deraf,

med en forbindelse med formlen VIII



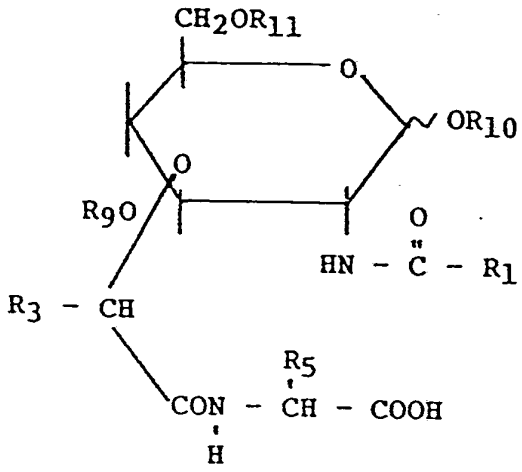
(VIII)

hvori R_5 og A_2 har samme betydninger som ovenfor,

eller med et aktiveret derivat deraf,

og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes,

b) kondenserer en forbindelse med formlen IX



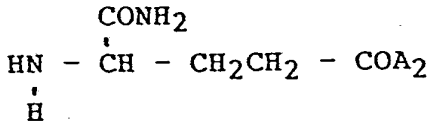
(IX)

hvori

R_1, R_3 og R_5 har samme betydninger som ovenfor, og

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,

eller et aktiveret syrederivat deraf med en forbindelse med formlen X

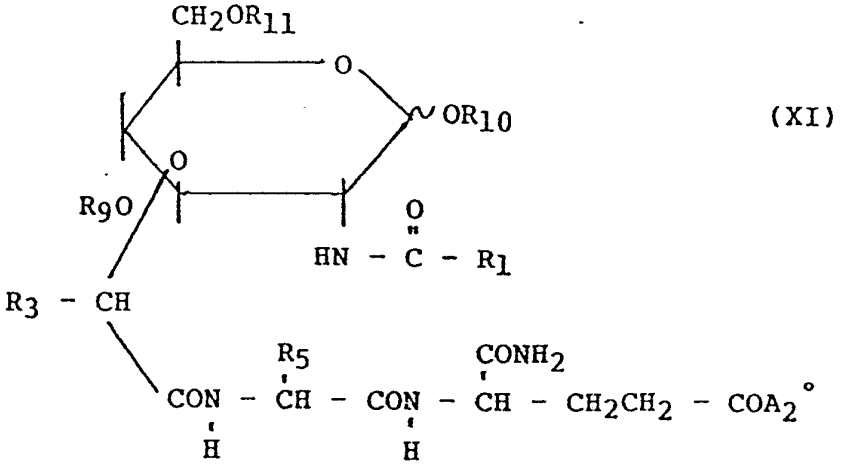


(X)

hvori A_2 har samme betydning som ovenfor,

og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes,

c) til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori T betyder NH, kondenserer en forbindelse med formlen XI



(XI)

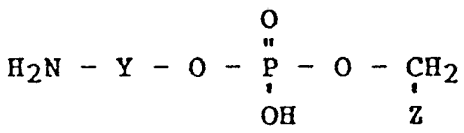
hvori

R_1, R_3 og R_5 har samme betydning som ovenfor,

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe, og

COA_2° betyder en aktiveret carboxylsyregruppe,

med en forbindelse med formlen XII

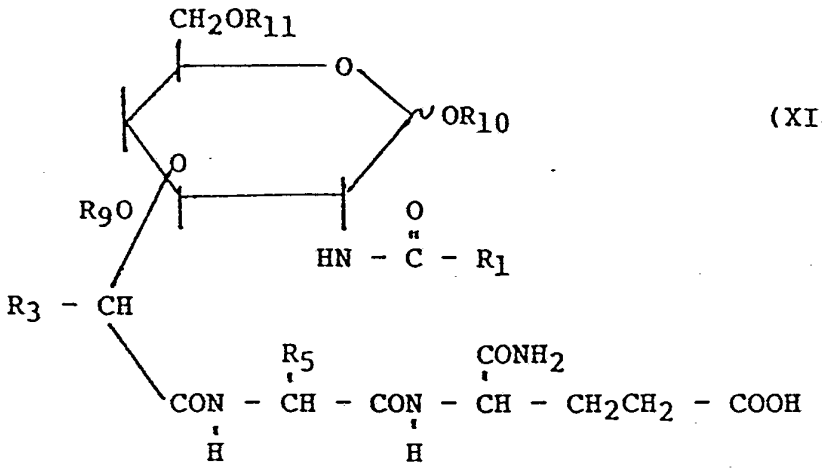


(XII)

hvori Y og Z har samme betydning som ovenfor,

og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes,

d) til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori T betyder oxygen, forestrer en forbindelse med formlen XIa



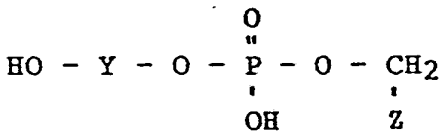
(XIa)

hvori

R_1, R_3 og R_5 har samme betydninger som ovenfor, og

R_9, R_{10} og R_{11} betyder hydrogen eller en let fraspaltelig beskyttelsesgruppe,

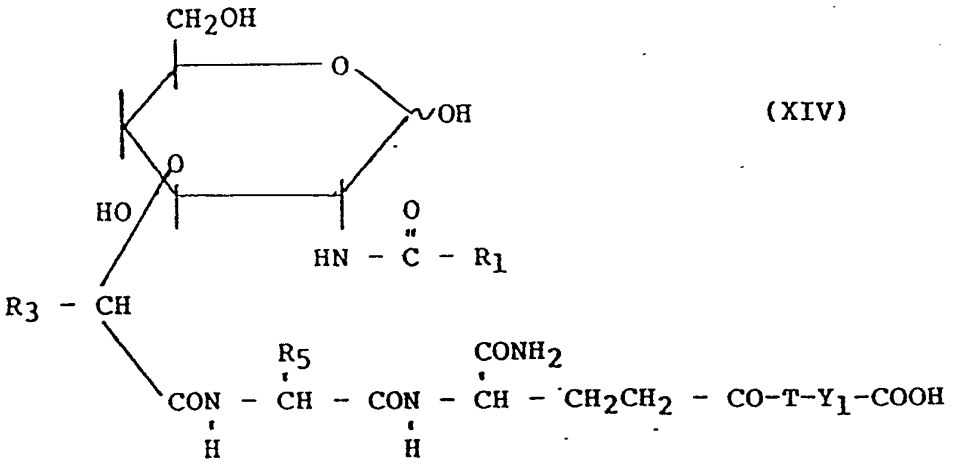
med en forbindelse med formlen XIIa



(XIIa)

hvori Y og Z har samme betydninger som ovenfor, idet syren XIa eller alkoholen XIIa foreligger i en reaktiv form, og eventuelt tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes,

e) til fremstilling af en forbindelse med formlen I, hvori Y betyder en gruppe $-Y_1-CONH-Y_2-$, kondenserer en forbindelse med formlen XIV

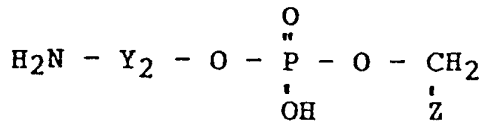


(XIV)

hvori R_1, R_3, R_5, T og Y_1 har samme betydninger som ovenfor,

eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf,

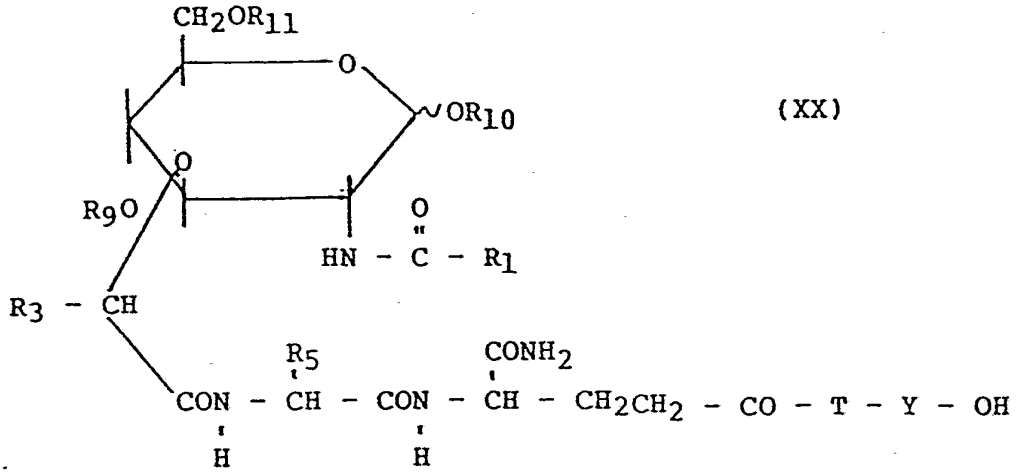
med en forbindelse med formlen XVI



(XVI)

hvori Y_2 og Z har samme betydninger som ovenfor, idet de deri forekommende hydroxygrupper eventuelt er beskyttede med let fraspaltelige beskyttelsesgrupper, eller med et aktiveret derivat deraf, og tilstedeværende beskyttelsesgrupper fraspaltes,

f) omsætter en forbindelse med formlen XX

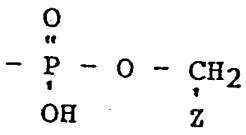


(XX)

hvori

R_1, R_3, R_5, T og Y har samme betydninger som ovenfor, og R_9, R_{10} og R_{11} betyder let fraspaltelige beskyttelsesgrupper,

med en forbindelse, der afgiver en gruppe med formlen XXI

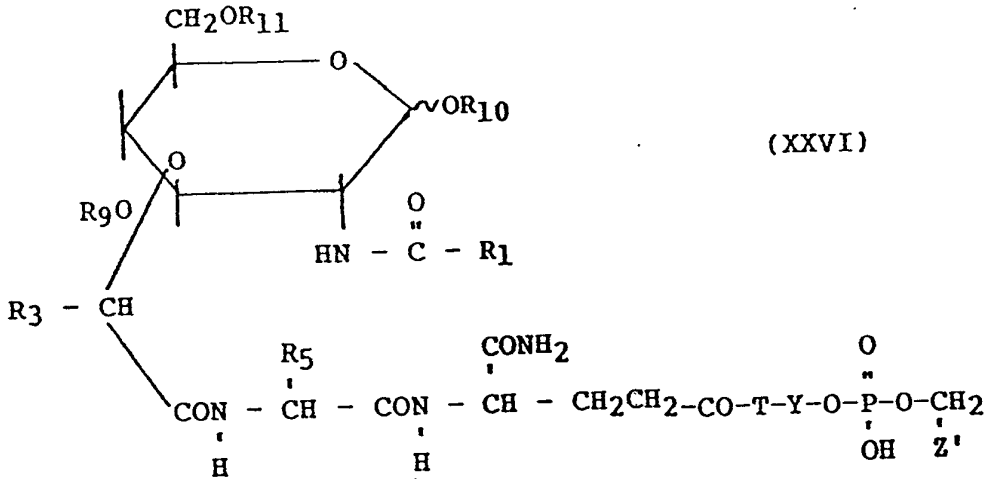


(XXI)

hvori Z har samme betydning som ovenfor,

og fraspalter tilstedeværende beskyttelsesgrupper,

g) forestrer en forbindelse med formlen XXVI



(XXVI)

hvori

R_1, R_3, R_5, T og Y har samme betydninger som ovenfor,
R_9, R_{10} og R_{11} betyder let fraspaltelige beskyttelsesgrupper, og
Z betyder en 1,2-dihydroxyethylgruppe, hvori en af hydroxygrupperne er forestret med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer, en 1,2-dihydroxyethylgruppe eller en 2-hydroxyethylgruppe, med en aliphatisk carboxylsyre med eventuelt en dobbeltbinding og med 12-22 carbonatomer
og fraspalter beskyttelsesgrupperne, eller

h) i en forbindelse med formlen I, hvori en eller flere funktionelle grupper er beskyttet med beskyttelsesgrupper, fraspalter disse beskyttelsesgrupper,
og om ønsket omdanner en opnået forbindelse med formlen I til et salt deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man fremstiller N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-

2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)ethylamid eller et salt deraf.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man fremstiller N-acetyl-desmethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid eller et salt deraf.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man fremstiller N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-γ-oxy-methylcarbonyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid eller et salt deraf.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man fremstiller N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid eller et salt deraf.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at man fremstiller N-propionyl-desmethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-ethylamid eller et salt deraf.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendetegnet ved, at N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf omsættes med 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl-ethanolamin.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendetegnet ved, at N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf omsættes med L-alanin-2-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-ethylamid.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendetegnet ved, at N-acetylmuramyl-L-alanin eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf omsættes med D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-ethylamid.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendetegnet ved, at N-acetylmuraminsyre eller et aktiveret carboxylsyrederivat deraf omsættes med L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-ethylamid.

11. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 og 7-10, kendetegnet ved, at udgangsstofferne vælges således, at man fremstiller et farmaceutisk anvendeligt salt af N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-ethylamid.

12. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1 og 7-10, kendetegnet ved, at man fremstiller N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglytaminyl-L-alanin-2-(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryl)-ethylamid-natriumsalt.