

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 781933 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **781933**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07C 103/52 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.06.1978**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.06.1978**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.12.1978**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.06.1977 LU 77584

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Ciba-Geigy AG, Klybeckstrasse 141, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hartmann, Albert, BRD, SAKSA, (DE)

2 • Tarcsay, Lajos Zoltan, BRD, SAKSA, (DE)

3 • Kamber, Bruno, Switzerland, SVEITSI, (CH)

4 • Stanek, Jaroslav, Switzerland, SVEITSI, (CH)

5 • Baschang, Gerhard, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

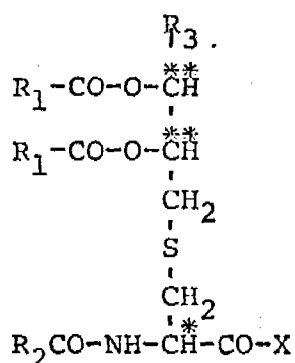
Uusia peptidijohdannaisia

Nya peptidderivat

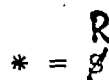
2-5-
Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel, Sveitsi

Uudet peptidijohdannaiset - Nya peptidderivat

Esilläoleva keksintö koskee uusia lipopeptideitä ja erityisesti kaavan I mukaisia yhdisteitä



I

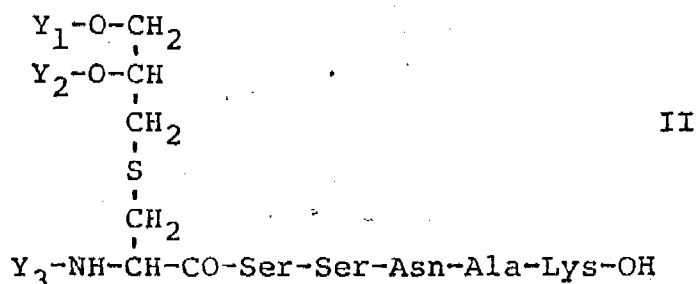


** = R tai S

jossa R_1 ja R_2 tarkoittavat kumpikin tyydytettyä tai tyydyttämätöntä, alifaattista tai seka-alifaattis-sykloalifaattista, mahdollisesti myös happifunktiolla substituoitua hiilivetytähdettä, jossa on 11-21 C-atomia, R_3 tarkoittaa vetyä tai tähdettä $R_1-CO-O-CH_2-$ jossa R_1 tarkoittaa samaa, ja X tarkoittaa peptidisidottua luonnollista alifaattista aminohappoa, jossa on vapaa, esteröity tai amidoitu karboksyyli-ryhmä, tai 2-10 luonnollisen alifaattisen amino-

hapon aminohapposarjaa, joiden terminaalinen karboksyyli-ryhmä on vapaassa, esteröidyssä tai amidoidussa muodossa, jolloin * vast. ** merkityt asymmetria-keskukset omaavat absoluuttisen S- vast. S- tai R-konfiguraation, ja mahdollisesti C **-atomeissa epimeeristen R- ja S-yhdisteiden seoksia, ja mahdollisesti näiden yhdisteiden suoloja ja komplekseja, sekä menetelmiä niiden synteettiseen valmistukseen, ja farmaseuttisia valmisteita, jotka sisältävät yhtä tai useampia näitä lipopeptidejä yhdessä farmaseuttisen kantaja-aineen ja mahdollisesti muiden farmaseuttisten yhdisteiden kanssa.

Lipopeptideja on jo kuvattu lipoproteiinien hajaantumisosasina. Niinpä esimerkiksi Hantke ja Braun (Eur.K.Biochem. 34, 284-296 (1977)) ovat voineet eristää *Escherichia coli*'n ulkoisen soluseinän mureiini-lipoproteiinista entsyymaattisella hajotuksella lipopeptideitä vast. lipopeptidiseoksia epäpuhtaassa muodossa, jotka heidän tutkimuksiensa mukaan ovat seuraavaa rakennetta



tai vastaavien kaavojen mukaisia, sisältäen lyhentyneen polypeptidiketjun, jolloin Y_1 , Y_2 , Y_3 esittävät erilaisten korkeampien tyydyttyjen ja tyydyttämättömien rasvahappojen, kuten 14-19 C-atomia sisältävien ja muiden asyyli-ähteitä. Tämä sama rakenne on myös mureiini-proteiinilla sellaisenaan (loc.cit.), jolloin ei tutkittu edellä olevan kaavan molempien asymmetristen hiiliatomien absoluuttista konfiguraatiota. Sekä mureiini-lipoproteiinilla että sen mainituilla hajaantumistuotteilla on in vitro mitogeeninen teho hiirilymfosyyttejä vastaan. (vrt. myös Z. Immun.-Forschung.Vol.153, sivut 11-22 (1977)).

Kuten käy ilmi, on mureiiniproteiinista saadulla hajaantumislipopeptideillä perustana "glyserylikysteini".



Luonnontuotteiden entsyymaattisen hajoamisen tuloksina eivät nämä osaset olleet koostumukseltaan määriteltäviä tuotteita ja ne ovat ilmeisesti monimutkaisia mainitun peptidiosan ja glyseryylikysteiniin hyvin erilaisten asyylijohdannaisten kondensaatiotuotteiden seoksia.

Esilläolevan keksinnön lipopeptidit eroavat mainituista mureiini-proteiinien hajoantumistuotteista monessa suhteessa: Ne ovat lipopeptidejä, joiden yhtenäinen kemiallinen rakenne ja konfiguraatio on tarkoin määriteltä, ovat synteettisesti valmistettavat ja sopivat tämän takia terapeuttiseen käyttöön; niiden muodostama ryhmä käsittää yhdisteitä, joissa "glyseryylikysteiniinissä" glyseröliosan sijasta on erytriitin tähdettä ja/tai sellaisia, joissa on toinen aminohapposarja kuin edellämainituilla tunnetuilla kaavan II mukaisilla lipopeptidi-seosten hajoamistuotteilla tai joissa on näiden sijasta myös vain yksi ainoa aminohappo, ja lopulta myös johdannaisia, kuten terminaalisen karboksyyli-ryhmän amideja ja estereitä.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden asyyli-ähteissä R_1CO , R_2CO ja niiden johdannaisissa ovat R_1 ja R_2 tyydytettyjä tai tyydyttämättömiä, alifaattisia tai alifaattis-sykloalifaattisia, mahdollisesti myös happifunktiolla substituoituja, hiilivetyähteitä joissa on 11-21 C-atomia, toisin sanoen asyyli-ähteet ovat peräisin tyydytetyistä tai tyydyttämättömistä, alifaattisista tai sykloalifaattisista, mahdollisesti hiilivetyähteessä oksigenoiduista karbonihapoista, joissa on 12-22, mieluummin 14-18 C-atomia, Tällaisina on mainittava tyydytetyt tai tyydyttämättömät rasvahapot, kuten lauriinihappo, myristiinihappo, palmitiinihappo, margariinihappo, steariinihappo, arakiinihappo, öljyhappo, elaidiinihappo, linolihappo, α - ja β -eleosteariinihappo, stearolihappo, α -linoleenihappo, lisäksi sykloalifaattis-alifaattisina happoina esimerkiksi dihydrosterkuli-happo, malvalihappo, hydnokarpushappo, ja Chaulmoograhappo. Tä-mäntyyppiset oksigenoidut hapot, jotka samoin tulevat kyseeseen asyyli-ähteissä R_1CO ja R_2CO , ovat esimerkiksi mainituista olefiinisis-ta rasvahapoista ja sykloalifaattis-alifaattisista hapoista epoksi-doimalla saatavat hapot, esim. ζ, ν -epoksisteariinihappo, lisäksi edellämainittujen happojen johdannaiset, jotka esimerkiksi sisältä-vät yhden tai useampia hydroksiryhmiä, kuten esimerkiksi risinoli-happo.

Kaavan I mukaisissa yhdisteissä vast. niiden diastereomeerisis-sa seoksissa ja suoloissa tai komplekseissa voivat ryhmät R_1 ja R_2 olla keskenään identtisiä tai erilaisia. Edullisia ovat yhdisteet

joissa kaikki kolme vast. neljä asyyliitähdettä ovat samoja ja näiden keskuudessa erityisesti sellaiset, joissa nämä tarkoittava palmitoyyli-, stearoyyli- tai oleyyliitähdettä.

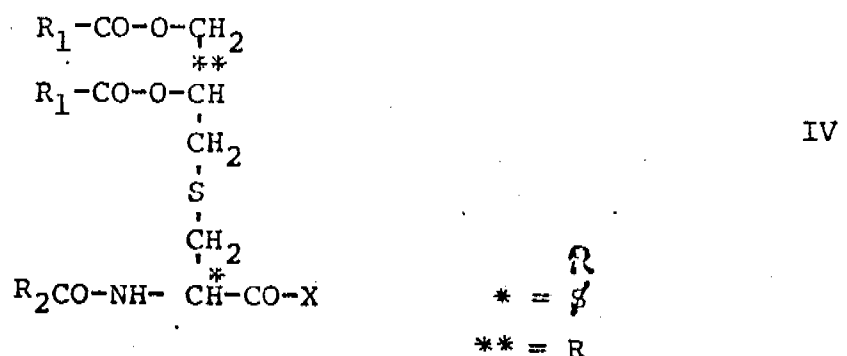
Peptidisarja X kaavan I mukaisissa yhdisteissä vast. niiden suoloissa koostuu enintään 10:stä luonnollisesta alifaattisesta aminohaposta, jolloin mieluummin vähintään puolet sisältävät hydrofiilisen ryhmän, kuten erityisesti hydroksi-, amino-, karboksyyli-, karbamidi-, guanidino- tai imidatsolyyliryhmän. Tämän kategorian ionisisistä aminohapoista, jotka sisältävät happamia ryhmiä, mainitakoon erityisen edullisiksi varsinkin asparagiini- ja glutamiini- ja oksiglutamiinihappo, emäksisiä ryhmiä sisältävistä lysiini, ornitiini, arginiini ja histidiini. Neutraaliluonteisia aminohappoja ovat erikoisesti amidit, kuten asparagiini, glutamiini ja hydroksiryhmiä sisältävät, ensisijassa seriini ja treoniini.

Jos X esittää kaavassa I mainittua aminohappoa, on se samoin esimerkiksi jokin mainituista hydrofiilisiä ryhmiä sisältävistä aminohapoista, esim. erityisesti seriini tai treoniini.

Aminohapoista, jotka voivat sisältyä edellämainittuun sarjaan eivätkä sisällä hydrofiilisiä ryhmiä on mainittava ennenkaikkea substituoimattomat aminohapot, kuten esimerkiksi glysiini, alanini, valiini, norvaliini, leusiini, isoleusiini, mutta myös eräät substituoit, ei-hydrofiilisiä luonnetta omaavat aminohapot, kuten metioniini.

Mainittujen aminohappojen järjestys peptidiketjussa X voi olla mielivaltaisen, kuitenkin ovat sellaiset sarjat edullisia, joissa kaikki aminohapot, joissa on hydrofiilisiä ryhmiä, ovat sitoutuneet suoraan toisiinsa, ja näiden keskuudessa taas ne, joissa tämän hydrofiilisten aminohappojen sarja on sitoutunut triasyyli-glyseryylikysteiniin vast. tetra-asyyli-erytrityylikysteiniin osassa olevan kysteiinin karboksyyliin.

Tärkeä lipopeptidien ryhmä (ryhmä I) on esilläolevan keksinnön mukaan sellaiset lipopeptidit, joissa peptidiketju X koostuu maksimaalisesti viidestä aminohaposta. Näiden joukosta on erityisesti mainittava kaavan IV mukaiset aineet



jossa kaavassa R_1 . R_2 tarkoittavat samaa kuin edellä ja X tarkoittaa samaa kuin kaavassa I, mutta siinä tapauksessa että aminohapposarja sisältää 2-5 aminohappoa, tässä sarjassa mieluummin vähintään puolet sisältää hydrofiilisen ryhmän ja tämä koskee myös sitä tapaus-
ta että on yksi ainoa aminohappo, sekä niiden suolat ja kompleksit. Näiden lipofiilipeptidien joukosta mainittakoon erityisen edullisiksi ne, joiden aminohapposarjaryhmässä X vastaa edellämainittujen mu-
reiini-lipoproteiinien hajottamisella saatujen lipopeptidien, ts. kaavan II mukaista sarjaa, tai jonkin näistä peräisin olevaa lyhyempiketjuista sarjaa. Erityisesti mainittakoon seuraavat tyyppiä olevat lipopeptidit:

(AcGCT = kaavan IV mukainen asyyloglyseerylikysteiniini-osa):

AcGCT - Ser - Ser - Asn - Ala - Lys - OH

AcGCT - Ser - Ser - Asn - Ala - OH

AcGCT - Ser - Ser - Asn - OH

AcGCT - Ser - Ser - OH

lisäksi vastaavat tyypit, joissa treoniini, glutamiini tai asparagiini korvaavat seriinin; lisäksi yhdistetyypit:

AcGCT - Ser - Ser - Asn - Ala - Glu - OH

AcGCT - Ser - Ser - Phe - Ala - Glu - OH

AcGCT - Ser - Ser - Phe - Ala - OH

AcGCT - Ser - Ser - Phe - OH

ja vastaavat lipopeptidit, joissa vaihtoaminohappoina seriinin sijasta on treoniini, glutamiini tai asparagiini, ja amidit ja karbonihappoesterit, joissa on terminaalinen karbamidi vast. esteriryhmä, jolloin ensisijassa tulevat kyseeseen yhdisteet, joissa asyyli-
tähteet R_1 -CO, R_2 -CO asyyloglyseerylikysteiniini-osassa ovat samanlaisia ja palmitoyyliä, stearoyyliä tai oleoyyliä esittäviä, ja kaikki ne, joissa R_1 -CO ja R_2 -CO ovat erilaisia ja tarkoittavat esim. palmitoyyliä, stearoyyliä tai oleoyyliä, ja nämä tähteet esiintyvät mieltävaltaisissa yhdistelmissä ja/tai muunnoksissa, kuten seuraavassa taulukossa esitetyissä yhdisteissä, jolloin glyseerylikysteiniini-osa, joka vastaa N- ja O-asyyli substituentteja, on lyhennettynä N-asyyli-O-O-di-asyyli-Cys:

N-palmitoyyli-O.O-di-palmitoyyli-Cys	- Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-Ala-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-OH
" " " " " "	- Ser-OH

N-stearoyyli-O.O-di-stearoyyli-Cys	- Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-Ala-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-OH
" " " " " "	- Ser-OH
N-oleoyyli-O.O-di-oleoyyli-Cys	- Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-Ala-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-OH
" " " " " "	- Ser-OH
N-laurooyyli-O.O-di-laurooyyli-Cys	- Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-Ala-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-Asn-OH
" " " " " "	- Ser-Ser-OH
" " " " " "	- Ser-OH

lisäksi yhdisteet, jotka ovat peräisin seriinin substituuutiosta treoniinilla, glutamiinihapolla, glutamiinilla, asparagiinihapolla tai asparagiinilla, lysiinin substituuutiosta glutamiinihapolla, ja sellaiset, jotka saadaan lysiinin samanaikaisesta substituuutiosta glutamiinihapolla ja asparagiinin substituuutiosta fenyylialaniinilla.

Erityisen edullisina on mainittava seuraavat yhdisteet, joissa on erilaisia asyyliitähteitä N- ja O-atomeissa glyseryylikysteiniitähteessä:

N-myristoyyli-O.O-di-palmitoyyli-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH
"-laurooyyli - " - " - " - " -Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH
"-stearoyyli - " - " - " - " -Ser-Ser-Asn-Ala-Ala-OH

ja yhdisteet, joissa Ser on korvattu Phe:lla tai Phe Ser:llä.

Toinen ryhmä keksinnön mukaisia yhdisteitä (ryhmä II) ovat yhdisteet, jotka vastaavat edelläesitettyä kaavaa IV, joissa kuitenkin konfiguraatio C^{**}-atomissa S on R:n tilalla, ja R- ja S-diastereomeerien seokset, jollaisina ne voivat esiintyä esimerkiksi synteettisesti valmistettaessa. Tiedetyt tyypit ja yhdisteet vastaavat myös tässä ryhmässä edellä "R"-ryhmälle (kaava IV) erikoisen edullisiksi kuvattuja tyyppisiä ja yhdisteitä.

Kolmas ryhmä (ryhmä III) uusia lipopeptidejä käsittää kaavan IV mukaisia yhdisteitä, joissa kuitenkin X esittää aminohapposarjaa, jossa on 6-10 aminohappoa, jolloin ensimmäiset viisi sarjaa mieluiten ovat edellä jo edullisiksi kuvatut sarjat. Aminohapot 6-10 voivat

olla mielivaltaisia edellämainittuja luonnollisia aminohappoja, kuten erikoisesti seriini, asparagiini, alaniini, glutamiinihappo, lyysiini, fenyylialaniini ja esiintyä vaikka seuraavina sarjoina:

Ile-Asp-Glu-OH

Asp-Glu-OH

Spesifisiä yhdisteitä ovat esim.

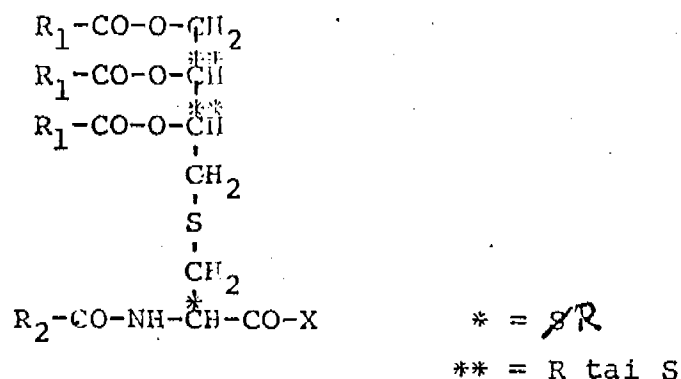
N-stearoyyli-S-(2(R), 3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn
Ala-Glu-Ile-Asp-Glu-OH

N-palmitoyyli-S-(2(R), 3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn
Ala-Glu-Ile-Asp-Glu-OH

N-palmitoyyli-S-(2(R), 3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn
Ala-Lys-Ile-Asp-Glu-OH.

Keksinnön mukaisesti voidaan valmistaa myös vastaavia tämän tyyppin yhdisteitä, joissa on S-konfiguraatio C^{**}-atomissa, sekä S- ja R-yhdisteiden diastereomeeriseoksia.

Keksinnön mukaisten lipopeptidien neljäs ryhmä (ryhmä IV) käsittää kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa R₃ esittää tähdettä R₁-CO-O-CH₂-, joissa konfiguraatio C^{**}-atomeissa on mielivaltainen erityisesti myös diastereomeeriseoksia. Alaryhmiä ovat kaavan V mukaiset yhdisteet



erityisesti sellaisia joissa on R-konfiguraatio C^{**}-atomeissa, joissa X tarkoittaa samaa kuin kaavassa IV. Asyylihänteet R₁-CO- ja R₂-CO- ovat mieluummin samoja ja ennenkaikkea edelleen palmitoyyli, stearoyyli tai oleoyyli; mutta ne voivat kuitenkin olla myös, kuten edellämainittujen muiden ryhmien yhteydessä on selitetty, esiintyä kaikissa yhdistelmissä ja/tai muunnoksissa.

Tämän luokan edullisia tyyppisiä ja yhdisteitä ovat edelleen sellaiset, joissa X:llä on edellä määritellyt merkitykset.

Myös tässä ryhmässä on X mieluummin aminohappo tai viiden aminohapon sarja, erityisesti jokin edellä muille kolmelle lipo-

peptidiryhmälle edulliseksi mainittu sarja. X voi kuitenkin myös esittää esilläolevan hakemuksen kolmannelle lipopeptidiryhmälle kuvattua aminohapposarjaa, jossa on 6-10 aminohappoa, erityisesti tuolle ryhmälle erikoisesti mainittuja aminohappoja.

Spesifiset yhdisteet ovat esimerkiksi edellä ryhmän I erikoisyhdisteille kootun taulukon mukaisia, jos niissä N-asyyli-O-O-di-asyyli-kysteini ei kuten siellä tarkoita glyseryylikysteinin osaa, vaan eritrityylikysteini-tähdettä, ja seriinin substituuutiosta treoniinilla, glutamiinihapolla, glutamiinilla, asparagiinihapolla tai asparagiinilla ja glysiinin substituuutiosta glutamiinihapolla ja haluttaessa, samanaikaisesti asparagiinin substituuutiosta fenyyllialaniinilla saatavat yhdisteet.

Viides ryhmä esilläolevan keksinnön mukaisia lipopeptidejä muodostetaan niistä kaavan I mukaisista yhdisteistä, joissa X tarkoittaa peptidiketjua, jossa ensimmäisen viiden aminohapon sarja poikkeaa tunnetuissa mureiini-lipoproteiini-hajotus-lipopeptideissä esiintyvistä sarjoista, ja erityisesti sellaisia, jossa R_3 on vety, siis vastaavat edellä olevaa kaavaa IV, jolloin R_1 -CO ja R_2 -CO tarkoittavat mieluummin edellä tai seuraavassa erikoisen edullisiksi mainittuja asyyliähteitä mainituissa yhdistelmissä, sekä niiden suoloja ja komplekseja. Mainittakoon esimerkiksi seuraavat lipopeptidi-tyypit kaavan IV mukaiset tyypit (AcGCT = asyyli-glyser-ylikysteini-osa)

AcGCT - Phe - Ile - Ile - Phe - Ala - OH

AcGCT - Val - Lys - Val - Tyr - Pro - OH

ja niiden amidit ja esterit, erityisesti seuraavassa erikoisen edullisiksi mainitut.

Toinen alaryhmä koostuu kaavan IV mukaisista yhdisteistä, joissa X kuitenkin esittää mainittua "luonnotonta" aminohapposarjaa verrattuna mureiini-lipoproteiini-hajotustuotteisiin, mutta jossa on lisäksi 6-10 aminohappoa. Ensimmäiset viisi aminohappoa ovat esimerkiksi edellämainittua sarjaa tai mielivaltaisen muu sarja; mainittakoon esim. seuraavat lipopeptidit, jossa AcGCT tarkoittaa samaa kuin edellä:

AcGCT - Ala - Ile - Gly - Val - Gly - Ala - Pro - OH

AcGCT - Ser - Ser - Asn - Ala - Glu - Ile - Asp - Glu - OH

sekä niiden amidit ja esterit, erityisesti seuraavassa erikoisesti mainitut:

Mieluimmin valmistetaan tämän tyyppin yhdisteitä, joissa konfiguraatio C^{**}-atomissa on AcGCT R, tai seoksia R- ja S-epimeereistä.

Edellä esitetyissä uusissa esillä olevan keksinnön mukaisissa lipopeptideissä voi terminaalinen karboksyyli-ryhmä olla amidotuna. Kyseeseen tulevat substituoimattoman amidin lisäksi myös primäärisestä tai sekundäärisestä amiinista peräisin olevat amidit. Erityisesti tulevat kyseeseen alempien alifaattisten amiinien amidit, joissa on 1-7 C-atomia, kuten metyyliamiini, etyyliamiini, propyyliamiini, butyyliamiini, dimetyyliamiini, dietyyliamiini tai propyyli- ja isopropyyliamiini, lisäksi aromaattiset amiinit, erityisesti monosykliset, kuten aniliini tai toluidiini, aralifaattiset, kuten bentsyyliamiini tai heterosykliset amiinit, kuten esimerkiksi aminopyridiinit. Sekundääristen alifaattisten amiinien kohdalla voi olla kyse myös sen tyyppisistä emäksistä, joissa on suljettu rengas, kuten esim. pyrrolidiinista, piperidiinista tai piperatsiinista.

Spesifisiä amideja ovat esimerkiksi tämän keksinnön mukaisten kaikkien spesifisten lipopeptidien amidit, substituoimattomat tai metyyli-, etyyli-, dimetyyli- tai dietyyliamiinit, tai kuvaavissa esimerkeissä selitettyjen yhdisteiden amidit. Uusien lipopeptidien esteröidyissä terminaalisisissa karboksyyli-ryhmissä on alkoholikomponentti peräisin mieluimmin alemmista alifaattisista alkoholeista, joissa on 1-7 C-atomia, kuten metyyli-, etyyli-, n-propyyli-, isopropyyli- tai butyylialkoholeista. Esteröivät alkoholit voivat kuitenkin myös olla useampiarvoisia, kuten etyleeniglykoli tai propyleeniglykoli tai glyseroli. Myös aralifaattiset alkoholit, varsinkin monosykliset alempialifaattiset, 1-7 C-atomia alifaattisessa osassa sisältävät, kuten esimerkiksi bentsyylialkoholit, tai heterosykliset alkoholit, kuten tetrahydrofuranoli tai tetrahydropyranoli, käyvät esteröintiin. Tämän tyyppisten keksinnön mukaisien lipopeptidien spesifisinä estereinä mainittakoon esimerkiksi kaikkien edellä esitettyjen lipopeptidien metyyli-, etyyli- ja etyleeniglykoli- tai propyleeniglykoli-esterit tai keksintöä kuvaavissa esimerkeissä mainittujen lipopeptidien esterit.

Uudet lipopeptidit ovat kulloinkin substituenttiansa laadun mukaan neutraaleja, happamia tai emäksisiä yhdisteitä. Jos niissä on ylimäärin happamia ryhmiä, muodostavat ne suoloja emästen kanssa, kuten ammoniumsuoloja, tai alkali- tai maa-alkalimetallisuoloja, esimerkiksi natriumin, kaliumin, kalsiumin tai magnesiumin suo-

loja; jos kuitenkin on ylimäärin emäksisiä ryhmiä, ne muodostavat happoadditiosuoloja.

Happoadditiosuolat ovat erikoisesti farmaseuttisesti käyttökelpoisia, myrkyttömiä happoadditiosuoloja, kuten epäorgaanisten happojen suoloja, esimerkiksi kloorivetyhapon, bromivetyhapon, typpihapon tai rikkihapon tai fosforihappojen suoloja, tai orgaanisten happojen suoloja, kuten orgaanisten karbonihappojen, esimerkiksi etikkahapon, propionihapon, glykolihapon, meripihkahapon, maleiinihapon, hydroksimaleiinihapon, metyylimaleiinihapon, fumaarihapon, omenahapon, viinihapon, sitruunahapon, bentsoehapon, kanelihapon, mantelihapon, salisyylihapon, 4-amino-salisyylihapon, 2-fenoksibentsoehapon, 2-asetoksibentsoehapon, embonihapon, nikotiinihapon tai isonikotiinihapon suoloja tai orgaanisten sulfonihappojen suoloja, esimerkiksi metaanisulfonihapon, etaanisulfonihapon, 2-hydroksi-etaanisulfonihapon, etaani-1,2-disulfonihapon, bentseenisulfonihapon, p-tolueenisulfonihapon suoloja tai naftaliini-2-sulfonihapon suoloja, lisäksi myös muita happoadditiosuoloja, joita voidaan käyttää esimerkiksi välituotteina esimerkiksi vapaiden yhdisteiden puhdistukseen tai muiden suolojen valmistukseen sekä karakterisointiin, kuten esim. pikriini-, pikroloni-, flaviaani-, fosforivolfraami-, fosforimolybdeenin-, klooriplatina-, Reinecke- tai perkloorihapon suoloja.

Komplekseja ovat metallisuolojen kompleksit esimerkiksi raskasmetallisuolojen kanssa, kuten kuparin, sinkin, raudan tai kobolttisuolojen kanssa syntyvät yhdisteet. Tällaisten kompleksien muodostukseen käytetään mieluummin näiden metallisuolojen fosfaatteja, pyrofosfaatteja ja polyfosfaatteja, mahdollisesti yhdessä happamien orgaanisten aineiden kanssa esimerkiksi happamia ryhmiä sisältävien polysakkaridien, kuten karboksimeytyyliselluloosan, parkkihapon, polyglutamiinihapon, tai osittain hydrolysoituneen liivateen kanssa, lisäksi alkalimetallipolyfosfaattien, kuten esimerkiksi "Calgon N", "Calgon 322", "Calgon 188" tai "Plyron B 12" nimisten tuotteiden kanssa.

Tämän keksinnön kaavan I mukaisilla yhdisteillä, niiden suoloilla ja komplekseilla ja seoksilla on arvokkaita farmakologisia ominaisuuksia, erityisesti selvä immunipotensoiva teho. Niinpä yhdisteet stimuloivat 0,5-320 µg/ml annoksilla in vitro B-lymfosyyttien tiettyä proliferaatiota tymidiini-inkorporaation yhteydessä 20-50-kertaiseksi verrattuna stimuloimattomiin kontrolli-

lymfosyytteihin. Stimulaation vaikutus vastaa tehokkaimmilla tunnetuilla B-solu-mitogeeneilla/[dekstraani-sulfaatti E. coli-lipopolysakkaridi, PPD ("purified protein derivation" = puhdistettu proteiini johdannainen)] jolloin uusilla keksintöjen mukaisilla yhdisteillä ei ole korkeinakaan pitoisuuksina lymfositotoksisia vaikutusta.

Uudet kaavan I mukaiset yhdisteet, niiden suolat, kompleksit ja seokset pystyvät sen lisäksi indusoimaan 0,3-60 µg/ml:n pitoisuuksilla tavallisten hiirien pernasoluviljelmissä vasta-aineita tuottavien solujen muodostusta (19S-plakin muodostavien solujen lisääntyminen kertoimella 20-50 kontrolliarvon yli (stimuloivien aineiden puuttuessa)): Niinpä mainittujen yhdisteiden läsnäollessa muodostuu esim. spesifistä vasta-ainetta lampaan erytrosyyttejä vastaan, ilman että viljelmiin lisättäisiin lampaan erytrosyyttejä immunosoinnin aikaansaamiseksi. Toiseksi mainitut aineet pystyvät myös kohottamaan samalla pitoisuusalueella T-soluköyhien pernasoluviljelmien immunologista reaktiviteettia (peräisin synnynäisestä kateenkorvattomista nu/nu hiiristä) tavallisesti tymusriippuvaiseen antigeneihin nähden (lampaan erytrosyytti) (kerroin 10-40 verrattuna käsittelemättömiin kontrolliviljelmiin). Mainituilla yhdisteillä ei kuitenkaan vain indusoida in vitro suoraan tai epäsuorasti B-lymfosyyttien proliferaatio- ja synteetitoin-toja (ts. potentiaalisesti vasta-aineita muodostavia soluja) vaan aikaansaadaan myös vaikutuksia T-lymfosyytteihin (joihin kuuluvat säätelyllisesti aktiiviset edistäjä- ja supressorisolut sekä sytotoksiset efektorisolut). Niinpä mainitut yhdisteet pystyvät esimerkiksi huomattavasti lisäämään pitoisuusalueella 10-100 µg/ml kortisoniresistenttien tymus-solujen reaktiviteettia allogeenisia säteilytettyjä stimulaattorilymfosyyttejä vastaan (10-kertaiseksi asti).

Edellämainitut vaikutukset aikaansaadaan todennäköisesti epäsuorasti siten, että lipopeptidit aktivoivat makrofageja, jotka puolestaan korottavat T- ja B-lymfosyyttien reaktiviteettia. Itse asiassa voidaan osoittaa, että mainitut yhdisteet vapauttavat jo erittäin vähäisissä pitoisuuksissa (0,01-10 µg/ml) suuria määriä "colony stimulating activity" (CSA) hiirien makrofageista (induktio 150-200 pesäkkeeseen asti 7 vuorokaudessa 10^5 hiiren luuydinsoluista, sen jälkeen kun on lisätty 20% ylikerrosta 24 tunnin ajan substanssin kanssa inkuboitua makrofagiviljelmää, verrat-

tuna 0-5 pesäkkeeseen, jotka saadaan lisättäessä ylikerros käsittelemätöntä makrofagiviljelmää). CSA on biologinen mediaattori, joka on välttämätön luuydin-kantasolujen erottamiseksi makrofageiksi ja polymorfoytimiksi leukosyyteiksi. Tällöin aikaansaavat maipuritut yhdisteet solujen lisätyn täydennyksen mikä on tärkeää epäspesifisen resistenssin ja spesifisten (lymfosyyttivälitteisten) immuunireaktioiden induktiolle, amplifikaatiolle ja ekspressiolle.

Uusien yhdisteiden kaavan I mukaisten yhdisteiden, niiden suolojen tai kompleksien tai seosten immuunipotensoiva vaikutus voidaan todistaa myös in vivo: niinpä keksinnön mukaisen lipopeptidin injektio 3-9 tunnin kuluessa kohottaa suuresti CSA-pitoisuutta seerumissa (jopa 120 pesäkettä/ 10^5 hiiren luuydinsolua kloroformilla uutetun seerumin lisäyksen jälkeen (5 % loppukonsentraatio) verrattuna 0-5 pesäkkeeseen käsittelemättömillä eläimillä). Vastaavasti lisääntyy annostelemalla samoja yhdisteitä in vivo vasta-aineen muodostuskyky hiirissä:

NMRI-hiiret immunoitiin intraperitoneaalilla injektioilla 10 μ g:lla sakkatonta BSA:tä päivänä 0, 9, 15 ja 29 vuorokautta myöhemmin otettiin seerumikokeet ja niiden anti-BSA-vasta-ainepitoisuus tutkittiin passiivisella hemaglutinaatiotekniikalla. Käytetyssä annoksessa on liukoinen BSA subimmunogeeni kohde-eläimille, ts. se kykenee tuottamaan vain aivan vähäisiä määriä tai ei ollenkaan vasta-aineita. Kun hiiret lisäksi käsitellään immunipotensoivilla aineilla ennen antigeeniannostusta tai sen jälkeen tapahtuu vasta-ainetiitterin nousu seerumissa. Käsittelyteho ilmaistaan saadulla Scorearvolla, ts. $\log_2$ tiitterierojen summalla kolmena verikoepäivänä.

Tässä kokeessa pystyvät kaavan I mukaiset yhdisteet, niiden suolat tai kompleksit tai seokset intraperitoneaalilla tai subkutaanilla annostuksella, joka on 0,03-3 mg/eläinkg, viitenä toisiaan seuraavana päivänä ennen BSA:lla immunisointia tai sen jälkeen merkittävästi kohottamaan vasta-ainetuotantoa BSA:ta vastaan.

Myös soluvälitteisen immunitetin ilmeneminen voidaan potentoida mainituilla yhdisteillä in vivo:

Kun marsujen sensibilisointi BSA:lla epätäydellisessä Freund'in adjuvanssissa johtaa vain humoraaliseen vasta-ainemuodostukseen, indusoi keksinnön mukaisten lipopeptidien sekoittaminen mukaan 1-15 μ g:n annoksina antigeeni-öljyemulsion vesifaasiin myöhäistyyppisen yliherkkyyden BSA:ta vastaan: 3 viikkoa immunisoinnin jälkeen johtaa intrakutaani injektio BSA:ta näissä eläimissä paikalli-

seen punoittavan tulehdusreaktion ja ihon paksunemisen, joka saavuttaa maksiminsa 24-48 tunnin kuluessa. Nämä myöhäistyyppi-reaktiot vastaavat kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti niitä, joita tavallisesti saadaan immunisoimalla BSA:lla täydellisessä Freund'in adjuvanssissa (ts. lisäten mykobakteereita). ED_{50} -arvot (tarvittava μg /eläin reaktioutilavuuden eron induktioon [punoitus-pinta kertaa ihon paksunema] käsitellyillä ja käsittelemättömillä eläimillä tilavuudella 200 μl ittraa, 24 tuntia tapahtuman jälkeen) ovat 2-3 μg .

Keksinnön mukaiset lipopeptidit ovat lisäksi lähes myrkyttömiä: jopa 5-kertainen intraperitoneaalinen 10 mg/kg/vrk:n annostus viitenä peräkkäisenä päivänä ei aiheuttanut hiirellä näkyviä oireita. Koska immuunistimulaatioon tarvittavat annokset ovat erittäin pieniä, on uusien yhdisteiden terapeuttinen leveys varsin suuri.

Tämän keksinnön mukaiset uudet lipopeptidit voivat siis huomattavasti kohottaa sellulääristä ja erikoisesti humoraalista immunitettä, ja tällöin sekä seoksina itse antigeenin kanssa (adjuvanssivaikutus ahtaassa mielessä) että myös ajallisesti ja paikallisesti antigeeninjektiosta suoritettulla annostuksella (systeminen immu-nipotensointi).

Keksinnön mukaisia uusia lipopeptidejä voidaan siis käyttää apu-aineina seoksissa rokoteaineiden kanssa rokotustehon parantamiseksi ja humoraalisten vasta-aineiden ja/tai sellulaarisen immunitetin aikaansaavan infektiosuojan parantamiseksi bakteriasta, viraalista tai parasitääristä hyökkäystä vastaan.

Lisäksi sopivat kuvatut yhdisteet seoksina eri antigeenien ja apuaineiden kanssa kokeelliseen ja teolliseen antiseerumien valmistukseen hoitotarkoituksia ja diagnostiikkaa varten ja immunologisesti aktiivisten lymfosyytti-populaatioiden induktioon solujen-siirtomenetelmissä.

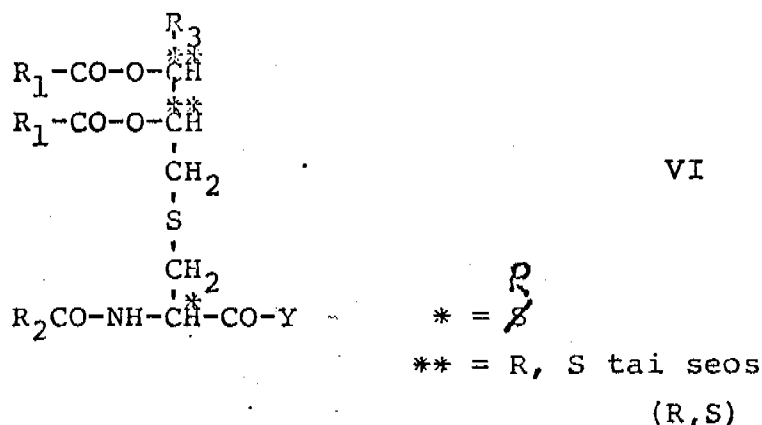
Lisäksi voidaan uusia lipopeptidejä käyttää hyödyksi myös ilman samanaikaista antigeeniannostusta sisäisesti tapahtuvien immu-nireaktioiden edistämiseksi ihmisillä ja eläimillä. Yhdisteet sopivat tämän takia erikoisesti itse kehon suojautumisen stimulaatioon, esimerkiksi kroonisissa ja akuuteissa infektioissa tai selektiivisissä (antigeeni-spesifisissä) immunologisissa häiriötiloissa, sekä synnynnäisissä, mutta myös kehittyneissä yleisissä (ts. ei-antigeeni-spesifisissä) immunologisissa häiriötiloissa, jollaisia esiintyy vanhenemisen, vaikeiden primäärisairauksien seurauksena ja ennen-

kaikkea ionisoivilla säteillä suoritettun hoidon tai immunosuppressiivisesti vaikuttavien hormonien annostuksen jälkeen. Mainittuja aineita voidaan siis mieluummin käyttää myös yhdistettyinä antibioottisiin ja kemoterapeuttisiin aineisiin ja muihin hoitomenetelmiin immunologisten vahinkojen välttämiseksi. Lopuksi soveltuvat selitetyt aineet myös ihmisten ja eläinten yleisten tulehdussairauksien profylaksiin.

Uusia lipopeptideja voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, ~~tai niiden tässä kuvatuilla uusilla menetelmillä.~~

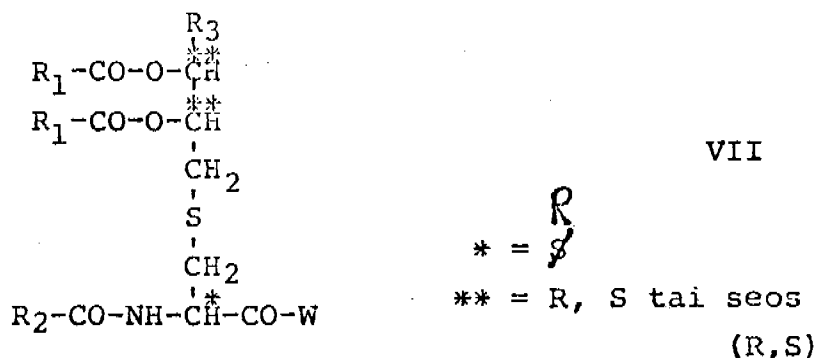
Erään edullisen menetelmän mukaan valmistetaan kaavan I mukaisia yhdisteitä, niiden diastereomeerisia seoksia ja niiden suoloja ja komplekseja siten, että

a) kaavan VI mukaisissa yhdisteissä



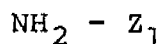
jossa R_1 , R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin kaavassa I ja Y kaavan I vastaavaa aminohappoa tai aminohapposarjaa X, jossa kuitenkin on vähintään yksi aminohappoja substituovista hydrofiilisistä ryhmistä ja/tai terminaalinen karboksyyli-ryhmä on suojattu neutraleissa tai lievästi happamissa olosuhteissa lohkeavalla suojaryhmällä, tai tällaisen yhdisteen suolassa lohkaistaan suojaryhmä(t) tai

b), saatetaan kaavan VII mukainen yhdiste



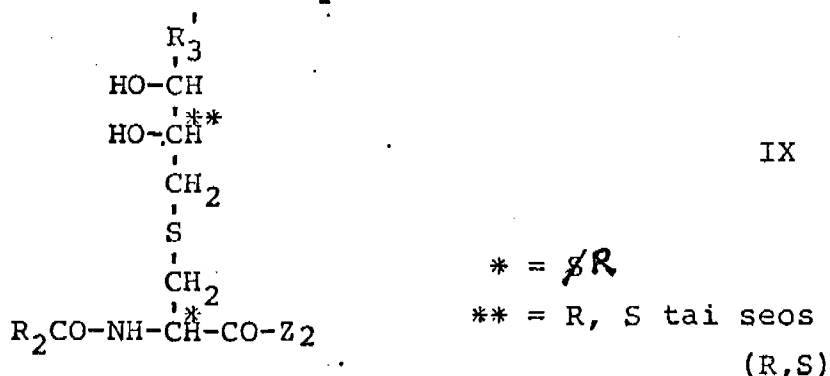
jossa R_1 , R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin kaavassa I ja $W = OH$

tai aminohappo tai epätäydellinen kaavan I mukainen aminohapposarja X, reagoimaan kaavan VIII mukaisen yhdisteen kanssa



VIII

jossa Z_1 tarkoittaa ryhmää X kaavassa I vastaavaa ryhmää vast. mainitulle aminohapolle tai epätäydelliselle aminohapposarjalle X komplementtääristä aminohapposarjaa vast. aminohappoa, joissa sarjoissa ei kuitenkaan ole vapaita aminoryhmiä, tai niiden suolan kanssa, ta
c) asyloidaan kaavan IX mukainen yhdiste



jossa R_2 tarkoittaa samaa kuin kaavassa I ja R_3 vetyä tai ryhmää $\text{HO}-\text{CH}_2$, ja Z_2 esittää kaavan I X:ää vastaavaa ryhmää, jossa ei kuitenkaan ole vapaita hydroksiryhmiä, tai tämän yhdisteen suolan kanssa ja haluttaessa muutetaan saaduissa yhdisteissä, joissa on vapaa terminaalikarboksyyliryhmä tämä amidiryhmäksi tai esteriryhmäksi ja tai muutetaan yhdisteet suoloikseen tai komplekseikseen.

Suojaryhmät menetelmämuunnoksessa a) ovat erikoisesti peptidien synteeseistä tunnettuja suojaryhmiä.

Niinpä esimerkiksi aminoryhmien suojaryhmät ovat asyyli- tai aralkyyli-ryhmiä, kuten formyyl-, trifluoriasetyyli-, ftaloyyli-, bentseenisulfonyyli-, p-tolueenisulfonyyli-, o-nitrofenyyli-sulfonyyli-, 2,4-dinitrofenyyli-sulfonyyli-ryhmät (nämä sulfonyyli-ryhmät voidaan lohkaista myös nukleofiilisten reagenssien, esimerkiksi sulfiittien, tiosulfaattien vaikutuksesta), mahdollisesti substituoituja, kuten esimerkiksi alempialkoksiryhmillä, erikoisesti o- tai p-metoksiryhmillä substituoituja bentsyyli-, tai difenyyli- tai trifenyylimetyyli-ryhmiä tai hiilihaposta peräisin olevia ryhmiä, kuten mahdollisesti aromaattisissa renkaissa, esimerkiksi halogeeniatomeilla, kuten kloorilla tai bromilla, nitroryhmillä, alempialkyyli- tai alempialkoksiryhmillä tai väriä antavilla ryhmillä esim. atsoryhmillä substituoituja aryyli-metyylioksikarbonyyli-ryhmiä, joissa metyleeniryhmät voi olla substituoitu toisella aryyli-tähteellä ja/tai yh-

dellä tai mahdollisesti kahdella alemmalla alkyylitähteellä, kuten bentsyyli-, bentshydryyli tai 2-fenyyli-isopropyylioksikarbonyyliryhmillä, esim. karbobentsoksilla, p-bromi- tai p-kloorikarbobentsoksilla, p-nitrokarbobentsoksilla tai p-metoksikarbobentsoksilla p-fenyyliatso-bentsyylioksikarbonyylillä ja p-(p'-metoksi-fenyyliatso)-bentsyylioksikarbonyylillä, 2-tolyyli-isopropyylioksikarbonyylillä ja varsinkin 2-(p-bifenyyli)-isopropyylioksikarbonyylillä sekä alifaattisia oksikarbonyyliryhmiä, kuten adamantyylioksikarbonyyliä, syklopentylioksikarbonyyliä, trikloorietyylioksikarbonyyliä, tert.amyylioksikarbonyyliä tai ennenkaikkea tert.butyylisikarbonyyliä.

Aminoryhmät voidaan suojata myös enamijä muodostamalla, jotka saadaan antamalla aminoryhmän reagoida 1,3-diketonien, esim. bentsoyyliaetonin, asetyyliasetonin tai dimedonin kanssa.

Karboksyyliryhmät suojataan esim. amideja tai hydratsideja muodostamalla tai esteröimällä. Amidi- ja hydratsidiryhmät voivat mahdollisesti olla substituoituja, amidiryhmä esimerkiksi 3,4-dimetoksibentsyyli- tai bis-(p-metoksifenyyli)-metyyliryhmällä, hydratsidiryhmä esim. karbobentsoksiryhmällä, trikloorietyylioksikarbonyyliryhmällä, trifluoriasetyyliryhmällä, trityyliryhmällä, tert.butyylisikarbonyyliryhmällä tai 2-(p-difenyyli)-isopropyylioksikarbonyyliryhmällä. Esteröintiin sopivat esim. alemmat, mahdollisesti substituoidut alkanolit, kuten metanoli, etanoli, syanimetyylialkoholi, bentsoyylimetyylialkoholi, tai erityisesti tert.butanoli, lisäksi aralkanolit, kuten aroylialempialkanolit, esim. mahdollisesti alempialkyylis- tai alempialkoksiryhmillä tai halogeeniatomeilla substituoidut bentsyylialkoholit tai bentshydrolit, kuten bentshydrolit, p-nitrobentsyylialkoholi, p-metoksibentsyylialkoholi, 2,4,6-trimetyylibentsyylialkoholit, mahdollisesti elektroneja puoleensa vetävillä substituenteilla substituoidut fenolit ja tiofenolit kuten tiofenoli, tiokresoli, p-nitrofiofenoli, 2,4,5- ja 2,4,6-trikloorifenoli, pentakloorifenoli, p-nitrofenoli, 2,4-dinitrofenoli, p-syanofenoli tai p-metaanisulfonyylifenoli, edelleen esim. N-hydroksisukkiini-imidi, N-hydroksiftalimidi, N-hydroksipiperidiini, 8-hydroksikinoliini.

Seriini- ja treoniinitähteiden hydroksiryhmät voivat olla suojattuja esim. esteröinnillä tai eetteröinnillä.

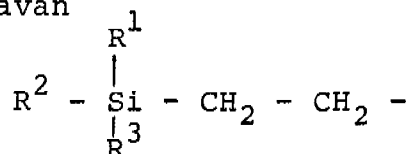
Asyyliähteiksi sopivat esteröintiin ennenkaikkea hiilihaposta peräisin olevat tähteet, kuten bentsoyylisikarbonyyli tai etyyli-

oksikarbonyyli. Eetteröintiin sopivia ryhmiä ovat esim. bentsyyli-, tetrahydropyranyyli, tai tert.butyyliitähteet. Lisäksi sopivat hydroksyyli-ryhmien suojaamiseen julkaisussa Ber. 100 (1967), 3838 - 3849 kuvatut 2,2,2-trifluori-1-tert.butyylioksikarbonyyliamino- tai -1-bentsyylioksikarbonyyliaminoetyyli-ryhmät (Weygand).

Sivuketjujen karboksyyli-ryhmän ja mahdollisesti terminaalisen karboksyyli-ryhmän suojaksi käytetään mieluummin tert.butyyliesteri-ryhmää tai bentshydroliryhmää, sivuketjujen aminoryhmien suojaksi tert.butyylioksikarbonyyli-ryhmää, seriinin tai treoniinin hydroksyyli-ryhmien suojaksi tert.butyylietteri-ryhmää, ja haluttaessa, histidiinin iminoryhmän suojaksi 2,2,2-trifluori-1-tert.butyylioksikarbonyyliaminoetyyli-ryhmää.

Suojaryhmien menetelmän mukainen lohkaus tapahtuu happamilla aineilla lievissä olosuhteissa esim. peptidikemiassa tunnetulla tavalla, esim. käsittelemällä trifluorietikkahapolla.

Karboksyyli-ryhmien erikoinen suojaryhmä, joka lohkeaa neutraaleissa olosuhteissa, on saksalaisessa hakemusjulkaisussa 2706490 kuvattu yleisen kaavan



mukainen ryhmä, jossa R^1 , R^2 ja R^3 tarkoittaa kukin hiilivetytähdetä, jolloin tähteet voivat olla sitoutuneita toisiinsa myös yksinkertaisella C-C-sidoksella, erityisesti alkyyliitähteet, joissa on 1-5 C-atomia. Tämän tyyppin suojaryhmiä ovat esim. 2-(dimetyyli-tert.butyyli-silyyli)-etyyli-, 2-(butyyli-metyylisilyyli)-etyyli- ja ennenkaikkea 2-(trimetyylisilyyli)-etyyli-ryhmä. Vaikka nämä suojaryhmät voidaan lohkaista myös emäksisesti, on niiden lohkeavuus erikoisesti neutraaleissa olosuhteissa, ja jopa fluorivetyhapposuolan vaikutuksesta erikoisen kiinnostava. Suojaryhmän lohkaus tapahtuu edullisesti aproottisessa orgaanisessa liuottimessa; mieluummin vältetään tällöin sellaisia liuottimia, jotka pystyvät solvatoimaan fluoridi-anionin, kuten vettä tai alempialifaattisia alkoholeja.

Menetelmänmuunnoksen b) mukainen kaavan VII mukaisen yhdisteen kondensaatio kaavan VIII mukaisen yhdisteen kanssa suoritetaan esim. siten, että kaavan VII mukainen yhdiste aktivoidun karbonihapon muodossa saatetaan reagoimaan kaavan VIII mukaisen yhdisteen kanssa, tai siten että kaavan VII mukainen happo saatetaan reagoi-

maan kaavan VIII mukaisen yhdisteen kanssa, jonka aminoryhmä on aktivoitavissa muodossa. Mahdollisesti lisätään kaavan VII, vast. kaavan VIII mukaisia yhdisteitä kondensaatioon suojajensa muodossa.

Kaavan VII mukaisen yhdisteen karboksyyli-ryhmä voidaan aktivoida muuttamalla se happoatsidiksi, -anhydridiksi, -imidatsolidiksi, -isoksatsolidiksi tai aktivoitavaksi esteriksi kuten syaanimetyyliesteriksi, karboksimetyyliesteriksi, tiofenyyliesteriksi, p-nitrotiofenyyliesteriksi, tiokresyyliesteriksi, p-metaanisulfonyylifenyyliesteriksi, p-nitrofenyyliesteriksi, 2,4-dinitrofenyyliesteriksi, 2,4,5- tai 2,4,6-trikloorifenyyliesteriksi, pentakloorifenyyliesteriksi, N-hydroksisukkiini-imidiesteriksi, N-hydroksifitalimidiesteriksi, 8-hydroksikinoliiniesteriksi, 2-hydroksi-1,2-dihydro-1-karbetoksi-kinoliiniesteriksi, N-hydroksipiperidiiniesteriksi tai kinoliesteriksi, jota saadaan N-etyyli-5-fenyyli-isoksatsolium-3-sulfonaatin kanssa (Woodward-reagenssi) tai reaktiolla karbodi-imidin avulla (mahdollisesti lisäten N-hydroksisukkiini-imidiä) tai substituomattoman tai esim. halogeenilla, metyyllillä tai metoksyllä substituoidun 1-hydroksibentsotriatsolin, 3-hydroksi-4-okso-3,4-dihydrobentso(d)-1,2,3-triatsiinin tai N,N'-karbonyyli-di-imidatsolin avulla.

Kaavan VIII mukaiset aminoryhmät voidaan aktivoida esimerkiksi antamalla niiden reagoida fosfiitin kanssa.

Kondensaation käyttökelpoisimpina menetelminä on mainittava: Weygand-Wünsch'in menetelmä (karbodi-imidi N-hydroksisukkiini-imidin läsnäollessa), atsidimenetelmä, N-karboksianhydridi- tai N-tiokarboksianhydridi-menetelmä, aktivoitujen estereiden menetelmä ja anhydridimenetelmä. Erityisesti voidaan näitä kondensaatioita suorittaa Merryfield-menetelmää käyttäen.

On myös mahdollista suorittaa kaavan VII mukaisen yhdisteen kondensatio edellä mainituilla menetelmillä kaavaa VIII vastaavan yhdisteen kanssa, jonka terminaalinen karboksyyli-ryhmä on suojattu jollain X:nä edellä määritetyistä amidi- tai esteriryhmistä poikkeavalla suojaryhmällä, kuten jollakin edellämainituista ryhmistä, ja/tai jossa on yksi tai useampi hydrofiilinen ryhmä suojatussa muodossa, kuten edellä on kuvattu. Näin saadaan kondensaatiotuotteita jotka kuuluvat edellä kuvatussa menetelmämuunnoksen a) käyttämien kaavan VI mukaisten lähtöaineiden ryhmään, jotka ovat samoin tämän keksinnön kohteena.

Edellisen menetelmämuunnoksen c) mukaan asyloidaan kaavan IX mukaisissa yhdisteissä, jotka eivät saa sisältää osassa Z_2 mitään vapaata hydroksiryhmää, glyseryyli- vast. erytrityylitähteessä olevat vapaat hydroksyyli-ryhmät. Tämä asylointi voidaan suorittaa sinänsä tunnetulla tavalla, esim. reaktiolla yhdisteeseen liitettävää tähdettä vastaavan hapon reaktiivisen funktionaalisen johdannaisen, kuten anhydridin tai happohalogenidin kanssa, mieluummin tertiäärisen emäksen, kuten pyridiinin tai kollidiinin läsnäollessa.

Tämä menetelmä sopii erikoisesti kaavan I mukaisten menetelmätuotteiden valmistamiseen, joissa asyyli- tai kysteiinitähteet glyseryyli- vast. erytrityylitähteessä ja kysteiinitähteessä ovat erilaisia.

Jos käytetään tätä muunnosta kaavan IX mukaisten yhdisteiden kohdalla, joissa kuitenkin osassa Z_2 terminaalinen karboksyyli-ryhmä on suojattu paitsi amidi- tai esteritähteellä, kuten aikaisemmin X, myös muilla suojaryhmillä, ja/tai yksi tai useampi hydrofiilistä ryhmistä esiintyy suojatussa muodossa, kuten edellä on kuvattu, päästään samoin edelläolevan muunnoksen a) lähtöyhdisteisiin.

Millä tahansa kuvatuista menetelmämuunnoksista saatavissa kaavan I mukaisissa lipopeptideissä, joissa on vapaa terminaalinen karboksyyli-ryhmä osassa X, voidaan tämä muuttaa sinänsä tunnetulla tavalla esim. peptidikemiassa yleisillä menetelmillä amidi- tai esteriryhmäksi.

Eräs lähtöaineena käytettävä, kaavan VII mukainen N-asyyli- tai N,O,O-kysteiini voidaan saada seuraavalla tavalla, mikäli $W = OH$ ja $R_3 = H$: lähtien 1.1,5.6-D-manniittidiasetoniidista saadaan perjodaattihapetuksella 2-O,3-O-isopropylideeni-D-glyserolialdehydiä, pelkistetään aldehydiryhmä karbinoliryhmäksi ja esteröidään tämä p-tolueenisulfonihapolla. Näin saatu 1-O-tosyyli-2(R)-O,3-O-isopropylideeniglyseroli kondensoidaan N-asyyli-(S)-kysteiinillä emäksisen aineen, esim. kaliumkarbonaatin läsnäollessa, ja näin saadaan N-asyyli-S-(2(R),3-isopropyleenidioksi-propyyli)-(S)-kysteiiniä, joka saippuoidaan happamasti, esim. etikkahapolla. Näin saatu N-asyyli-S-(2(R),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiini voidaan haluttaessa asyloida edelleen glyseroliosan 2- ja 3-asemassa, mieluummin vliaikaisesti karboksyyli-ryhmää suojatessa, esim. edelläkuvatun trimetyylisilyylietyyli-ryhmän, tai mieluummin bentshydryyli-esteriryhmän avulla.

Jonkin kaavan VII mukaisena lähtöaineena käytettävän N-asyyli- tai N,O,O,O-tetra-asyyli-S-(2,3,4-trihydroksibutyyli)-kysteiinin valmistamiseksi voidaan toimia analogisesti esimerkin 7 menetelmän mukaan.

Uusien lipopeptidien menetelmänmukaiseen valmistukseen käytettävät aminohapot vast.peptidit ovat tunnettuja tai voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Myös itse edellämainituilla lähtöyhdisteillä (VII) menetelmämuunnosta b) varten tapauksessa, jossa $W = OH$, sekä niiden diastereomeerisilla seoksilla, suoloilla ja komplekseilla on immunipotensoiva teho, jolloin tämä esiintyy in vitro samalla annosalueella, kuin kaavan I mukaisille yhdisteille ja niiden johdannaisille on mainittu. In vivo osoittavat mainitut yhdisteet edelläkuvatussa kokeessa humoraalisen immunitetin lisäämiseksi intraperitoneaalaisella annostuksella 5 vuorokautta ennen antigeenin annostusta seerumissa vasta-ainetiitterin kohoamisen annosalueella 1,0-3,0 mg/kg eläintä.

Näitä yhdisteitä voidaan saada asyloimalla kaavan IX mukaista yhdistettä, jossa kuitenkin Z_2 :n sijasta on hydroksiryhmä, kuten edellä muunnoksessa c) on kuvattu. Tähän vaadittavien lähtöaineiden valmistus, ts. glyseryyli- vast. eritrityyli-N-asyyli-kysteiinien valmistus on kuvattu edellä. Kaavan IX mukaiset yhdisteet, joissa Z_2 tarkoittaa samaa kuin kaavassa I ryhmä X, ja jossa kuitenkin ei ole vapaita hydroksyyli-ryhmiä, voidaan saada niinikään antamalla mainittujen N-asyyli-kysteiini-johdannaisten reagoida kaavan NH_2-Z_2 mukaisen yhdisteen kanssa samojen periaatteiden mukaan kuin mitä edellä on kuvattu yleisen menetelmän muunnoksessa b) keksinnön mukaisten lipopeptidien valmistamiseksi.

Saadut lipopeptidit voidaan sinänsä tunnetulla tavalla muuttaa suoloikseen, esim. saattamalla saatuja happamia yhdisteitä reagoimaan alkali- tai maa-alkalihydroksidien kanssa tai saatuja emäksisiä yhdisteitä happojen kanssa.

Koska uudet yhdisteet vapaassa muodossa ja suolojensa kompleksiansa muodossa ovat hyvin samankaltaisia on edellä ja seuraavassa vapailla yhdisteillä tarkoituksenmukaisesti ymmärrettävä myös mahdollisesti vastaavia suoloja.

Saadut isomeeriseokset voidaan ainesosien fysikaalis-kemiallisten eroavaisuuksien perusteella sinänsä tunnetulla tavalla jakaa osiin, esimerkiksi kromatografoimalla ja/tai fraktioivalla kiteytämällä. Mieluimmin eristetään tehokkaampi isomeereista.

Edelläkuvatut menetelmät suoritetaan esim. sinänsä tunnetuilla menetelmillä, ilman laimennus- tai liuotinaaineita tai mieluummin niiden läsnäollessa, jos välttämätöntä samalla jäähdyttäen tai lämmittäen, kohotetussa paineessa ja/tai inerttikaasu-, kuten typpi-atmosfäärissä. Tällöin on vaadittaessa otettava huomioon kaikki molekyylissä sijaitsevat substituentit, varsinkin helposti hydrolysoituvien O-asyylitähteiden läsnäollessa, ja käytettävä erikoisen varovaisia reaktio-olosuhteita, kuten lyhyitä reaktioaikoja, laimeita happamia väliaineita alhaisissa pitoisuuksissa, stökiometrisiä määrasuhteita, sopivien katalysaattorien liuottimien, lämpötilojen ja/tai paineolosuhteiden valintaa.

Keksintö koskee myös niitä menetelmän suoritusmuotoja, joissa lähdetään missä tahansa menetelmävaiheessa välituotteena saatavasta yhdisteestä ja suoritetaan puuttuvat menetelmävaiheet, tai joissa menetelmä keskeytetään missä tahansa vaiheessa tai muodostetaan jokin lähtöaine reaktio-olosuhteissa tai käytetään sitä reaktiokykyisen suolan johdannaisensa tai suolansa muodossa. Tällöin lähdetään mieluummin sellaisista lähtöaineista, jotka johtavat menetelmän mukaisesti edellä erikoisen arvokkaiksi kuvattuihin yhdisteisiin.

Tämä keksintö koskee samoin farmaseuttisia valmisteita, jotka sisältävät kuvattuja uusia keksinnön mukaisia lipopeptidejä, sekä kaavan I että kaavan VII mukaisia, niiden seoksia, suoloja tai komplekseja. Keksinnön mukaisten farmaseuttisten valmisteiden kohdalla on kyse enteraaliseen, oraaliseen, tai rektaaliseen, sekä parenteraaliseen annostukseen lämminverisille sopivia, jotka sisältävät farmakologisen tehoaineen yksinään tai yhdessä farmaseuttisesti käytökelpoisen kantaja-aineen kanssa. Tehoaineen annostus riippuu lämminverisen lajista, iästä ja yksilöllisestä tilasta sekä annostustavasta.

Uudet farmaseuttiset valmisteet sisältävät noin 10-95 %, mieluummin noin 20-90 % tehoainetta. Keksinnön mukaiset farmaseuttiset valmisteet voivat olla esim. annosyksikkömuodossa, kuten rakeina, tabletteina, kapsелеina, suppositorioidina tai ampulleina.

Keksinnön mukaiset farmaseuttiset valmisteet valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla, esim. tavallisten sekoitus-, granulointi-, rakeistus-, liuotus- tai lyofilisointimenetelmillä.

Sopivia kantaja-aineita ovat erityisesti täyteaineet, kuten sokerit, esim. laktoosi, sakkaroosi, manniitti tai sorbiitti, selluloosavalmisteet ja/tai kalsiumfosfaatit, esim. trikalsiumfosfaatti tai kalsiumvetyfosfaatti, lisäksi aineaineet, kuten tärkkelysliis-

terit käyttäen esim. maissi-, vehnä-, riisi- tai perunatärkkelystä, liivatetta, traganttia, metyyliiselluloosaa, hydroksipropyylimetyyliiselluloosaa, natriumkarboksimeyyliiselluloosaa, ja/tai polyvinyylipyrrolidonia, ja/tai haluttaessa, hajotusainetta, kuten edellämainittua tärkkelystä, lisäksi karboksimeyyliitärkkelys, poikittain haarautunut polyvinyylipyrrolidoni, agar, algiinihappo tai sen suola, kuten natriumalginaatti, apuaineita ovat ensisijassa juoksevuutta säätelevät aineet ja voiteluaineet, esim. piihappo, talkki, steariinihappo tai sen suolat, kuten magnesium- tai kalsiumstearaatti, ja/tai polyetyleeniglykoli. Raeytimet päällystetään sopivilla, mahdollisesti vatsahapporesistenteillä päällyksillä, jolloin käytetään mm. väkeviä sokeriliuoksia, jotka mahdollisesti sisältävät arabikumia, talkkia, polyvinyylipyrrolidonia, polyetyleeniglykolia ja/tai titaanidioksidia, lakkaliuoksia sopivissa orgaanisissa liuottimissa tai liuotinaineseoksissa, tai vatsahapporesistenttien päällysteiden valmistamiseksi sopivien selluloosavalmisteiden liuoksia, kuten asetyyliiselluloosaftalaattia tai hydroksipropyylimetyyliiselluloosaftalaattia. Tabletteihin tai rae-päällyksiin voidaan käyttää väriaineita tai pigmenttejä, esim. erisuuruisten tehoaineannosten identifioimiseksi tai tunnistamiseksi.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edelläselostetua keksintöä; ne eivät kuitenkaan mitenkään rajoita sen piiriä. Lämpötilat ilmaistaan Celsius-asteina. Käytetyt lyhenteet tarkoittavat:

Z = karbobentsoksi
 Bu^t = tert.butyylietteri
 OBu^t = tert.butyyliesteri
 BOC = tert.butoksikarbonyyli
 DMF = dimetyyliformamidi
 ONp = p-nitrofenyyliesteri
 HOBt = N-hydroksibentsotriatsoli
 DC = ohutkerroskromatografia

DC:ssa käytetään piihappogeeliä adsorbenssina ja seuraavia systeemejä ajoaineina:

Systeemi 3: Etikkaesteri-pyridiini-vesi (65:20:15)
 Systeemi 157: Kloroformi-metanoli-vesi-jääetikka (70:42:10:0,5)
 Systeemi 157c: Kloroformi-metanoli-vesi-jääetikka (75:25:5:0,5)

Esimerkki 1:

1,13 g (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:iä liuotetaan 5 ml:aan 90%:sta tri-fluorietikkahappoa ja liuos väkevöidään 45 minuutin kuluttua 20°C:ssa noin 2 ml:ksi. Tuote saostetaan lisäämällä 75 ml peroksiditonta eetteriä, suodatetaan ja kuivataan kaliumhydroksidilla. Näin saatu lipopeptidi (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-OH antaa ohutkerroskromatogrammissa silikageelillä seuraavat Rf-arvot: Rf (kloroformi-metanoli-jäätikka-vesi) 79:25:0,5:4,5) = 0,25.

0,89 g (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dihydroksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:iä liuotetaan 10 ml:aan pyridiiniä, lisätään 0,725 ml palmitiinihappokloridia ja liuos pidetään 24 tunnin ajan 45°C:ssa. Tämän jälkeen lisätään 200 ml kloroformia ja uutetaan liuos 1N sitruunahapolla, 1N-natriumbikarbonaatilla ja vedellä, kuivataan orgaaninen faasi natriumsulfaatilla ja haihdutetaan liuotin pois. Jäännös puhdistetaan kromatografiolla piihappogeelillä kloroformisysteemissä, tai kloroformi-metanolissa (98:2). Ohutkerroskromatograafisesti yhtenäinen lipopeptidi (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t antaa kloroformi-metanolissa (9:1) piihappogeelillä Rf-arvon 0,75.

0,90 g:aan (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dihydroksi-propyyli)-kysteiiniä ja 0,99 g:aan H-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:iä 20 ml:ssa dietyyli-formamidia lisätään 0°C:ssa 0,472 g disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 0,309 g N-hydroksibentsotriatsolia. 2 tunnin jälkeen 0°C:ssa ja 15 tunnin jälkeen 20°C:ssa suodatetaan seos ja suodos haihdutetaan. Jäännös puhdistetaan kromatografiolla piihappogeelipylväällä kloroformi-metanoli-systeemissä (98:2). Ohutkerroskromatogrammissa piihappogeelillä antaa näin saatu lipopeptidi-johdannainen (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dihydroksi-propyyli)-Cys-Ser-(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t Rf-arvon 0,60 (kloroformi-metanoli 8:2).

6,09 g Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:iä liuotetaan 60 ml:aan metanolia ja sen jälkeen kun on lisätty 0,5 g palladium-hiiltä (10%:sta) liuos hydrataan huoneenlämpötilassa 3 tunnin ajan. Katalysaattori suodatetaan pois ja suodos haihdutetaan. Tuote saostuu valkoisena vaahtona. Ohutkerroskromatogrammissa piihappogeelillä osoittaa peptidi H-Ser-(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t Rf-arvon 0,41 (kloroformi-metanolissa (8:2)).

4,134 g Z-Ser(Bu^t)-OH:ta ja 4,64 g H-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:iä liuotetaan 50 ml:aan dimetyyliformamidia ja seokseen lisätään 0^o:ssa 3,172 g disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 1,89 g N-hydroksibentsotriatsolia. 2 tunnin kuluttua 0^o:ssa ja 15 tunnin kuluttua 20^o:ssa imusuodatetaan saostunut disykloheksyyli-virtsaa-aine, suodos haihdutetaan, jäännös liuotetaan etikkaesteriin ja liuos uuteetaan 1N sitruunahapolla, 1N natriumbikarbonaatilla ja vedellä, kuivataan natriumsulfaattilla ja haihdutetaan. Jäännös kiteytetään uudelleen etikkaesteri-heksaanista. Saatu peptidi Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t sulaa 96-98^o:ssa. Piihappogeelissä Rf-arvo on (kloroformi-metanoli 95:5) = 0,25.

4,65 g Z-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t:ia hydrataan 50 ml:ssa metanolia 0,4 g:lla palladiumhiiltä (10%:sta). Katalysaattorin suodattamisen jälkeen ja suodoksen haihduttamisen jälkeen saadaan valkoisena vaahtona peptidi H-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t. Piihappogeelillä Rf-arvo (kloroformi-metanoli 7:3) = 0,48.

5,9 g Z-Ser(Bu^t)-OH:ta ja 3,76 g H-Asn-OBu^t:ia liuotetaan 60 ml:aan dimetyyliformamidia ja siihen lisätään 0^o:ssa 3,06 g N-hydroksibentsotriatsolia ja 4,53 g disykloheksyylikarbodi-imidiä. 2 tunnin kuluttua 0^o:ssa ja 15 tunnin kuluttua 20^o:ssa suodatetaan, haihdutetaan suodos ja kiteytetään jäännös etikkaesteri-petrolieetteristä. Saatu peptidi Z-Ser(Bu^t)-Asn-OBu^t sulaa 114-115^o:ssa. $(\alpha)_D^{20} = +4^{\circ}$ (C = 1,5 metanolissa). Piihappogeelillä Rf on (kloroformi-metanoli 9:1) = 0,48.

Esimerkki 2:

1,6 g (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-Ala-OBu^t:iä liuotetaan 7,5 ml:aan 90%:sta trifluorietikkahappoa ja liuosta väkevöidään 15 minuutin kuluttua 20^o:ssa noin 2 ml:n tilavuuteen. Tuote saostetaan 100 ml:lla eetteriä, suodatetaan ja kuivataan natriumhydroksidilla. Tuloksena saadaan valkeaa jauhetta, jonka sulamispiste on 215-217^o (hajoten), joka on lipopeptidiä (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-OH. Piihappogeelillä Rf (157) = 0,55.

Esimerkki 3:

0,95 g (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OBu^t:iä liuotetaan 4 ml:aan 90%:sta trifluorietikkahappoa. 15 minuutin kuluttua 20^o:ssa lisätään 100 ml eetteriä, suodatetaan ja kuivataan jäännös natriumhydroksidilla. Muodostunut lipopeptidi (N-palmitoyyli-S-2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-OH saadaan värittömänä, ei hygroskooppisena

jauheena. Piihappogeelillä: Rf (kloroformi-metanoli-jääetikka-
vesi 79:25:0,5:4,5) = 0,53.

Esimerkki 4:

Esimerkissä 1 lähtöaineena käytetty N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dihydroksipropyyli)-⁽³⁾(~~2~~)-kysteiini voidaan valmistaa seuraavasti:

13,9 g N-palmitoyyli-⁽³⁾(~~2~~)-kysteiiniä, 5 g kaliumkarbonaattia ja 15 g 1-O-tosyyli-2(R)-O-3-O-isopropylideeni-glyserolia kuumennetaan 8 tunnin ajan 80°:ssa 250 ml:ssa etanolia typpiatmosfäärissä. Haihduttamisen jälkeen saatu reaktioseos puhdistetaan kromatografialla 400 g:lla piihappogeelillä Merck eluoimalla, ensin kloroformi/asetonilla (8:2), sitten kloroformi/metanolilla (8:2). Näin saadaan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-isopropylideenidioksipropyyli)-⁽³⁾(~~2~~)-kysteiinin kaliumsuola, joka saippuoidaan 4 tuntia kuumentamalla 80°C:ssa 80%:sessa etikkahapon vesiliuoksessa. Haihdutetaan kuiviin, liuotetaan jäännös kloroformiin ja ravistellaan vedellä. Kuivaamisen ja kloroformi-faasin haihduttamisen jälkeen saadaan väritön jäännös, joka kiteytetään uudelleen sykloheksaanista ja joka on N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dihydroksipropyyli)-⁽³⁾(~~2~~)-kysteiiniä. Sul.p. 110°, (α)_D²⁰ = -25° (c = 0,9, MeOH).

N-palmitoyyli-⁽³⁾(~~2~~)-kysteiini voidaan valmistaa seuraavasti:

45 g ⁽³⁾(~~2~~)-kysteiiniä (0,37 moolia) suspensoidaan 350 ml:aan pyridiiniä ja tiputetaan samalla hyvin sekoittaen typpiatmosfäärissä huoneen lämpötilassa liuokseen, jossa on 140 ml (1,67 ekvivalenttia) palmitiinihappokloridia 550 ml:ssa metyleenikloridia. 20-tuntisen sekoittamisen jälkeen hapotetaan 2N-suolahapolla ja jaetaan kloroformin ja veden kesken. Kloroformi-faasin kuivaamisen ja haihduttamisen jälkeen saadaan kideseos, joka koostuu noin kolmannekseltaan dipalmitoyyli-kysteiinistä ja 2/3:taan monopalmitoyyli-kysteiinistä. Uutetaan kolmesti yhdellä litralla kuumaa asetonia, josta kiteytyy 1:1-seos di- ja mono-palmitoyyli-kysteiiniä. Asetoniliuoksesta saadaan haihduttamalla N-palmitoyyli-kysteiiniä, joka uudelleenkiteytetään bentsiinistä, sul.p. 65-67°C. (α)_D²⁰ = +1° (c = 0,8; metanoli).

Di- ja mono-palmitoyyli-kysteiinin seokset käsitellään metanolipitoisessa liuoksessa lisäten vesiliuosta, jossa on 12,0 g natriumsulfidia ja 2 ml väkevää natriumlipettä, 15 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Metanolin haihduttamisen ja jäännöksen hapottamisen jälkeen 2N-suolahapolla saadaan kloroformi-uutoksella jäljelle jäänyt N-palmitoyyli-kysteiini talteen joka samoin kiteytetään uudelleen bentsiinistä.

Esimerkki 5:

0,80 g N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(8)-kysteiniä ja 0,67 g H-Ser(Bu^t)-Phe-Ala-Glu(OBu^t):ta liuotetaan 10 ml:aan dimetyyli-formamidia ja siihen lisätään 0,22 g disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 0,16 g N-hydroksibentsotriatsolia. Lämmittämällä lyhyesti 40^o:seen saadaan kirkas liuos, joka noin tunnin kuluttua 20^o:ssa jähmettyy hyytelöksi. Tämä saatetaan taas liuokseksi lämmittämällä 24 tuntia 40^o:ssa ja tästä saostetaan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂ vedellä. Tuote puhdistetaan kromatografialla piihappogeelillä kloroformi- vast. kloroformi-metanoli-systeemissä, 98:2 ja sen Rf-arvo = 0,64 kloroformi-metanoli-vedessä 95:5.

540 mg näin saatua yhdistettä liuotetaan 30 ml:aan 90-%:sta trifluorietikkahappoa ja liuos väkevöidään 30 minuutin kuluttua 20^o:ssa noin puoleen tilavuuteen ja petrolieetterillä saostetaan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH. Yhdiste sentrifugoidaan, pestään kolmesti petrolieetterillä ja kuivataan kaliumhydroksidilla. Se on valkoinen jauhe jonka Rf-arvo on (systeemi 157) = 0,63.

Analogisella tavalla valmistetaan seuraavia lipopeptidejä:
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH, Rf (systeemi 157 c) = 0,18;
 N-myristoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Glu-Gln-Asn-Ala-Lys-OH, Rf (systeemi 157 c) = 0,12;
 N-laurooyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH, Rf (systeemi 157 c) = 0,20;
 N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Ala-OH, Rf 1

Edelläkuvattu mainituilla suojaryhmillä varustettu peptidi, jota käytetään lähtöaineena kondensaatiossa N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(8)-kysteiinin kanssa, voidaan valmist seuraavasti:

17,22 g Z-Ala-ONp:tä, 14,8 g HCl. H-Glu (OBu^t)₂:ta ja 6,3 ml N-etyylimorfoliinia seisotetaan 40 ml:ssa dimetyyli-formamidia yli yön 20^o:ssa. Liuos haihdutetaan, jäännös liuotetaan etikkaesteriin ja uutetaan 1N-natriumbikarbonaatilla ja vedellä.

Etikkaesteriliuos haihdutetaan ja jäljelle jää vaahtona Z-Ala-Glu(OBu^t)₂, jonka Rf-arvo = 0,60 (kloroformi-metanolissa 95:5), jota käytetään suoraan edelleen: 8,5 g liuotetaan 60 ml:aan metanolia ja siihen lisätään 0,8 mg Pd-hiiltä (10%:sta) ja hydra-

taan 20⁰:ssa 2 tunnin ajan. Katalysaattori suodatetaan ja suodos haihdutetaan. Saadaan H-Ala-Glu(OBu^t)₂ valkoisena vaahtona, jonka Rf = 0,36 kloroformi-metanolissa 9:1.

11,46 g:aan Z-Phe-OH:tä ja 12,64 g:aan H-Ala-Glu(OBu^t)₂:ta 50 ml:ssa dimetyyliformamidia lisätään 0⁰:ssa 8,68 g disykloheksyylikarbodi-imidiä ja 5,86 g N-hydroksibentsotriatsolia. 15 tunnin kuluttua 4⁰:ssa suodatetaan seos, suodos haihdutetaan ja jäännös kiteytetään uudelleen etikkaesteri-heksaanista. Saadaan Z-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂, jonka sul.p. 161-163⁰C. Rf-arvo (tolueeni-asetoni 1:1) = 0,63.

6,4 g tätä tuotetta liuotetaan 50 ml:aan metanolia ja se hydrataan lisäten 0,5 g Pd-hiiltä (10%:sta) 20⁰:ssa 20 minuutin ajan, katalysaattori suodatetaan ja suodos haihdutetaan, jolloin saadaan H-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂ valkoisena vaahtona. Rf (kloroformi-metanoli 7:3) = 0,75.

4,43 g:aan Z-Ser(Bu^t)-OH:ta ja 3,18 g:aan HCl.H-Ser(Bu^t)-OMe:ta 30 ml:ssa dimetyyliformamidia lisätään 0⁰:ssa 1,89 ml N-etyylimorfoliinia, 2,29 g HOBt:tä ja 3,4 g disykloheksyylikarbodi-imidiä. 2 tunnin jälkeen 0⁰:ssa ja 15 tunnin jälkeen 20⁰:ssa suodatetaan, suodos haihdutetaan ja liuotetaan etikkaesteriin. Liuoksen uuttamisen jälkeen natriumbikarbonaatilla, laimealla suolahapolla ja vedellä jäännös haihdutetaan, jolloin saadaan Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OMe öljynä, Rf = (tolueeni-asetoni 1:1) = 0,70.

6,8 g tätä tuotetta sisältävään 40 ml:n metanoliliuokseen lisätään 7,5 ml hydratsiinihydraattia ja 24 tunnin jälkeen 20⁰:ssa haihdutetaan noin puoleen tilavuuteen. Liuotetaan 250 ml:aan etikkaesteriä ja uutetaan vedellä. Etikkaesteriliuos väkevöidään ja saatu Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-NH-NH₂ saostetaan petrolieetterillä. Rf (tolueeni-asetoni 1:1) = 0,50.

2,26 g tätä tuotetta liuotetaan 20 ml:aan dimetyyliformamidia ja siihen lisätään -10⁰:ssa 7,022 ml 1,78 N-HCl:ää etikkaesterissä ja 0,635 ml tert.butyylinitriittiä. 10 minuutin kuluttua -10⁰:ssa lisätään tiputtamalla liuos, jossa on 2,38 g H-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂:ta ja 2,52 ml N-etyylimorfoliinia ja seisotetaan 1 tunnin ajan -10⁰:ssa ja 15 tunnin ajan 0⁰:ssa. Sen jälkeen liuos haihdutetaan, jäännös liuotetaan etikkaesteriin ja pestään natriumbikarbonaatilla, laimealla suolahapolla ja vedellä. Liuoksen haihduttamisen jälkeen saatu Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂ kiteytetään uudelleen etikkaesteri-heksaanista, sul.p. 213-215⁰, Rf (tolueeni-asetoni 1:1) = 0,70.

2,30 g tätä tuotetta liuotetaan 40 ml:aan metanolia ja lisäten 0,5 g Pd-hiiltä (10%:sta) hydrataan 20°:ssa 2 tunnin ajan. Katalyysaattori suodatetaan ja suodos haihdutetaan, jolloin H-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Ala-Glu(OBu^t)₂ saostuu valkeana vaahtona. Rf (tolueenasetoni 1:1) = 0,23.

Lähtöainena käytetty N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(S)-kysteiini ja tämän yhdisteen diastereomeerinen seos vastaavan 2(S)-yhdisteen kanssa, joka tässä lyhennetään 2(R,S)^R, voidaan valmistaa seuraavasti:

6,3 g (2,73 mmoolia) N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(S)-kysteiini-bentshydryyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 12 ml trifluorietikkahappoa ja 48 ml metyleenikloridia. Tunnin kuluttua huoneen lämpötilassa haihdutetaan liuos ja öljymäinen jäännös hierretään veden kanssa. Kiteytynyt N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(S)-kysteiini imusuodatetaan, kuivataan ja bentshydrolin poistamiseksi hierretään kolmesti bentsiinillä. Jäännös kiteytetään asetonivedestä ja saadaan näin värittömiä kiteitä tätä tuotetta, jonka sulamispiste on 71-75° ja $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ$ (dioksaani).

Edellämäinittu esteri saadaan seuraavalla tavalla:

12 g (20 mmoolia) N-palmitoyyli-S 2(R),3-dihydroksipropyyli -(S)^R kysteiini-bentshydryyliesteriä liuotetaan seokseen, jossa on 60 ml pyridiiniä ja 60 ml metyleenikloridia, ja siihen tiputetaan 0-10°:ssa 14,5 ml (13,2 g) palmitiinihappokloridia. 2 tunnin kuluttua huoneen lämpötilassa on reaktio ohutkerroskromatogrammin mukaan päättynyt. Suspensioon (pyridiinihydrokloridi) lisätään 10 ml metanolia hämmennetään 20 minuuttia 25°:ssa ja sen jälkeen haihdutetaan reaktioseos pieneen tilavuuteen. Jäännös liuotetaan kloroformiin, ravistellaan kulloinkin kahdesti 0,5N-suolahapolla, 10%:sella natriumbikarbonaatilla ja vedellä, kuivataan kloroformi-faasi natriumsulfaattilla ja haihdutetaan siirapiksi. Puhdasta esteriä saadaan kromatografoimalla tätä siirappia piihappogeelillä kloroformissa. Kromatograafisesti yhtenäiset fraktiot (DC-kontrolli piihappogeelillä kloroformissa:etikkaesteri 98:2, Rf = 0,5) haihdutetaan ja kiteytetään uudelleen asetonista. Saadaan N-palmitoyyli-(S)-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-(S)^R-kysteiini-bentshydryyliesteri värittöminä kiteinä, joiden sul.p. 69-71°.

Edellä käytetty N-palmitoyyli-S(2(R),3-dihydroksipropyyli)-(S)^R-kysteiini^R saadaan esim. seuraavalla tavalla: 23,4 g (54 mmoolia)

N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiiniä liuotetaan 150 ml:aan kloroformi-etanoli-seosta 1:1 ja siihen tiputetaan huoneenlämpötilassa liuos, jossa on 13,6 g (70 mmoolia) difenyylidiatsometaania 50 ml:ssa kloroformia. Kun liuos on seisonut 3 tuntia huoneenlämpötilassa alkuaan punainen liuos on tullut värittömäksi ja DC:n mukaan (kloroformi:metanoli = 9:1, piihappogeeli reaktio on päättynyt.

Haihdutetaan tyhjössä kuiviin ja uutetaan jäännös kylmällä petrolieetterillä. Jäännös suodatetaan piihappogeelillä metyleenikloridi liuottimena. Näin saadaan värittömiä bentshydryyliesterikiteitä, joiden sul.p. on 88-91°.

N-palmitoyyli-2-(2(R,S),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiinin valmistamiseksi menetellään seuraavasti:

50 g (139 mmoolia) N-palmitoyyli-kysteiiniä, 12,4 g glysidia ja 45 g kaliumkarbonaattia kuumennetaan 375 ml:ssa etanolia typpi-atmosfäärissä samalla hyvin sekoittaen 16 tunnin ajan 80°:seen. Jäähdyttämisen jälkeen huoneen lämpötilaan hapotetaan seos 2N-solahapolla noin pH-arvoon 4 ja lisätään vettä; tällöin tuote saostuu. Se imusuodatetaan ja pestään vedellä, kunnes suodoksessa ei ole kloori-ioneja. Saostuman kuivaamisen jälkeen tyhjössä se kiteytetään uudelleen etikkaesteristä. Saadaan värittömiä N-palmitoyyli-S(2(R),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiini- ja N-palmitoyyli-S(2(S),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiini-diastereomeeriseoksen kiteitä, joiden sul.p. on 76-155°.

Saattamalla N-palmitoyyli-S(2(R,S),3-dihydroksipropyyli)-(R)-kysteiini reagoimaan difenyylidiatsometaanin kanssa, kuten edellä on mainittu R-yhdisteestä, saadaan N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(R)-kyste-inibentshydryyliesteriä: värittömien kiteiden sul.p. 84-85°.

Kun tätä diastereomeeriseosta (19,8 g) kromatografoidaan pylväällä jossa on 250 g piihappogeeliä (Merck) metyleenikloridi liuottimena, saadaan ensimmäisessä fraktiossa (1,55 g) R-diastereomeeriä ($R_f = 0,61$, metyleenikloridi:etikkaesteri = 98:2, ohutkerros piihappogeeli), toisessa fraktiossa 12,7 g R,S-diastereomeeriseosta ja kolmannessa fraktiossa (1,1 g) S-diastereomeeriä ($R_f = 0,53$ metyleenikloridi:etikkaesteri = 98:2).

S-diastereomeereista saadaan edellä kuvatulla tavalla N-palmitoyyli-S-(2(S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(R)-kysteiiniä; värittömät kiteet, sul.p. 64-65°, $(\alpha)_D^{20} = +1^\circ$ (dioksaani).

Tässä esimerkissä mainittujen, vastaavalla tavalla kuin N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, valmistettavien keksinnön mukaisten uusien lipopeptidien valmistamiseksi tarvittavat lähtöaineet ovat esimerkiksi

- N-myristoyyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 140-150°; ja
- N-stearoyyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 140-150°;
- N-lauroyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 140-150°.

Ne voidaan valmistaa esimerkissä 4 annettujen ohjeiden mukaan.

Edellämainittujen ohjeiden mukaan valmistettujen bentshydryyli-estereiden ominaisuudet ovat seuraavat:

- N-myristoyyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, värittömät kiteet, sul.p. 90-92°;
- N-stearoyyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, värittömät kiteet, sul.p. 95-97°;
- N-lauroyli-S-(2(R),3-dihydroksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, värittömät kiteet, sul.p. 95-97°.

Analogisella edellä kuvatulla tavalla voidaan saada seuraavia

- N-asyyli-S-(2(R),3-diasyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliestereitä, joissa on erilaisia asyyliiryhmiä N- ja O-atomeissa:
- N-lauroyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, sul.p. 65-68°;
- N-myristoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, sul.p. 68-70°;
- N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini-bentshydryyliesteri, sul.p. 70-72°.

Muita värituotteena käytettäviä yhdisteitä, joita voidaan valmistaa ylläolevien ohjeiden mukaan ovat:

- N-lauroyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 70-72°;
- N-myristoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 71-73°;
- N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-(S)-kysteini, värittömät kiteet, sul.p. 74-77°.

Esimerkki 6:

Esimerkissä 5 kuvatuilla reaktioilla valmistetaan seuraavia lähtöaineita hakemuksen mukaisten lipopeptidien valmistamiseksi:

- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dilauroyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiinibentshydryyliesteri, väritön vaha;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-distearoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiinibentshydryyliesteri, värittömät kiteet, sul.p. 80-82°;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dioleoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiinibentshydryyliesteri, väritön öljy;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dibehenoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiinibentshydryyliesteri, värittömät kiteet, sul.p. 85-88°;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-di-(dihydrosterkuloyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiinibentshydryyliesteri, väritön vaha.

Vastaavilla, esteröimättömillä substituoimattomilla kysteineillä on seuraavat ominaisuudet:

- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dilauroyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiini, väritön öljy, R_F = 0,27;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-distearoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiini, värittömät kiteet, sul.p. 82-85°;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dioleoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiini, väritön öljy, R_f kloroformi:metanolissa = 9:1 (ohutkerros-piihappgeeli-Merck) = 0,35;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dibehenoyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiini, värittömät kiteet, sul.p. 87-90°;
- N-palmitoyyli-S-(2(R),3-di-(dihydrosterkuloyylioksisipropyyli)-(S)-kysteiini, väritön vaha, R_f = 0,38 (samat olosuhteet kuin edellä on mainittu N-palmitoyyli-2,3-dioleoyylioksi-johdannaiseen nähden

Nämä kysteiini-johdannaiset kondensoidaan esimerkissä 5 annettujen oheiden mukaisesti seuraavien peptidien kanssa:

H-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH

H-Glu-Gln-Asn-Ala-Lys-OH

H-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH

Näin saadaan keksinnön mukaisia vastaavia lipopeptidejä.

Esimerkki 7:

0,9 g N-palmitoyyli-S-2(R),3(R),4-trihydroksibutyyl-(S)-kysteiinibentshydryyliesteriä seoksessa, joka koostuu 3 ml:sta trifluorietikkahappoa 12 ml:sta metyleenikloridia, seisotetaan 2 tuntia huoneen lämpötilassa. Tämän jälkeen seos haihdutetaan kuiviin jäännös hierretään jäävedellä, imusuodatetaan ja kiinteä aine kuivataan. Tämän jälkeen se uutetaan bentsiinillä ja kiteytetään uud-

leen asetonista. Saadaan N-palmitoyyli-S-2(R),3(R),4-trihydroksibutyryli-(β)-kysteiinin värittömiä kiteitä, joiden sul.p. on 76-76,5 ja ominaiskierto $(\alpha)_D^{20} = -5^\circ$ ($c = 0,819$, dioksaani).

Lähtöaineena käytetty bentshydryyliesteri saadaan seuraavalla tavalla:

1 g N-palmitoyyli-S-2(R),3(R),4-trihydroksibutyryli-(β)-kysteiinibentshydryyliesteriä asyloidaan seoksessa, joka koostuu 6 ml:sta pyridiiniä 5 ml:ssa metyleenikloridia, 1,83 ml:lla palmitiinihappokloridia. 18 tunnin jälkeen huoneen lämpötilassa lisätään 1 ml metanolia ja haihdutetaan kuiviin. Jäännös suodatetaan 100 g:lla pihappogeeliä, Merck, kloroformi.liuottimena. Ohutkerroskromatografoimalla (CHCl_3 :etikkaesteri = 98:2) saaduista puhtaista fraktioista saadaan haihduttamisen jälkeen värittömiä kiteitä, joiden sul.p. on 60-62°.

Lähtöaine edellämäinittua reaktiota varten saadaan seuraavasti

2,53 g N-palmitoyyli-S-2(R),3(R),4-trihydroksibutyryli-(β)-kysteiiniä annetaan reagoida seoksessa, joka koostuu 12 ml:sta etanolia ja 32 ml:sta kloroformia, 1,37 g:n kanssa difenyyliidiatsometaanina 15 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Tämän jälkeen haihdutetaan kuiviin ja puhdistetaan muodostunut bentshydryyliesteri 150 g:lla pihappogeeliä kloroformi liuottimena. $R_f = 0,3$ (CHCl_3 :asetoni = 95:5) pihappogeeli Merck, ohutkerros.

N-palmitoyyli-S-2(R),3(R),4-trihydroksibutyryli-(β)-kysteiiniä saadaan seuraavalla tavalla:

20 g N-palmitoyyli-kysteiiniä, 27,6 g 1-toksyryli-2,4-etylideeni-D-erytriittia ja 17 g kaliumkarbonaattia sekoitetaan 240 ml:ssa etanolia typpiatmosfäärissä 15 tunnin ajan 80°:ssa. Tämän jälkeen suodatetaan suolat pois, ja suodos haihdutetaan kuiviin. Jäännös liuotetaan 200 ml:aan vesi:tetrahydrofuraania = 1:1 ja hapotetaan 2N suolahapolla pH-arvoon 3. Tämän jälkeen ravistellaan kolmesti eetterillä, säädetään pyridiinillä eetterifaasi pH arvoon 4,5, ravistellaan vedellä, kuivatään eetterifaasi ja haihdutetaan kuiviin. Tämä jäännös puhdistetaan 200 g:lla pihappogeeliä Merck, kloroformi:asetonilla = 8:2 (1 litra) ja sen jälkeen kloroformi:metanolilla = 6:4 (1,2 litraa) eluointiaineena.

Puhtaat fraktiot haihdutetaan, hierretään heksaanilla ja kiteytetään uudelleen etikkaesteri-petrolieetteristä.

Saadaan värittömiä N-palmitoyyli-S-((2,4-etylideeni)-erytriyyli)-(β)-kysteiini-kiteitä, joiden sul.p. on 62-65°.

Tämän yhdisteen hydrolyysi suoritetaan 3%:sella HBF_4 :llä 80° :ssa 4,5 tunnin kuluessa.

8,2 g etyleenijohdannaista käsitellään 100 ml:ssa dimetoksietaania ja 100 ml:ssa 3%:sta HBF_4 :ää. Jäähdytetään 0° :seen, jolloin hydrolyysituote saostuu. Imusuodattamisen ja kuivaamisen jälkeen suoritetaan uudelleenkitetyys etikkaesteristä. Sul.p. 160-165 $^\circ$ sintrautuminen 93° :sta alkaen. Rf = 0,285 (kloroformi:MeOH = 5:4) ohutkerros, piihappogeeli, Merck.

Esimerkki 8:

Analogisesti esimerkin 5 ohjeiden mukaan valmistetaan N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyyli)-(8)-kysteiinistä ja N-palmitoyyli-S-(2(R),3(R),4-tripalmitoyylioksiipropyyli)-(8)-kysteiinistä seuraavat lipopeptidit:

N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-Ile-Asp-Glu-OH, Rf (157) = 0,32;

N-palmitoyyli-S-(2(R),3(R),4-tripalmitoyylioksibutylyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH, Rf (157) = 0,55;

N-palmitoyyli-S-(2(R),3(R),4-tripalmitoyylioksibutylyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-Ile-Asp-Glu-OH, Rf (157) = 0,38.

Esimerkki 9:

Analogisesti esimerkin 5 ohjeiden mukaan valmistetaan N-palmitoyyli-2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyyli-(8)-kysteiinistä ja N-palmitoyyli-2(R,S),3-dipalmitoyylioksiipropyyli-kysteiinistä seuraavassa mainittuja lipopeptidejä, jolloin mainittujen kysteiini-johdannaisten tähteitä merkitään PC(R) vast. PC(R,S):

PC(R,S)-Ser-Ser-Asn-OH

PC(R)-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH

PC(R,S)-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH

PC(R)-Ser-OH

PC(R,S)-Ser-OH

PC(R,S)-Ser-Ser-Asn-Ala-OH

PC(R)-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OH

PC(R,S)-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OH

PC(R)-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OH

PC(R,S)-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OH

PC(R)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

PC(R,S)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

PC(R)-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-Ile-Asp-Glu-OH

PC(R,S)-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-Ile-Asp-Glu-OH

Lisäksi valmistetaan R,S-epimeeriseoksia kaikista edellisissä esimerkeissä mainituista lipopeptideistä.

Esimerkki 10:

0,24 g N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-The-Ala-D·Gly(OBu^t)₂:ta liuotetaan 10 ml:aan tri-fluorietikkahappoa, jonka vahvuus on 90 %. Liuoksen annetaan seistä 20°C:ssa 90 minuuttia, minkä jälkeen se haihdutetaan, trituoroidaan eetterillä ja kuivataan sitten natriumhydroksidilla. Saadaan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-D·Glu-OH:ta värittömänä ei-hydroskooppisena jauheena. Rf-arvo pihappogeelillä (kloroformi-metanoli-vesi-etikkahappo, 75:25:5:0,5) on 0,37.

Lähtöaine voidaan valmistaa seuraavalla tavalla:

0,287 g H-Phe-Ala-D·Glu(OBu^t)₂:ta lisätään seokseen, jossa on 0,6 g N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH:ta, 0,092 g N-hydroksibentsotriatsolia ja 0,124 g disykloheksyylikarbodi-imidiä 10 ml:ssa metyleenikloridia. Annetaan seistä 24 tuntia 20°C:ssa, minkä jälkeen seos suodatetaan ja suodos kromatografoidaan pihappogeelipylväässä (2 x 25 cm), joka on valmistettu kloroformissa. 25 cm:n alkufraktio jälkeen eluoidaan kloroformilla pääfraktio, joka sisältää puhdasta N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Phe-Ala-D·Glu(OBu^t)₂:ta. Rf-arvo pihappogeelillä (kloroformi-metanoli 9:1) on 0,72.

4,75 ml 1,12 M tetrabutyyliammoniumfluoridia (Bu₄NF) dimetyyli-sulfoksidissa lisätään liuokseen, jossa on 1,38 g N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse:ta 24 ml:ssa dimetyyli-formamidia. Annetaan seistä 40 minuuttia 20°C:ssa, minkä jälkeen liuos kaadetaan 150 ml:aan jääkylmää 0,01 N kloorivetyhappoa, seos suodatetaan ja jäännös pestään vedellä kunnes suodos ei enää sisällä kloridi-ioneja ja kuivataan sitten natriumhydroksidilla. N-palmitoyylioksi-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OH saadaan värittömän jauheen muodossa. Rf-arvo on pihappogeelillä (kloroformi-metanoli 9:1) 0,20.

0,563 g HCl·H-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse:ta ja 0,16 ml N-etyylimorfoliinia lisätään 1,06 g:aan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksi-propyyli)-L-kysteiniä, 0,213 g:an N-hydroksibentsotriatsolia ja 0,287 g:an disykloheksyylikarbodi-imidiä 6 ml:ssa dimetyyli-formamidia. Annetaan seistä 24 tuntia 20°C:ssa, minkä jälkeen liuos on muuttunut geelimäiseksi. Tämä geeli liuotetaan kuumentamalla ja

liuotin haihdutetaan pois pyörivässä haihduttimessa. Jäännös kromatografoidaan pihappogeelipylväässä, joka on valmistettu kloroformissa. Puhdas N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoksipropyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse eluoidaan kloroformi-metanolilla 99:1. Rf-arvo pihappogeelillä (etyyliasetatti-petrolieetteri 1:1) on 0,62.

5,39 g Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse:ta hydrataan metanolissa kahden tunnin ajan pH-arvossa 4,5 (säädetään jatkuvasti 1N kloorivetyhapolla) käyttämällä mukana 0,6 g palladiumhiili-katalysaattoria (10 %). Katalysaattori suodatetaan pois ja suodos haihdutetaan, minkä jälkeen saadaan valkoinen vaahto, joka on HCl·H-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse. Rf-arvo pihappogeelillä (kloroformi-metanoli 9:1) on 0,57.

7,0 g HCl·H-Ser(Bu^t)-OTmse:ta ja 2,96 ml N-etyyli-morfoliinia lisätään 6,94 g:aan A-Ser(Bu^t)-OH:ta, 3,6 g:aan N-hydroksi-bentsotriatsolia ja 5,33 g:aan disykloheksyylikarbodi-imidiä 100 ml:ssa dimetyyliformamidia. Annetaan seistä tunnin ajan 0°:ssa ja 24 tuntia 20°:ssa, minkä jälkeen seos suodatetaan, jäännös liuotetaan etyyliasetattiin ja liuos pestään 1 N sitruunahapolla, 1N natriumbikarbonaatilla ja vedellä. Kuivaamisen jälkeen natriumsulfaatilla liuotin haihdutetaan pois ja saadaan öljy, joka on Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-OTmse. Rf-arvo pihappogeelillä (etyyliasetatti-petrolieetteri 1:1) on 0,69.

1,84 g Z-Phe-Ala-D·Glu(OBu^t)₂:ta hydrataan 50 ml:ssa metanolia käyttämällä mukana 0,25 g palladium-hiiltä (10 %). Katalysaattorin suodattamisen ja suodoksen haihduttamisen jälkeen saadaan peptidi H-Phe-Ala-D·Glu(OBu^t)₂ valkoisena vaahtona. Rf-arvo pihappogeelillä (kloroformi-metanoli 8:2) on 0,58.

3,08 g H-Ala-D·Glu(OBu^t)₂:ta lisätään 2,79 g:aan A-Phe-OH:ta, 1,57 g:aan N-hydroksibentsotriatsolia ja 2,31 g:aan disykloheksyylikarbodi-imidiä 60 ml:ssa dimetyyliformamidia. Panoksen annetaan seistä 0°:ssa 20 tuntia, minkä jälkeen se suodatetaan, suodoksesta poistetaan liuotin, jäännös lisätään etyyliasetattiin ja liuos uutetaan 1 N sitruunahapolla, 1 N natriumbikarbonaatilla ja vedellä. Kuivaamisen jälkeen natriumsulfaatilla liuotin haihdutetaan ja jäännös saostetaan etyyliasetatti-petrolieetteristä. Saadaan väritön jauhe, joka on Z-Phe-Ala-D·Glu(OBu^t)₂. Rf-arvo pihappogeelillä (kloroformi-metanolissa 9:1) on 0,75.

4,33 g Z-Ala-D·Glu(OBu^t)₂:ta hydrataan 50 ml:ssa metanolia käyt-

tämällä mukana 0,5 g palladium-hiiltä (10 %). Katalysaattorin pois-suodattamisen ja suodoksen haihduttamisen jälkeen saadaan H-Ala-Glu(OBu^t)₂ valkoisena vaahtona. Rf-arvo piihappogeelillä systeemis-sä kloroformi-metanoli 9:1 on 0,30.

2,96 g HCl·H-D·Glu(OBu^t)₂:ta ja 1,27 ml N-etyyli-morfoliinia lisätään 2,23 g:aan Z-Ala-OH:ta, 1,68 g:aan N-hydroksibentsotriat-solia ja 2,48 g:aan disykloheksyylikarbodi-imidiä 50 ml:ssa dimetyy-liformamidia. Seoksen annetaan seistä 24 tuntia 0^o:ssa, minkä jäl-keen se suodatetaan ja liuotin poistetaan suodoksesta haihduttamalla. Kiteyttämällä jäännös uudestaan etyyliasetaatti-heksaanista saadaan Z-Ala-D·Glu(OBu^t)₂, joka sulaa 99-101^o:ssa ja jonka topinen kierto on $(\alpha)_D = +5^{\circ}$ (c = 1,4 metanolissa).

Esimerkki 11:

2,48 g N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-Ala-Lys(Boc)-NH₂:ta liuotetaan 50 ml:aan 90 %:sta trifluorietikkahappoa. Liuoksen annetaan seistä 60 minuuttia 20^o:ssa, minkä jälkeen siitä poistetaan liuotin haihduttamalla ja jäännös kuivataan natriumhydroksidilla. Tuote liuotetaan sitten 2 ml:aan dimetyyliformamidia ja saostetaan siitä 200 ml:lla 5 %:sta vesipitoista natriumbikarbonaattiliuosta, suodatetaan ja pestään vedellä. Saadaan värittömänä jauheena N-palmitoyyli-S-(2(R),3-di-palmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-NH₂:ta, jonka Rf-arvo on 0,40 piihappogeelillä käyttäen systeemiä 157.

1,64 g H-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-Ala-Lys(Boc)-NH₂:ta lisätään 2,0 g:aan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-L-kysteiiniä, 0,404 g:aan N-hydroksibentsotriatsolia ja 0,544 g:aan disykloheksyylikarbodi-imidiä 50 ml:ssa metyleenikloridia. Annetaan seistä 20^o:ssa 24 tuntia, minkä jälkeen liuotin haihdutetaan pois ja jäännös puhdistetaan kromatografoimalla piihappogeelipylväässä (valmistettu kloroformissa). Kloroformia käsittävän alkufraktion jäl-keen saadaan eluoimalla kloroformi-metanolilla 98:2 fraktio, joka sisältää puhdasta N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-Ala-Lys(Boc)-NH₂:ta. Rf-arvo piihap-pogeelillä kloroformi-metanolissa 9:1 on 0,38.

1,275 g Z-Ser(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Asn-Ala-Lys(Boc)-NH₂:ta hydrataan 50 ml:ssa metanolia käyttämällä mukana 0,25 g palladium-hiili-kata-lysaattoria (10 %). Katalysaattorin poissuodattamisen ja liuottimen

poishaihduttamisen jälkeen saadaan valkoinen vaahto, joka on $\text{H-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Asn-Ala-Lys}(\text{Boc})\text{-NH}_2$. Rf-arvo piihappogeelillä systeemissä kloroformi-metanoli 8:2 on 0,20.

2,02 g $\text{HCl}\cdot\text{H}\cdot\text{Lys}(\text{Boc})\text{-NH}_2$:ta ja 0,902 ml N-etyylimorfoliinia lisätään 4,465 g:aan $\text{Z-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Asn-Ala-OH}$:ta, 1,095 g:aan N-hydroksibentsotriatsolia ja 1,622 g:aan disykloheksyylikarbodiimidiä 50 ml:ssa dimetyyliformamidia. 24 tunnin kuluttua seos suodatetaan ja reaktiotuote saostetaan suodoksesta vedellä ja kiteytetään sitten uudestaan metanoli-eetteristä. Sulamispiste on $207\text{-}208^\circ$.

34 ml 0,5 N natriumhydroksidia lisätään 3,54 g:aan $\text{Z-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Asn-Ala-OMe}$:ta 34 ml:ssa metanolia. 3 minuutin kuluttua lisätään 17 ml 1 N kloorivetyhappoa, suurin osa metanolista poistetaan haihduttamalla, ja erottunut tuote suodatetaan pois. Kiteyttämällä metanoli-eetteristä saadaan puhdasta $\text{Z-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Asn-Ala-OH}$:ta, joka sulaa $180\text{-}181^\circ$:ssa.

61,8 ml 2,32 N kloorivetyhappoa etyyliasetaatissa ja 7,3 ml tert.butyyli-nitriittiä lisätään 25,95 g:aan $\text{Z-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-NH-NH}_2$:ta 200 ml:ssa dimetyyliformamidia -10° :ssa. 10 minuutin kuluttua lisätään liuos, jossa on 14,8 g $\text{HCl}\cdot\text{H}\cdot\text{Asn-Ala-OMe}$:ta ja 36,16 ml N-etyyli-morfoliinia 150 ml:ssa dimetyyliformamidia tiipoitain ja seos pidetään sitten tunnin ajan -10° :ssa ja 15 tuntia 0° :ssa. Liuoksesta poistetaan liuotin haihduttamalla, jäännös lisätään kloroformiin ja pestään natriumbikarbonaatilla, laimealla kloorivetyhapolla ja vedellä. $\text{Z-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Asn-Ala-OCH}_3$, joka saadaan liuottimen poishaihduttamisen jälkeen, saostetaan uudestaan kloroformi-petrolieetteristä. Rf-arvo piihappogeelillä systeemissä kloroformi-metanoli 9:1 on 0,35.

20,15 g Z-Asn-Ala-OMe :ta hydrataan 500 ml:ssa metanolia käyttämällä mukana 2,0 g palladium-hiili-katalysaattoria (10 %) pH-arvossa 4,5 (pidetään tässä arvossa lisäämällä jatkuvasti 1 N kloorivetyhappoa). Katalysaattorin suodattamisen ja suodoksen haihduttamisen jälkeen saadaan valkoinen jauhe, joka koostuu $\text{HCl}\cdot\text{Asn-Ala-O-CH}_3$:sta. Rf-arvo piihappogeelillä systeemissä kloroformi-metanoli-vesi 70:30:5 on 0,25.

Esimerkki 12:

Seuraavat lipopeptidit valmistetaan menetelmällä, joka on pääasiassa esimerkissä 5 selitetyn menetelmän mukainen:

N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,65,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Ala-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OCH₃, Rf (157) = 0,43,
 N-palmitoyyli-S-(2(S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,63,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Thr-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157c) = 0,37,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157c) = 0,35,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Thr-Thr-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157c) = 0,37,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-D-Glu-OH, Rf (157) = 0,54,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-distearoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-D-Glu-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Ala-Glu-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R,S),3-dipalmitoyylioksiopropyyli)-Cys-Glu-Glu-Asn-Ala-Lys-OH.

Esimerkki 13:

Seuraavat lipopeptidit valmistetaan menetelmällä, joka on pääasiassa esimerkissä 5 selitetyn menetelmän mukainen:

N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dialurooyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,45,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dimyristoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,47,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-distearoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,50,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dioleoyylioksiopropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,53,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-di-(9-metyleenistearoyylioksiopropyyli))-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH, Rf (157) = 0,53.

Esimerkki 14:

0,185 g disykloheksyylikarbodi-imidiä, 0,1 g N-hydroksi-bentso-triatsolia ja 0,105 ml N-etyyli-morfoliinia lisätään 0,749 g:aan N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-OH:ta ja 0,30 g:aan HCl·H-Phe-Tyr-NH₂:ta 15 ml:ssa metyleenikloridia. Annetaan seistä 24 tuntia 20^o:ssa, minkä jälkeen seos suodatetaan, suodos haihdutetaan ja jäännös trituroidaan kahdesti kulloinkin 10 ml:lla vettä. Jäännös liuotetaan sitten 15 ml:aan kloroformia ja kromatografoidaan piihappogeelipylväässä (2 x 25 cm), joka on valmistettu kloroformissa.

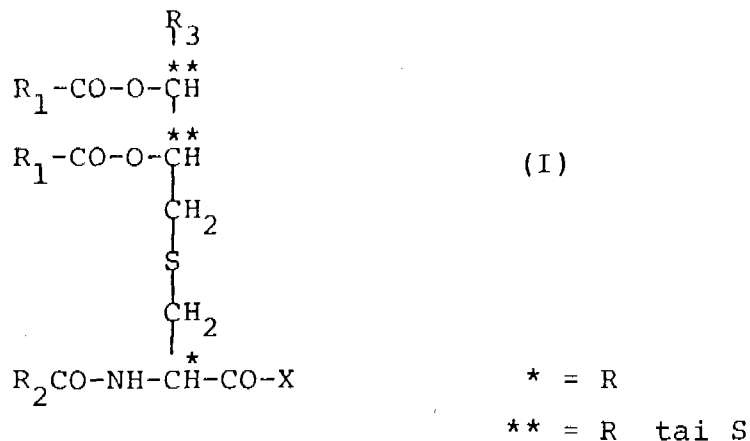
25 ml:n alkufraktion jälkeen (kloroformi eluoimisaineena) eluoidaan puhdas N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Phe-Tyr-NH₂ kloroformi-metanolilla. Rf-arvo piihappogeelillä (kloroformi-metanoli 9:1) on 0,48.

Edellä mainittu hydrokloridi voidaan valmistaa seuraavalla tavalla: 4,62 g Z-Phe-Tyr-NH₂ hydrataan 50 ml:ssa metanolia käyttämällä mukana 4 ml kloorivetyhappoa metanolissa (2,53 N) ja 0,5 g palladium-hiiltä (10 %). Katalysaattorin suodattamisen ja suodoksen haihduttamisen jälkeen saadaan HCl·H-Phe-Tyr-NH₂ valkoisena vaahtona. Rf-arvo piihappogeelillä (kloroformi-metanolilla) on 0,42.

2,52 ml N-etyylimorfoliinia lästään 7,93 g:aan A-Phe-O-Su ja 4,33 g:aan HCl·H-Tyr-NH₂ 50 ml:ssa dimetyyliformamidia. Annetaan seistä 20 tuntia 20^o:ssa, minkä jälkeen liuos väkevöidään noin puoleen tilavuuteen ja rekatiotuote suodatetaan lisäämällä 200 ml vettä. Jäännös suodatetaan ja kiteytetään uudestaan kuumasta asetonitriilistä. Näin saadun A-Phe-Tyr-NH₂:n sulamispiste on 221-223^o; (α)_D⁻²⁵ (c = 0,5 metanolissa).

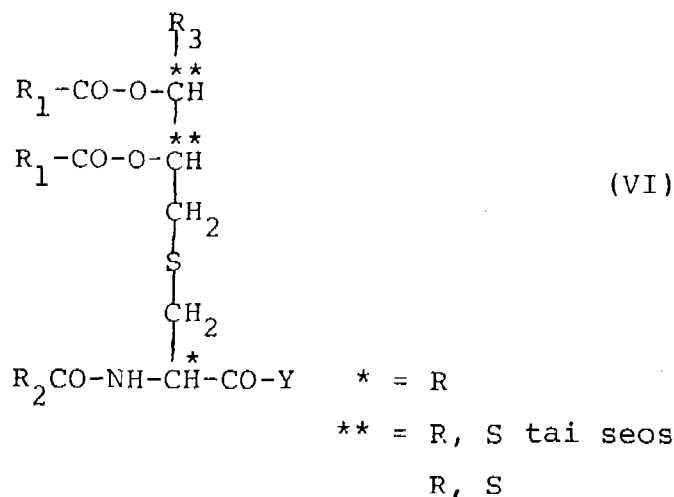
Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä kaavan I mukaisten immuunipotensioivien lipopeptidien valmistamiseksi



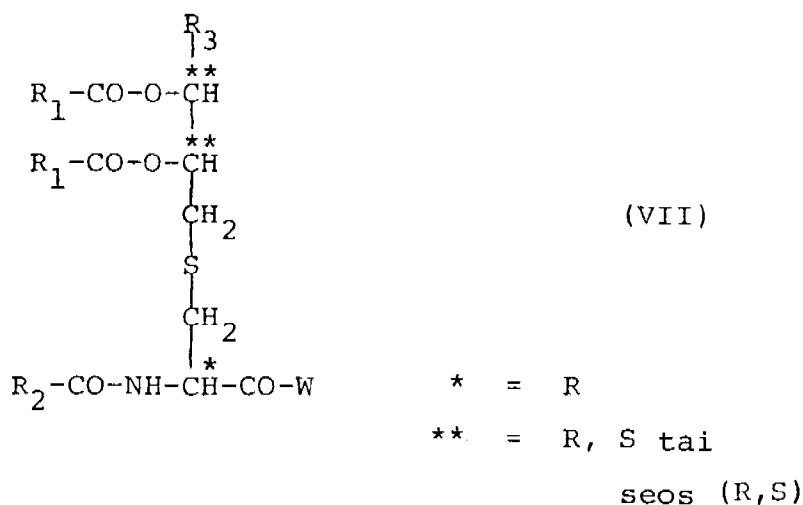
jossa R_1 ja R_2 tarkoittavat kumpikin tyydytettyä tai tyydyttämätöntä, alifaattista tai seka-alifaattis-sykloalifaattista, mahdollisesti myös happifunktioilla substituoitua hiilivetytähdettä, jossa on 11-21 C-atomia, R_3 tarkoittaa vetyä tai tähdettä $R_1-CO-O-CH_2-$, jossa R_1 tarkoittaa samaa kuin edellä ja X peptidisesti sitoutunutta luonnollista alifaattista aminohappoa, jossa on vapaa, esteröity tai amidoitu karboksyyli-ryhmä, tai aminohapposarja, jossa on 2-10 luonnollista, alifaattista aminohappoa, joiden terminaalinen karboksyyli-ryhmä on vapaassa, esteröidyssä tai amidoidussa muodossa, jolloin * vast. **:lla merkityt asymmetriakeskukset omaavat absoluuttisen R- vast. S- tai R-konfiguraation ja mahdollisesti **C-atomien epi-meeristen R- ja S-yhdisteiden seoksen, ja niiden suolojen ja kompleksien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) yhdisteestä



jossa R_1 , R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin kaavassa I ja Y esittää X:ää vastaavaa aminohappoa tai aminohapposarjaa kaavassa I, jossa kuitenkin vähintään yksi aminohappoja substituovista hydrofiilistä ryhmistä ja/tai terminaalinen karboksyyli-ryhmä on suojattu neutraaleissa tai lievästi happamissa olosuhteissa lohkaistavalla suojaryhmällä, tai tällaisen yhdisteen suolasta, lohkaistaan suojaryhmä(t), tai

b) kaavan VII mukainen yhdiste

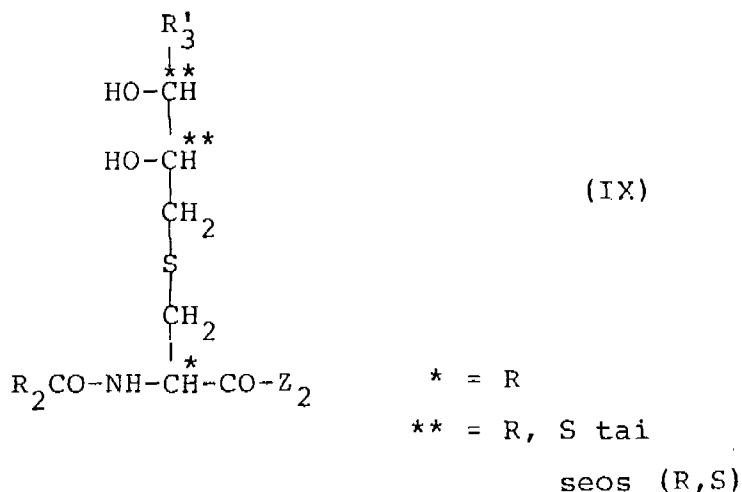


jossa R_1 , R_2 ja R_3 tarkoittavat samaa kuin kaavassa I ja $W = OH$, tai esittää kaavan I mukaisen X:n aminohappoa tai epätäydellistä aminohapposarjaa, saatetaan reagoimaan kaavan



mukaisen yhdisteen kanssa, jossa Z_1 tarkoittaa kaavan I mukaista ryhmää X vastaavaa ryhmää vast. X:n mukaisen mainitun aminohapon tai epätäydellisen aminohapposarjan komplementtärystä aminohapposarjaa vast. aminohappoa, joissa sarjoissa ei kuitenkaan ole vapaita aminoryhmiä, tai tämän yhdisteen suolan kanssa, tai

c) asyloidaan kaavan

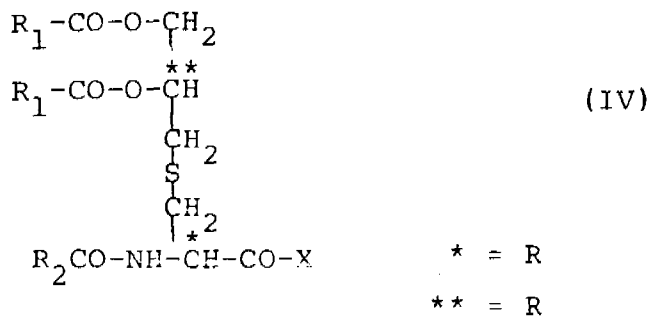


mukainen yhdiste, jossa R_2 tarkoittaa samaa kuin kaavassa I ja R'_3 esittää vetyä tai ryhmää $H-O-CH_2-$, ja Z_2 jotakin kaavan I X:ää vastaavaa ryhmää, jossa kuitenkin ei ole vapaita hydroksiryhmiä, tai tällaisen yhdisteen suola asyloidaan, ja haluttaessa muutetaan saaduissa yhdisteissä, joissa on vapaa terminaalinen karboksyyli-ryhmä, tämä amidiryhmäksi tai esteriryhmäksi ja/tai muutetaan yhdisteet suoloikseen tai komplekseikseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdisteitä, joissa asyyli-ähteet R_1CO ja R_2CO ovat peräisin tyydytetyistä tai tyydyttämättömistä rasvahapoista, joissa on 14-18 C-atomia.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdisteitä, joissa asyyli-ähteet ovat peräisin palmitiini-, steariini-, öljy-, lauriini-, myristiini-, behen-, dihydrosterkuli-, malval-, hydnocarpus- tai chaulmoogra-haposta.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan



mukaisia yhdisteitä, jossa kaavassa X esittää kaavan I aminohappoa

tai peptidisarjaa, jossa on 2-5 aminohappoa, tai sen suoloja tai komplekseja, jolloin aminohapossa, tai- peptidisarjan ollessa kysymyksenä, ainakin puolet aminohapoista sisältävät hydrofiilisen ryhmän.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdisteitä, joissa X esittää jotakin seuraavista peptidisarjoista

-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH,

-Ser-Ser-Asn-Ala-OH,

-Ser-Ser-Asn-OH,

-Ser-Ser-OH

tai tämän tyyppisiä sarjoja, joissa treoniini, glutamiini tai asparagiini korvaavat seriinin, tai

Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,

Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH,

Ser-Ser-Phe-Ala-OH,

Ser-Ser-Phe-OH

tai tämän tyyppisiä sarjoja, joissa treoniini, glutamiini tai asparagiini ovat vaihdettavissa seriiniin.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdisteitä, joissa on esteriryhmä peptidisarjan X pääteasemassa, jolloin esteriryhmä on peräisin alemmasta alifaattisesta alkoholista, jossa on 1-7 C-atomia, etyleeniglykolista tai glyserolista.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdisteitä, joissa on amidiryhmä peptidisarjan X pääteasemassa, jolloin amidiryhmä on substituoimaton tai on peräisin alemmasta alifaattisesta, 1-7 C-atomia sisältävästä amiinista, pyrrolidiinista, piperidiinistä tai piperatsiinista.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan lipopeptidi
N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asa-Ala-Lys-OH,
N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyyli)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH,
N-palmitoyyli-S-(2(R),3-di-(dihydrosterkuloyylioksiipropyyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Gly-OH,

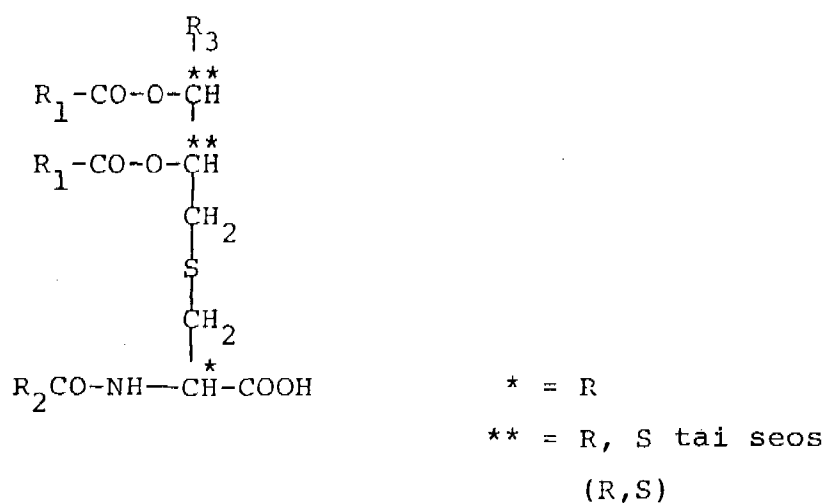
N-lauroyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,
 N-myristoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Glu-Gln-Asn-Ala-Lys-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dilauroyylioksiipropyli)-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dilauroyylioksi)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dioleoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,
 N-palmitoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH, tai
 N-stearoyyli-S-(2(R),3-dipalmitoyylioksiipropyli)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Gly-Ile-Asp-Glu-OH.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan happamien yhdisteiden ammoniumsuoloja, alkali- tai maa-alkalisuoloja tai emäksisten yhdisteiden farmaseuttisesti käyttökelpoisia, myrkyttömiä happoadditiosuoloja.

10. Menetelmä patenttivaatimuksessa 1 a) esitetyn kaavan VI mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetellään vaatimuksen 1 muunnoksen b) mukaan, jolloin vähintään yksi hydrofiilisistä ryhmistä aminohapossa tai peptidisarjassa W ja/tai Z₁ tai terminaalinen karboksyyli-ryhmä Z₁:ssä lähtöyhdisteiden (VI) määritelmää vastaavasti on suojatussa muodossa.

11. Menetelmä patenttivaatimuksessa 1 c) esimertun kaavan IX mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vastaava yhdiste, jossa Z₂ = OH, saatetaan reagoimaan peptidikemiasa tunnetulla menetelmällä kaavan NH₂-Z₂ mukaisen yhdisteen kanssa, jossa Z₂ tarkoittaa samaa kuin X kaavassa I.

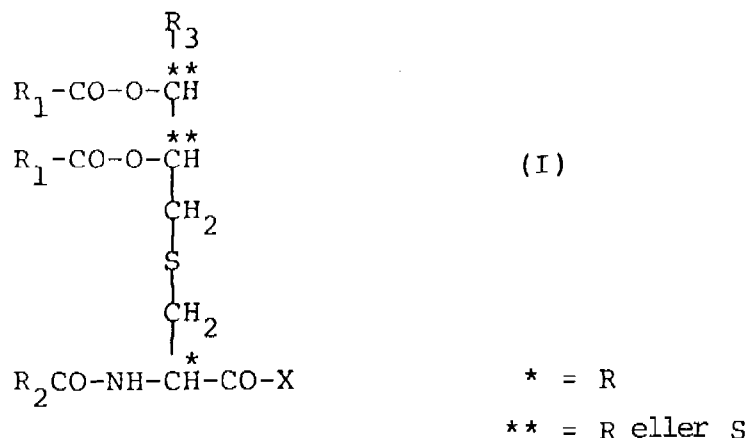
12. Menetelmä kaavan



mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa R_1 , R_2 ja R_2 tarkoittavat kukin tyydytettyä tai tyydyttämätöntä, alifaattista tai seka-alifaattis-sykloalifaattista, mahdollisesti myös happifunktioilla substituoitua hiilivetytähdettä, jossa on 11-21 C-atomia, jolloin $\ast$:llä vast. $\ast\ast$:llä merkityt asymmetriakeskukset omaavat absoluuttisen R-vast. R- tai S-konfiguraation, ja $C^{\ast\ast}$ -atomeissa stereoisomeeristen yhdisteiden seosten, ja vastaavien yhdisteiden vast. seosten, valmistamiseksi, joissa karboksyyli ryhmä on peptidisynteesille sopivan aktivoidun johdannaisen muodossa, t u n n e t t u siitä, että asyloidaan vastaava yhdiste, jossa kunkin tähteen R_1-CO- sijasta on hydroksiryhmä, asyyli tähteen $-R_1-CO-$ liittämiseksi siihen sopivalla asylointiaineella, ja mahdollisesti saatetaan kysteiiniosan karboksyyli ryhmä vapaaksi, tai muutetaan vapaa karboksyyli ryhmä aktivoiduksi johdannaiseksi.

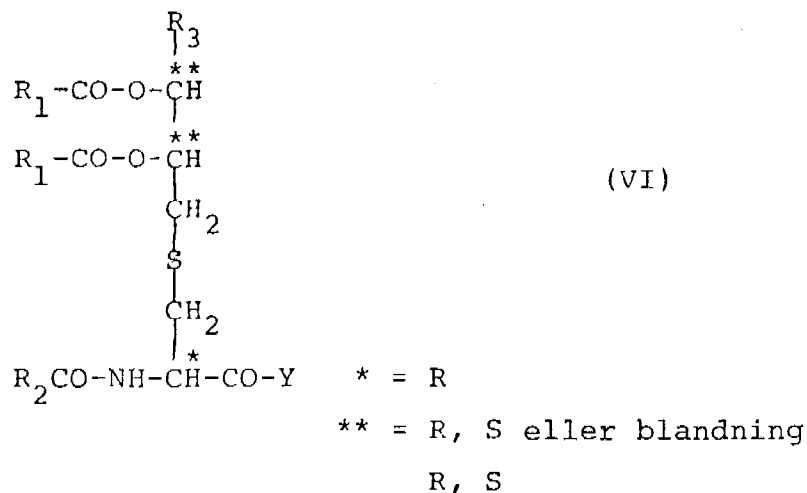
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av immunpotenserande lipopeptider med formeln



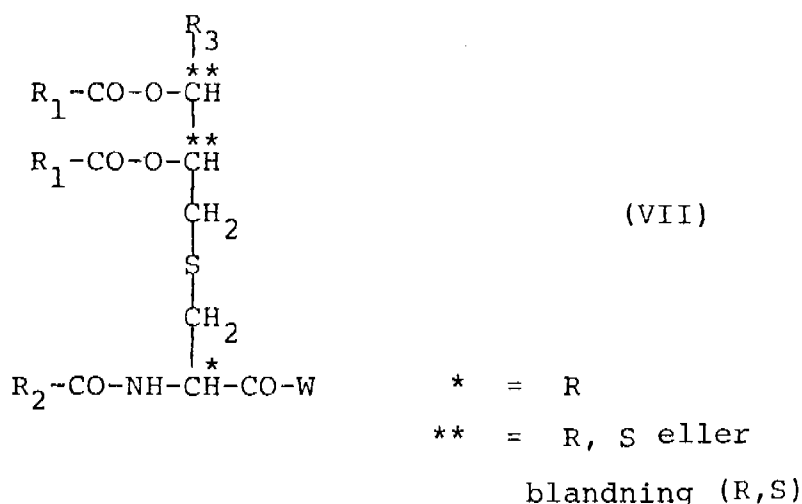
i vilken R_1 och R_2 betecknar vardera en mättad eller omättad, alifatisk eller blandad alifatisk-cykloalifatisk, eventuellt även med syrafunktioner substituerad kolväterest med 11-21 C-atomer, R_3 betecknar väte eller resten $R_1-CO-O-CH_2-$ i vilken R_1 betecknar detsamma som ovan och X en peptidiskt bunden naturlig alifatisk aminosyra med fri, förestrad eller amiderad karboxylgrupp, eller en aminosyrasekvens av 2-10 naturliga, alifatiska aminosyror, vars terminala karboxylgrupp är i fri, förestrad eller amiderad form, varvid de med * resp. ** betecknade asymmetricentren uppvisar absolut R- resp. S- eller R-konfiguration och eventuellt blandningar av de vid **C-atomerna epimera R- och S- föreningarna, samt salt och komplex därav, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) i en förening med formeln



i vilken R_1 , R_2 och R_3 betecknar detsamma som i formeln I och Y en X i formeln I motsvarande aminosyra eller aminosyrasekvens, varvid emellertid åtminstone en av de aminosyrorna substituerade hydrofila grupperna och/eller den terminala karboxylgruppen är skyddad med en under neutrala eller svagt sura betingelser avspaltbar skyddsgrupp, eller i ett salt av den en dylik förening, skyddsgruppen (-erna) avspaltas, eller

b) en förening med formeln

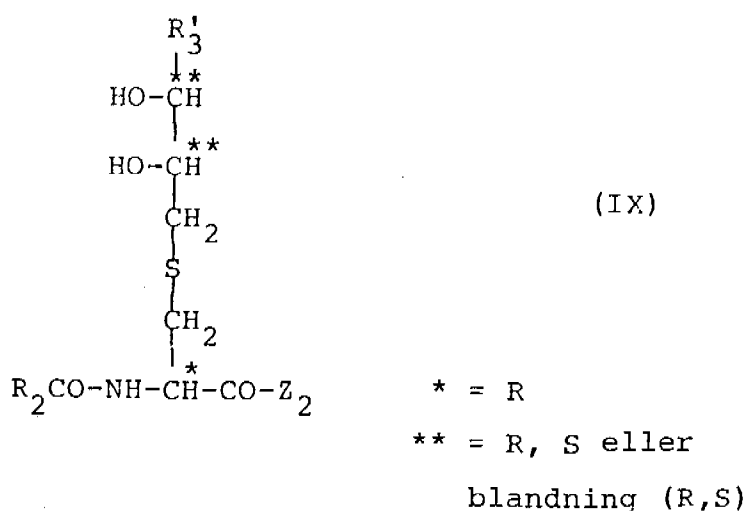


i vilken R_1 , R_2 och R_3 betecknar detsamma som i formeln I, och $W = OH$ eller en aminosyra eller en ofullständig sekvens av aminosyror enligt X i formeln I, omsättes med en förening med formeln



i vilken Z_1 betecknar en gruppen X i formeln I motsvarande grupp resp. en till nämnda aminosyra eller ofullständiga sekvens av aminosyror enligt X komplementterande aminosyrasekvens resp. aminosyra, i vilka sekvenser dock inte finns fria aminogrupeer, eller med ett salt därav, eller

c) en förening med formeln

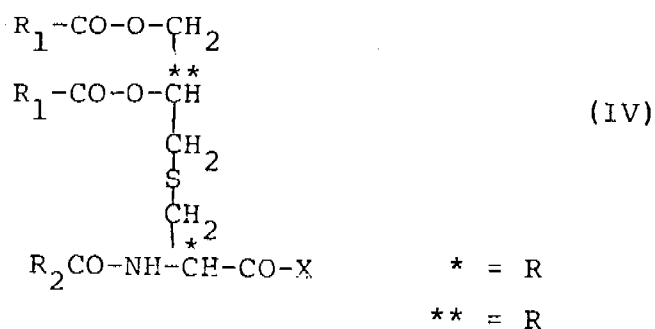


i vilken R_2 betecknar detsamma som i formeln I och R'_3 betecknar väte eller gruppen $H-O-CH_2-$ och Z_2 en X i formeln I motsvarande grupp, i vilken dock inte finns fria hydroxigrupper, eller ett salt därav acyleras, och, om så önskas, i erhållna föreningar med fria terminala karboxylgrupper, dessa överförs i en amidgrupp eller estergrupp, och/eller föreningarna överförs i sina salt eller komplex.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar i vilka acylresterna R_1CO och R_2CO härstammar från mättade eller omättade fettsyror med 14-18 C-atomer.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar i vilken acylresterna härstammar från palmitin-, stearin-, olje-, laurin-, myristin-, behen-, dihydrosterkylä, malval-, hydnocarpus- eller chaulmoograsyran.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar med formeln



i vilka X i formeln I betecknar en aminosyra eller en peptidsekvens med 2-5 aminosyror eller salt eller komplex därav, varvid aminosyran

eller, ifall av en peptidsekvens, minst hälften av aminosyrorna uppbär en hydrofil grupp.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar i vilka X betecknar följande peptidsekvenser:

-Ser-Ser-Asn-Ala-Lys-OH,

-Ser-Ser-Asn-Ala-OH,

-Ser-Ser-Asn-OH,

-Ser-Ser-OH

eller sevenser av denna typ i vilka treonin, glutamin eller asparagin ersätter serinet, eller

Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,

Ser-Ser-Phe-Ala-Gly-OH,

Ser-Ser-Phe-Ala-OH,

Ser-Ser-Phe-OH

eller sekvenser av denna typ i vilka treonin, glutamin eller asparagin kan bytas ut mot serin.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar med en ferminal estergrupp i peptidsekvensen X, i vilken estergruppen är härledd från en lägre alifatiskt alkohol med 1-7 kolatomer, etylenglykol eller glycerin.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer föreningar med en terminal amidgrupp i peptidsekvensen X, i vilken amidgruppen är osubstitueras eller är härledd från en lägre alifatisk amin med 1-7 kolatomer, pyrrolidin, piperidin eller piperazin.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer lipopeptiden
N-palmitoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Asa-Ala-Lys-OH,

N-palmitoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-OH,

N-palmitoyl-S-(2(R),3-di-(dihydrosterkuloyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,

N-lauroyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,

N-myristoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Glu-Gln-Asn-Ala-Lys-OH,

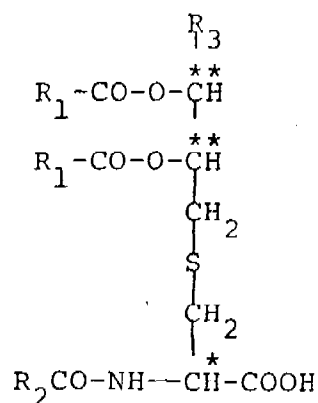
N-palmitoyl-S-(2(R),3-dilauroyloxipropyl)-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH,
 N-palmitoyl-S-(2(R),3-dilauroyloxi)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,
 N-palmitoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂,
 N-palmitoyl-S-(2(R),3-dioleoyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-OH,
 N-palmitoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Phe-Phe-Asn-Ala-Lys-OH, eller
 N-stearoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxipropyl)-Cys-Ser-Ser-Asn-Ala-Glu-Ile-Asp-Glu-OH.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ammoniumsalter, alkali- eller jordalkalisalter av sura föreningar eller farmaceutiskt användbara, icke-toxiska syra-additionssalter av basiska föreningar.

10. Förfarande för framställning av en förening med formeln VI i kravet 1 a), k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder varianten b) enligt kravet 1, varvid åtminstone en hydrofilgrupp i en aminosyra eller i peptidsekvensen W och/eller Z₁ eller den terminala karboxylgruppen i Z₁ motsvarande definitionen av utgångsföreningen VI, föreligger i skyddad form.

11. Förfarande för framställning av en förening med formeln IX i patentkravet 1 c), k ä n n e t e c k n a t därav, att en motsvarande förening, i vilken Z₂ = OH, enligt från peptidkemin bekanta förefaranden omsätts med en förening med formeln NH₂-Z₂, i vilken Z₂ betecknar detsamma som X i formel I.

12. Förfarande för framställning av en förening med formeln



* = R

** = R, S eller blandning
 (R,S)

i vilken R_1 , R_2 och R_3 vardera betecknar en mättad eller omättad, alifatisk eller blandad alifatisk-cykloalifatisk, eventuellt även med syrafunktioner substituerad kolväterest med 11-21 C-atomer, varvid de med * resp. ** betecknade asymmetriska centrena uppvisar absolut R- resp. R- eller S-konfiguration, samt blandningar av de vid C**-atomerna stereoisomera föreningarna, och motsvarande föreningar resp. blandningar, i vilka karboxylgruppen föreligger i form av ett för peptidsyntesen lämpligt aktiverat derivat, k ä n n e t e c k - n a t därav, att en motsvarande förening, i vilken en hydroxigrupp är närvarande i stället för de båda resterna R_1 -CO-, acyleras med ett acylresten R_1 -CO- införande acyleringsmedel, och eventuellt frigör karboxylgruppen i cysteindelen eller en fri karboxylgrupp överförs i ett aktiverat derivat.