



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 398 765 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 4378/80

(51) Int.Cl.⁶ : **C07K 1/00**
C07K 7/00, A61K 37/02

(22) Anmeldetag: 19. 6.1978

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1994

(45) Ausgabetag: 25. 1.1995

(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.: 4451/78

(30) Priorität:

20. 6.1977 LU 77584 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

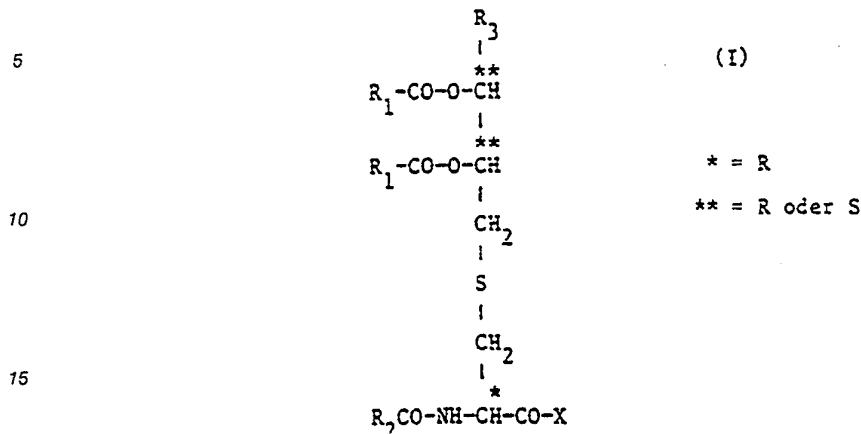
CIBA-GEIGY AG
CH-4002 BASEL (CH).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON NEUEN LIPOPEPTIDEN

(57)

AT 398 765 B

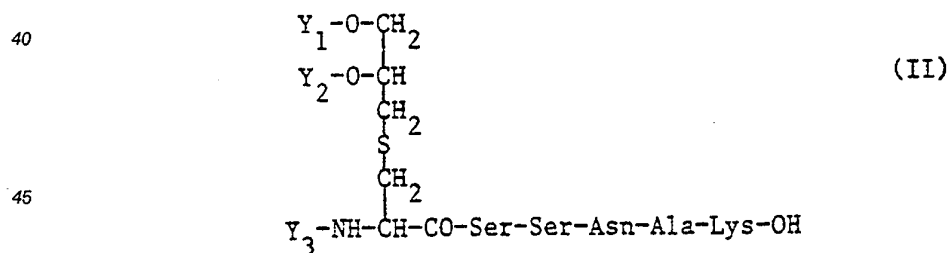
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Verbindungen der Formel



worin R_1 und R_2 je einen gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder gemischt aliphatisch-cycloaliphatischen, gegebenenfalls auch durch Epoxy substituierten, Kohlenwasserstoffrest mit 11-21 C-Atomen, R_3 Wasserstoff oder den Rest $\text{R}_1\text{-CO-O-CH}_2\text{-}$, wo R_1 die obige Bedeutung hat, und X eine peptidisch gebundene natürliche aliphatische Aminosäure, die keine freien Hydroxygruppen enthält, mit freier, veresterter oder amidierter Carboxylgruppe, oder eine Aminosäuresequenz von 2-10, vorzugsweise 2-5, natürlichen aliphatischen Aminosäuren, deren terminale Carboxylgruppe in freier, veresterter oder amidierter Form vorliegt und worin keine freien Hydroxygruppen vorhanden sind, bedeuten, oder $\text{X} = \text{OH}$ ist, wobei die mit $\ast$ bzw. $\ast\ast$ bezeichneten Asymmetriezentren die absolute R bzw. S- oder R-Konfiguration besitzen, und gegebenenfalls von Gemischen der an den $\ast\ast$ C-Atomen epimeren R- und S-Verbindungen, und ihren Salzen und Komplexen.

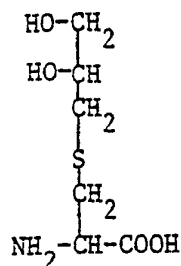
Die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen der obigen Formel, in denen X eine Aminosäure oder eine Sequenz von Aminosäuren darstellt, sind "Lipopeptide" eines neuen Typs mit interessanten pharmakologischen Wirkungen. Die Verbindungen der Formel (I), in denen X eine Hydroxygruppe bedeutet, stellen Ausgangsstoffe zur Darstellung der genannten Lipopeptide dar, sind aber selber auch pharmakologisch wirksam.

Lipopeptide sind als Abbau-Fragmente von Lipoproteinen bereits beschrieben worden. So haben z.B. Hantke und Braun (Eur. J. Biochem. 34, 284-296 (1973)) aus dem Murein-Lipoprotein der äusseren Zellwand von *Escherichia coli* durch enzymatische Degradation Lipopeptide bzw. Lipopeptidgemische in unreiner Form isolieren können, denen gemäss ihren Untersuchungen die folgende Struktur



oder entsprechende Formeln mit verkürzter Polypeptid-Kette zukommen dürfte, wobei Y_1 , Y_2 , Y_3 Acylreste verschiedener höherer gesättigter und ungesättigter Fettsäuren, wie etwa solcher mit 14-19 C-Atomen und anderer, darstellen. Dieselbe Struktur liegt auch dem Murein-Protein als solchem zugrunde (loc.cit.), wobei die absolute Konfiguration an den beiden asymmetrischen Kohlenstoffatomen der obigen Formel nicht untersucht wurde. Sowohl das Murein-Lipoprotein wie seine genannten Abbauprodukte zeigen in vitro eine mitogene Wirkung gegenüber Mäuse-Lymphocyten. (Vgl. auch Z.Immun.-Forschung, Vol. 153, S. 11-22 (1977)).

Wie ersichtlich, liegt den aus Mureinprotein erhaltenen Abbau-Lipopeptiden das "Glycerylcystein"



(III)

zugrunde. Als Produkte einer enzymatischen Spaltung von Naturprodukten waren diese Fragmente keine in ihrer Zusammensetzung wohl definierten Produkte und stellten offensichtlich komplizierte Gemische von Kondensationsprodukten aus dem genannten Peptidanteil und sehr verschiedenen Acylderivaten des Glycerylcysteins dar.

Die erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide unterscheiden sich nun von den genannten Abbauprodukten von Murein-Proteinen in mancherlei Hinsicht: sie stellen Lipopeptide von genau definierter einheitlicher chemischer Konstitution und Konfiguration dar, die synthetisch zugänglich sind und sich daher für eine therapeutische Anwendung eignen; die von ihnen gebildete Gruppe umfasst Verbindungen, in denen anstelle des Glycerinanteils im "Glycerylcystein" der Rest des Erythrits tritt und/oder solche, in denen eine andere Aminosäuresequenz als die oben für die bekannten Degradations-Lipopeptide-Gemische in Formel (II) angegebene, oder an deren Stelle auch nur eine einzige Aminosäure vorhanden ist, und schliesslich auch Derivate, wie Amide und Ester der terminalen Carboxylgruppe.

Die Acylreste $R_1\text{CO}$ und $R_2\text{CO}$ leiten sich von gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder cycloaliphatischen, gegebenenfalls im Kohlenwasserstoffrest durch Epoxy substituierten Carbonsäuren mit 12-22, vorzugsweise mit 14-18 C-Atomen ab. Als solche sind die gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren zu nennen, wie Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Oelsäure, Elaidinsäure, Linolsäure, α - und β -Eläostearinsäure, Stearolsäure, α -Linolensäure, ferner unter den cycloaliphatisch-aliphatischen z.B. die Dihydrosterkulsäure, Malvalsäure, Hydnocarpussäure und Chaulmoograsäure. Durch Epoxy substituierte Säuren dieses Typus, welche ebenfalls für die Acylreste $R_1\text{CO}$ und $R_2\text{CO}$ in Betracht kommen, sind z.B. die durch Epoxidierung der oben genannten olefinischen Fettsäuren und cycloaliphatisch-aliphatischen Säuren sich ergebenden, z.B. die δ , ϵ -Epoxy-stearinsäure.

In den Verbindungen der Formel (I) bzw. ihren Diastereomeren-Gemischen und ihren Salzen oder Komplexen können die Gruppen R_1 und R_2 miteinander identisch oder voneinander verschieden sein. Bevorzugt sind Verbindungen, in denen alle drei bzw. vier Acylreste gleich sind und unter diesen insbesondere solche, in denen diese den Palmitoyl-, Stearoyl-, oder Oleoylrest bedeuten.

Die Peptidsequenz X in den Verbindungen der Formel (I) bzw. in deren Salzen setzt sich aus maximal 10 natürlichen aliphatischen Aminosäuren zusammen, wobei vorzugsweise mindestens die Hälfte eine hydrophile Gruppe tragen, wie insbesondere Amino-, Carboxyl-, Carbamid-, Guanidino- oder Imidazolylgruppen. Von den ionischen Aminosäuren dieser Kategorie seien unter den sauren Gruppen tragenden insbesondere die Asparagin- und Glutaminsäure hervorgehoben, unter den basischen Gruppen tragenden das Lysin, das Ornithin, das Arginin und das Histidin. Aminosäuren mit neutralem Charakter sind besonders die Amide, wie das Asparagin und das Glutamin.

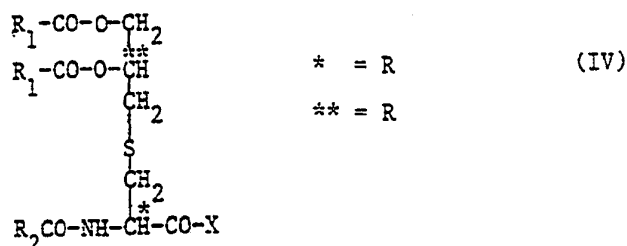
Stellt X in Formel (I) die genannte Aminosäure dar, so ist sie ebenfalls z.B. eine der genannten hydrophilen Gruppen tragenden.

Unter den Aminosäuren, die in die obige Sequenz eingehen können und die keine hydrophilen Gruppen tragen, sind vor allem die unsubstituierten zu erwähnen, wie z.B. Glycin, Alanin, Valin, Norvalin, Leucin, Isoleucin, sodann aber auch einige substituierte, die nicht-hydrophilen Charakter haben, wie Methionin.

Die Reihenfolge der genannten Aminosäuren in der Peptidkette X kann beliebig sein, jedoch sind solche Sequenzen bevorzugt, in denen sämtliche Aminosäuren mit hydrophilen Gruppen direkt aneinander gebunden sind, und unter diesen wiederum diejenigen, in welchen diese Sequenz der hydrophilen Aminosäuren an die Carboxylgruppe des Cysteins im Triacyl-Glycerylcystein bzw. Tetraacyl-Erythrylcystein-Teil gebunden ist.

Eine wichtige Gruppe (Gruppe I) von erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptiden sind solche, in denen die Peptidkette X aus maximal 5 Aminosäuren besteht.

Unter diesen sind insbesondere solche der Formel



worin R_1 , R_2 die gleichen Bedeutungen besitzen und X die für Formel (I) gegebene Bedeutung hat, aber im Falle der Aminosäuresequenz 2-5 Aminosäuren aufweist, sowie ihre Salze und Komplexe. Unter diesen Lipopeptiden seien jene hervorgehoben, deren Aminosäuresequenz in der Gruppe X derjenigen der obengenannten durch Abbau von Murein-Lipoprotein erhaltenen Lipopeptide, d.h. solcher der Formel (II), oder einer sich davon ableitenden verkürzten Kette entspricht.

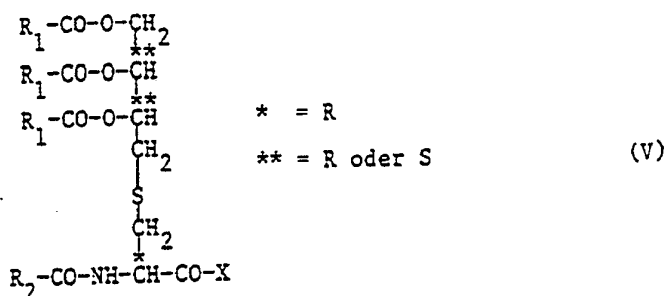
Eine zweite Gruppe von erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen (Gruppe II) sind Verbindungen entsprechend der obigen Formel IV, in denen jedoch die Konfiguration an C^* -Atom S statt R ist, und die Gemische der R- und S-Diastereomeren, wie sie z.B. bei der synthetischen Darstellung anfallen können. Spezifische Typen und Verbindungen entsprechen auch in dieser Gruppe den oben für die "R"-Gruppe (Formel IV) besonders hervorgehobenen.

Eine dritte Gruppe (Gruppe III) der neuen Lipopeptide umfasst die Verbindungen gemäss Formel (IV), in denen jedoch X eine Aminosäuresequenz mit 6-10 Aminosäuren darstellt, wobei die ersten 5 vorzugsweise die oben bereits hervorgehobenen Sequenzen darstellen. Die Aminosäuren 6-10 können beliebige der oben erwähnten natürlichen sein, wie insbesondere Asparagin, Alanin, Glutaminsäure, Lysin, Phenylalanin, und etwa in folgenden Sequenzen vorkommen:

Ile-Asp-Glu-OH, Asp-Glu-OH.

Es können erfindungsgemäss auch entsprechende Verbindungen dieses Typs mit der S-Konfiguration am C^* -Atom hergestellt werden, sowie Diastereomerengemische von S- und R-Verbindungen.

Eine vierte Gruppe (Gruppe IV) der erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide umfasst Verbindungen der Formel (I) worin R_3 den Rest $R_1-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ darstellt, in welchen die Konfiguration an den C^* -Atomen eine beliebige ist, insbesondere auch Diastereomerengemische. Untergruppen sind Verbindungen der Formel



insbesondere solche mit R-Konfiguration an den C^* -Atomen, worin X die für Formel (IV) angegebene Bedeutung besitzt. Die Acylreste $R_1-\text{CO}-$ und $R_2-\text{CO}-$ sind vorzugsweise dieselben und vor allem wiederum Palmitoyl, Stearoyl oder Oleoyl; sie können aber wie oben für die anderen Gruppen besprochen, in allen Kombinationen und/oder Variationen vorhanden sein.

Bevorzugte Typen und Verbindungen dieser Klasse sind wiederum solche, in denen X die oben spezifizierten Bedeutungen haben.

Auch für diese Gruppe ist vorzugsweise X eine Aminosäure oder eine Sequenz von 5 Aminosäuren, insbesondere eine der oben für die anderen drei Gruppen von Lipopeptiden als bevorzugt bezeichneten. X kann aber auch eine der für die dritte Gruppe der erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide beschriebenen Aminosäuresequenzen mit 6-10 Aminosäuren, insbesondere die für jene Gruppe spezifisch erwähnten, darstellen. Eine fünfte Gruppe von Lipopeptiden wird von jenen Verbindungen gemäss Formel (I) gebildet, in denen X eine Peptidkette bedeutet, in welchen die Sequenzen der ersten 5 Aminosäuren von denjenigen, die in den bekannten Murein-Lipoprotein-Abbau-Lipopeptiden vorhandenen verschieden ist, und insbesondere solche, worin R_3 Wasserstoff bedeutet, also der obigen Formel IV entsprechen, wobei $R_1-\text{CO}$

und R₂-CO die vorzugsweise im vorangegangenen oder im folgenden besonders hervorgehobenen Acylreste in den angeführten Kombinationen bedeuten, sowie ihre Salze und Komplexe. Es sei z.B. folgendes Lipopeptid [AcGCT = Acyl-Glycerylcystein-Teil gemäss Formel (IV)]

AcGCT-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OH und seine Amide und Ester, insbesondere die im nachfolgend besonders

5 hervorgehobenen.

Eine weitere Untergruppe besteht aus Verbindungen gemäss Formel (IV), in denen X aber die besagte "unnatürliche" Sequenz von Aminosäuren im Vergleich zu den Murein-Lipoprotein-Degradationsprodukten darstellt, und aber 6-10 Aminosäuren vorhanden sind. Die ersten fünf Aminosäuren haben z.B. die oben angegebene Sequenz oder eine beliebige andere; es sei z.B. folgendes Lipopeptid genannt, wo AcGCT die

10 obige Bedeutung besitzt:

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

und seine Amide und Ester, insbesondere die im nachfolgenden hervorgehobenen. Vorzugsweise werden Verbindungen dieses Typs hergestellt, in denen die Konfiguration am C^m-Atom des AcGCT R ist, oder Diastereomerenmischungen von R- und S-Epimeren. In den oben besprochenen neuen Lipopeptiden kann

15 die terminale Carboxylgruppe in amidierter Form vorliegen. Ausser dem unsubstituierten Amid kommen auch solche in Betracht, die sich von einem primären oder sekundären Amin ableiten.

Insbesondere kommen Amide von niederen aliphatischen Aminen mit 1-7 C-Atomen in Betracht, wie Methylamin, Ethylamin, Propylamin, Butylamin, Dimethylamin, Diethylamin oder Propyl- und Isopropylamin, ferner von aromatischen Aminen, insbesondere monocyclischen, wie Anilin oder Toluidin, von araliphatischen Aminen, wie Benzylamin, oder von heterocyclischen Aminen, wie z.B. die Aminopyridine. Bei den

20 sekundären aliphatischen Aminen kann es sich auch um ringgeschlossene Stickstoffbasen handeln, wie z.B. Pyrrolidin, Piperidin oder Piperazin.

Spezifische Amide sind z.B. die unsubstituierten oder die Methyl-, Ethyl-, Dimethyl- oder Diethylamide sämtlicher oben angeführter spezifischer Lipopeptide oder solche Amide der in der illustrativen Beispielen

25 beschriebene Verbindungen.

In den veresterten terminalen Carboxylgruppen der neuen Lipopeptide leitet sich die Alkoholkomponente vorzugsweise von niederen aliphatischen Alkoholen mit 1-7 C-Atomen, wie Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, Isopropyl- oder den Butylalkoholen ab. Die veresternden Alkohole können aber auch mehrwertig sein, wie Ethylenglykol oder Propylenglykol oder Glycerin. Auch araliphatische Alkohole, insbesondere monocyclische niederaliphatische mit 1-7 C-Atomen im aliphatischen Teil, wie z.B. Benzylalkohol, oder heterocyclische Alkohole, wie Tetrahydrofuranol oder Tetrahydropyranol können für die Veresterung verwendet werden. Als spezifische Ester dieses Typs der Lipopeptide seien z.B. die Methyl-, Ethyl- und die

30 Ethylenglykol- oder Propylenglykol-Ester sämtlicher oben angeführter spezifischer Lipopeptide oder derjenigen, die in den illustrativen Beispielen beschrieben sind, erwähnt.

Die vorliegenden neuen Lipopeptide sind je nach der Art ihrer Substituenten neutrale, saure oder basische Verbindungen. Falls überschüssige saure Gruppen vorhanden sind, bilden sie Salze mit Basen, wie Ammoniumsalze oder Salze mit Alkali- oder Erdalkalimetallen, z.B. Natrium, Kalium, Calcium oder Magnesium; sind jedoch überschüssige basische Gruppen vorhanden, bilden sie Säureadditionssalze. Säureadditionssalze sind besonders pharmazeutisch verwendbare, nichttoxische Säureadditionssalze, wie

40 solche mit anorganischen Säuren, z.B. Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Salpeter-, Schwefel- oder Phosphorsäuren, oder mit organischen Säuren, wie Carbonsäuren, z.B. Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Hydroxymaleinsäure, Methylmaleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Benzoesäure, Zimtsäure, Mandelsäure, Salicylsäure, 4-Amino-salicylsäure, 2-Phenoxybenzoesäure, 2-Acetoxybenzoesäure, Embonsäure, Nicotinsäure oder Isonicotinsäure, oder Sulfonsäuren, z.B. Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, 2-Hydroxy-ethansulfonsäure, Ethan-1,2-disulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure oder Naphthalin-2-sulfonsäure, ferner auch andere Säureadditionssalze, die z.B. als Zwischenprodukte, z.B. zur Reinigung der freien Verbindungen oder in der Herstellung von anderen Salzen, sowie zur Charakterisierung verwendet werden können, wie z.B. solche mit Pikrin-, Pikrolon-, Flavian-, Phosphorwolfram-, Phosphormolybdän-, Chlorplatin-, Reinecke- oder Perchlorsäure.

50 Komplexe sind die mit Metallsalzen, z.B. mit Schwermetallsalzen, wie Kupfer, Zink, Eisen oder Kobaltsalzen entstehenden Verbindungen. Zur Bildung solcher Komplexe werden vorzugsweise die Phosphate, Pyrophosphate und Polyphosphate dieser Metallsalze verwendet, gegebenenfalls in Kombination mit sauren organischen Stoffen, z.B. saure Gruppen enthaltenden Polysacchariden, wie Carboxymethylcellulose, Gerbsäure, Polyglutaminsäure oder teilweise hydrolysierte Gelatine, ferner Alkalimetallpolyphosphate wie z.B. "Calgon N", "Calgon 322", "Calgon 188" oder "Plyron B 12".

55 Die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen gemäss der obigen Formel (I), ihre Salze und Komplexe und Gemische weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften, insbesondere eine ausgeprägte immunpotenzierende Wirkung auf. So stimulieren die Verbindungen im Dosisbereich von 0,5-320 µg/ml

die in vitro an Hand der Thymidininkorporation bestimmte Proliferation von B-Lymphocyten 20- bis 50-fach im Vergleich zu nicht stimulierten Kontroll-Lymphocyten. Das Ausmass der Stimulation entspricht demjenigen, das mit den wirksamsten bekannten B-Zell-Mitogenen (Dextransulfat, E. coli Lipopolysaccharin, PPD (purified protein derivative)) erreicht wird, wobei bei den neuen Verbindungen auch hohe Konzentrationen

5 nicht lymphocytotoxisch wirken.

Die neuen Verbindungen der Formel (I), ihre Salze und Komplexe und Gemische sind ausserdem in der Lage, in Konzentrationen von 0,3-60 µg/ml in Milzzellkulturen von normalen Mäusen die Bildung antikörperproduzierender Zellen zu induzieren (Vermehrung der 19S-plaquebildenden Zellen um einen Faktor 20 bis 50 über den Kontrollwert (in Abwesenheit der stimulierenden Substanzen)): So werden in Anwesenheit der

10 genannten Verbindungen z.B. spezifische Antikörper gegen Schafererythrocyten gebildet, ohne dass den Kulturen Schafererythrocyten zur Immunisierung zugesetzt werden.

Andererseits vermögen die genannten Substanzen im selben Konzentrationsbereich auch die immunologische Reaktivität von T-zellverarmten Milzzellkulturen (von kongenital athymischen nu/nu [nu = nude = nackt] Mäusen) gegenüber einem normalerweise thymusabhängigen Antigen (Schafererythrocyten) zu steigern (Faktor 10 bis 40 gegenüber unbehandelten Kontrollkulturen). Durch die genannten Verbindungen werden aber in vitro direkt oder indirekt nicht nur Proliferations- und Syntheseleistungen von B-Lymphocyten (d.h. von potentiell antikörperbildenden Zellen) induziert, sondern auch Effekte auf T-Lymphocyten (zu denen regulatorisch aktive Helfer- und Suppressorzellen sowie cytotoxische Effektorzellen gehören), vermittelt. So vermögen z.B. die erwähnten Verbindungen in einem Konzentrationsbereich von 10-100 µg/ml die

20 Reaktivität von cortisonresistenten Thymuszellen gegenüber allogenen bestrahlten Stimulatorlymphocyten erheblich (bis zu 10-fach) zu potenzieren.

Die oben erwähnten Wirkungen kommen wahrscheinlich indirekt dadurch zustande, dass die Lipopeptide Makrophagen aktivieren, die ihrerseits die Reaktivität von T- und B-Lymphocyten fördern. Tatsächlich kann man zeigen, dass die genannten Verbindungen bereits in äusserst geringen Konzentrationen (0,01-10

25 µg/ml) grosse Mengen "colony stimulating activity" (CSA) aus Maus-Makrophagen freisetzen (Induktion von bis zu 150-200 Kolonien innerhalb von 7 Tagen aus 10⁵ Mäuse-Knochenmarkzellen, nach Zugabe von 20 % Ueberstand aus während 24 Stunden mit Substanz inkubierten Makrophagenkulturen, im Vergleich zu 0-5 Kolonien bei Zugabe von Ueberständen unbehandelter Makrophagenkulturen). CSA ist ein biologischer Mediator, der für die Differenzierung von Knochenmark-Stammzellen zu Makrophagen und polymorphkernigen Leucocyten notwendig ist. Damit bewirken die genannten Verbindungen einen erhöhten Nachschub von Zellen, die für die unspezifische Resistenz und für die Induktion, Amplifikation und Expression spezifischer (lymphocytenvermittelter) Immunreaktionen von zentraler Bedeutung sind.

Die immunpotenzierende Wirkung der neuen Verbindungen der Formel (I), ihrer Salze oder Komplexe oder Gemische, kann auch in vivo nachgewiesen werden: So führt die Injektion eines erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptids innerhalb von 3-9 Stunden zu einem hohen Anstieg der CSA-Konzentration im Serum (bis zu 120 Kolonien pro 10⁵ Mäuseknochenmarkzellen nach Zugabe von Chloroform extrahiertem Serum (5 % Endkonzentration) im Vergleich zu 0-5 Kolonien bei unbehandelten Tieren). Dementsprechend wird durch Verabreichung derselben Verbindungen in vivo die Antikörperbildungsfähigkeit von Mäusen erheblich potenziert:

40 NMRI-Mäuse (albinotischer Auszuchtstamm, Arzneimittel-Forsch. 23, 1366-1377 [1973]) werden durch intraperitoneale Injektion von 10 µg präzipitatfreiem bovinem Serumalbumin (BSA) am Tag 0 immunisiert.

9,15 und 29 Tage später werden Serumproben entnommen und auf ihren Gehalt an anti-BSA-Antikörpern mit einer passiven Haemagglutinationstechnik untersucht. In der verwendeten Dosis ist lösliches BSA für die Empfängertiere subimmunogen, d.h. es vermag keine oder nur eine ganz geringfügige Produktion von

45 Antikörpern auszulösen. Zusätzliche Behandlung der Mäuse mit gewissen immunpotenzierenden Stoffen vor oder nach der Antigengabe führt zu einem Anstieg der Antikörpertiter im Serum. Der Effekt der Behandlung wird durch den erreichten Scorewert, d.h. durch die Summe der log₂ Titerdifferenzen an den drei Blutungstagen ausgedrückt.

In diesem Test sind die Verbindungen der Formel (I), ihre Salze oder Komplexe oder Gemische in der Lage, bei intraperitonealer oder subkutaner Applikation von 0,03-3 mg/kg Tier an fünf aufeinanderfolgenden Tagen vor oder nach Immunisierung mit BSA die Antikörperproduktion gegen BSA signifikant zu steigern.

Auch Manifestationen der zellvermittelten Immunität können durch die genannten Verbindungen in vivo potenziert werden:

55 Während Sensibilisierung von Meerschweinchen mit BSA in inkomplettem Freund'schen Adjuvans nur zu humoraler Antikörperbildung führt, induziert die Beimischung der erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide in einem Dosisbereich von 1-15 µg zur wässrigen Phase der Antigen-Oelemulsion Spättyp-Ueberempfindlichkeit gegenüber BSA, 3 Wochen nach Immunisierung führt die intrakutane Injektion von BSA bei diesen Tieren zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Erythem und Verdickung der Haut, die innerhalb

von 24 bis 48 Stunden ihr Maximum erreicht. Diese Spättyp-Reaktionen entsprechen quantitativ und qualitativ denjenigen, die üblicherweise durch Immunisierung mit BSA im kompletten Freund'schen Adjuvans (d.h. mit Zusatz von Mykobakterien) erhalten werden. Die ED₅₀-Werte (benötigte µg/Tier zur Induktion einer Differenz des Reaktionsvolumens (Erythemfläche x Hautdickenzunahme) bei behandelten und unbehandelten Tieren von 200 µl, 24 Stunden nach Auslösung) betragen 2-3 µg. Die erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide sind zudem wenig toxisch: Auch 5-malige intraperitoneale Applikation in einer Dosis von 10 mg/kg/Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde von Mäusen anscheinend symptomlos vertragen. Da die für die Immunstimulation benötigten Dosen sehr gering sind, ist die therapeutische Breite der neuen Verbindung sehr gross.

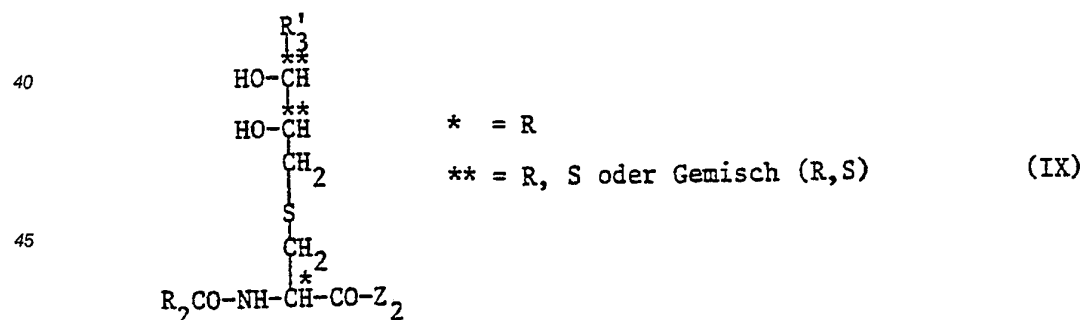
Die neuen erfindungsgemäss erhältlichen Lipopeptide können somit die zelluläre und besonders die humorale Immunität erheblich steigern, u.zw. sowohl in Mischung mit dem Antigen selber (Adjuvanseffekt im engeren Sinne) als auch bei zeitlich und örtlich von der Antigeninjektion getrennter Zufuhr (systemische Immunpotenzierung).

Diese Lipopeptide können somit als Adjuvantien in Mischung mit Impfstoffen dazu benützt werden, den Impferfolg zu verbessern und den durch humorale Antikörper und/oder zelluläre Immunität vermittelten Infektionsschutz gegenüber bakteriellen, viralen oder parasitären Erregern zu verbessern. Schliesslich eignen sich die beschriebenen Verbindungen in Mischung mit verschiedenen Antigenen als Adjuvantien bei der experimentellen und industriellen Herstellung von Antisera für Therapie und Diagnostik und bei der Induktion von immunologisch aktivierten Lymphocytenpopulationen für Zelltransferverfahren.

Darüberhinaus können die neuen Lipopeptide auch ohne gleichzeitige Antigenezufuhr dazu benützt werden, bereits unterschwellig ablaufende Immunreaktionen bei Mensch und Tier zu fördern. Die Verbindungen eignen sich demnach besonders für die Stimulation der körperlichen Abwehr, z.B. bei chronischen und akuten Infektionen oder bei selektiven (antigenspezifischen) immunologischen Defekten, sowie bei angeborenen, aber auch bei erworbenen allgemeinen (d.h. nicht antigenspezifischen) immunologischen Defektzuständen, wie sie im Alter, im Verlauf schwerer Primärerkrankungen und vor allem nach Therapie mit ionisierenden Strahlen oder mit immunsuppressiv wirkenden Hormonen auftreten. Die genannten Stoffe können somit vorzugsweise auch in Kombination mit Antibiotika, Chemotherapeutika oder anderen Heilverfahren verabreicht werden, um immunologischen Schädigungen entgegenzuwirken. Schliesslich sind die beschriebenen Stoffe auch zur allgemeinen Prophylaxe von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier geeignet.

Die neuen Lipopeptide können nach an sich bekannten Methoden oder deren hier beschriebenen neuen Verfahren hergestellt werden.

Nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung werden die Verbindungen der Formel (I), ihre diastereomeren Gemische und ihre Salze und Komplexe dadurch hergestellt, dass man eine Verbindung der Formel



worin R₂ die für Formel (I) angegebene Bedeutung besitzt und R'₃ Wasserstoff oder die Gruppe H-O-CH₂- darstellt, und Z₂ Hydroxy, eine peptidisch gebundene natürliche aliphatische Aminosäure, die keine freien Hydroxygruppen enthält, mit freier, veresterter oder amidierter Carboxylgruppe, oder eine Aminosäuresequenz von 2-10, vorzugsweise 2-5, natürlichen aliphatischen Aminosäuren, deren terminale Carboxylgruppe in freier, veresterter oder amidierter Form vorliegt und worin keine freien Hydroxygruppen vorhanden sind, bedeutet, oder ein Derivat einer solchen Verbindung, worin der Rest -CO-Z₂ eine geschützte Carboxylgruppe bedeutet, oder ein Salz einer Verbindung der Formel IX acyliert, und, wenn man eine Verbindung erhalten hat, worin der Rest -CO-Z₂ eine geschützte Carboxylgruppe bedeutet, die Schutzgruppe abspaltet, und, wenn erwünscht, in einer erhaltenen Verbindung der Formel I, worin der Rest X den Rest einer

Aminosäure oder Peptidsequenz mit freier terminaler Carboxylgruppe bedeutet, dieselbe in eine Amidgruppe oder Estergruppe überführt, und/oder eine erhaltene Verbindung der Formel I in ihre Salze oder Komplexe überführt.

Schutzgruppen für Aminogruppen sind z.B. Acyl- oder Aralkylgruppen wie Formyl-, Trifluoracetyl-, Phthaloyl-, Benzolsulfonyl-, p-Toluolsulfonyl-, o-Nitrophenylsulfonyl-, 2,4-Dinitrophenylsulfonylgruppen (diese Sulfonylgruppen können auch durch Einwirkung nucleophiler Reagenzien, z.B. Sulfite, Thiosulfate, abgespalten werden) gegebenenfalls substituierte, wie z.B. durch Niederalkoxygruppen, besonders o- oder p-Methoxygruppen substituierte Benzyl-, oder Diphenyl- oder Triphenylmethylgruppen oder von der Kohlensäure sich ableitende Gruppen, wie gegebenenfalls in den aromatischen Ringen, z.B. durch Halogenatome wie Chlor oder Brom, Nitrogruppen, Niederalkyl- oder Niederalkoxygruppen oder farbgebende Gruppen, z.B. Azogruppen substituierte Arylmethyloxycarbonylgruppen, in denen die Methylengruppe durch einen weiteren Arylrest und/oder einen oder gegebenenfalls zwei niedere Alkylreste substituiert sein kann, wie Benzyl-, Benzhydryl- oder 2-Phenyl-isopropoxyloxycarbonylgruppen, z.B. Carbobenzoxy, p-Brom- oder p-Chlorcarbobenzoxy, p-Nitrocarbobenzoxy oder p-Methoxycarbobenzoxy, p-Phenylazo-benzyloxycarbonyl und p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl, 2-Tolyl-isopropoxyloxycarbonyl und insbesondere 2-(p-Biphenyl)-isopropoxyloxycarbonyl, sowie aliphatische Oxycarbonylgruppen, wie Adamantylloxycarbonyl, Cyclopentylloxycarbonyl, Trichlorethylloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl oder vor allem tert.-Butyloxycarbonyl.

Die Aminogruppen können auch durch Bildung von Enaminen, erhalten durch Reaktion der Aminogruppe mit 1,3-Diketonen, z.B. Benzoylacetone, Acetylacetone oder Dimedon, geschützt werden.

Carboxylgruppen sind beispielsweise durch Amid- oder Hydrazidbildung oder durch Veresterung geschützt. Die Amid- und Hydrazidgruppen können gegebenenfalls substituiert sein, die Amidgruppe z.B. durch die 3,4-Dimethoxybenzyl- oder bis-(p-Methoxyphenyl)-methylgruppe, die Hydrazidgruppe z.B. durch die Carbobenzoxygruppe, die Trichlorethylloxycarbonylgruppe, die Trifluoracetylgruppe, die Tritylgruppe, die tert.-Butyloxycarbonylgruppe oder die 2-(p-Biphenyl)-isopropoxyloxycarbonylgruppe. Zur Veresterung geeignet sind z.B. niedere gegebenenfalls substituierte Alkanole wie Methanol, Ethanol, Cyanmethylalkohol, Benzoylmethylalkohol oder insbesondere tert.-Butanol, ferner Aralkanole wie Arylniederalkanole, z.B. gegebenenfalls durch Niederalkyl- oder Niederalkoxygruppen oder Halogenatome substituierte Benzylalkohole oder Benzhydrole wie Benzhydrol, p-Nitrophenylalkohol, p-Methoxybenzylalkohol, 2,4,6-Trimethylbenzylalkohol, gegebenenfalls durch elektronenanziehende Substituenten substituierter Phenole und Thiophenole wie Thiophenol, Thioresol, p-Nitrothiophenol, 2,4,5- und 2,4,6-Trichlorphenol, Pentachlorphenol, p-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, p-Cyanophenol oder p-Methansulfonylphenol, weiter z.B. N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxypiperidin, 8-Hydroxychinolin.

Die Hydroxygruppen der Serin- und Threoninreste können z.B. durch Veresterung oder Veretherung geschützt sein.

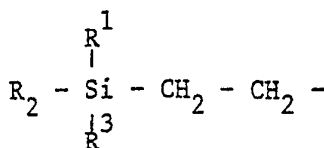
Als Acylreste bei der Veresterung sind vor allem von der Kohlensäure sich ableitende Reste wie Benzoyloxycarbonyl oder Ethyloxycarbonyl geeignet. Zur Veretherung geeignete Gruppen sind z.B. Benzyl-, Tetrahydropyranyl- oder tert.-Butylreste.

Ferner eignen sich zum Schutz der Hydroxylgruppen die in Ber. 100 (1967), 3838-3849 beschriebenen 2,2,2-Trifluor-1-tert.-butyloxycarbonylamino- oder -1-benzyloxycarbonylaminoethylgruppen (Weygand).

Vorzugsweise verwendet man zum Schutz der Carboxylgruppe der Seitenkette und gegebenenfalls der terminalen Carboxylgruppe die tert.-Butylestergruppe oder die Benzhydrolgruppe, zum Schutz der Aminogruppen der Seitenketten die tert.-Butyloxycarbonylgruppe, für die Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin, die tert.-Butylethergruppe, und, wenn erwünscht, zum Schutz der Iminogruppe des Histidins die 2,2,2-Trifluor-1-tert.-butyloxycarbonylaminoethylgruppe.

Die Abspaltung der Schutzgruppen mit sauren Mitteln unter milden Bedingungen erfolgt in einer von der Peptidchemie her bekannten Weise, z.B. durch Behandlung mit Trifluoressigsäure.

Eine besondere Schutzgruppe für Carboxylgruppen, welche unter neutralen Bedingungen abspaltbar ist, ist die z.B. in der DE-OS 27 06 490 beschriebene Gruppe der allgemeinen Formel



worin R¹, R² und R³ je einen Kohlenwasserstoffrest bedeutet, wobei die Reste untereinander auch durch eine einfache C-C-Bindung verknüpft sein können, insbesondere Alkylreste mit 1-5 C-Atomen. Schutzgruppen dieses Typs sind z.B. die 2-(Dimethyl-tert.-butylsilyl)-ethyl-, di 2-(Dibutyl-methyl-silyl)-ethyl- und vor

allen die 2-(Trimethylsilyl)-ethylgruppe. Obwohl diese Schutzgruppen auch basisch abgespalten werden können, ist besonders ihre Abspaltbarkeit unter neutralen Bedingungen, und zwar durch Einwirkung eines Salzes der Fluorwasserstoffsäure, von Interesse. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird vorteilhaft in einem aprotischen organischen Lösungsmittel vorgenommen; vorzugsweise wird dabei die Anwesenheit von solchen Lösungsmitteln vermieden, welche das Fluorid-Anion zu solvatisieren vermögen, wie Wasser oder niederaliphatische Alkohole.

Verfahrensgemäss werden in Verbindungen der Formel (IX), die im Teil Z_2 keine freien Hydroxygruppen enthalten dürfen, die freien Hydroxylgruppen im Glyzeryl- bzw. Erythrityl-Rest acyliert. Diese Acylierung kann in an sich bekannter Weise, z.B. durch Reaktion mit einem reaktiven funktionellen Derivat der dem einzuführenden Rest entsprechenden Säure, wie dem Anhydrid oder einem Säurehalogenid, vorzugsweise in Gegenwart einer tertiären Base, wie Pyridin oder Kollidin, ausgeführt werden.

Dieses Verfahren ist besonders zur Herstellung von Verfahrensprodukten gemäss Formel I, in welchen die Acylreste im Glyzeryl- bzw. Erythrityl-Rest und am Cysteinrest verschieden sind, geeignet.

Bei der Acylierung gemäss dem Verfahren der vorliegenden Erfindung von Ausgangsverbindungen der Formel IX, in welchen $-CO-Z_2$ eine Carboxylgruppe, und also Z_2 eine Hydroxygruppe, darstellt, schützt man vorzugsweise die Carboxylgruppe intermediär, z.B. mittels der Trimethylsilylethylgruppe oder der Benzhydylestergruppe. Die Methode mit der ersten der genannten Schutzgruppen ist z.B. in der DE-OS 27 06 490 beschrieben, die andere ist allgemein bekannt. Man kann jedoch mit einer beliebigen in der Peptidchemie üblichen oder bekannten Schutzgruppe operieren. Die genannte Trimethylsilyl-ethylgruppe, sowie analoge, von anderen Alkylresten abgeleitete, können durch alkalische oder saure Hydrolyse wieder entfernt werden. Besonders vorteilhaft ist die Abspaltung der Gruppe mit Fluorwasserstoffsäure: sie wird vorteilhaft in einem aprotischen organischen Lösungsmittel vorgenommen; vorzugsweise wird dabei die Anwesenheit von solchen Lösungsmitteln vermieden, welche das Fluorid-Anion zu solvatisieren vermögen, wie Wasser oder niederaliphatischen Alkohole.

In den nach dem beanspruchten Verfahren erhaltenen Lipopeptiden gemäss Formel I, in welchen eine freie terminale Carboxylgruppe im Teil X vorhanden ist, kann dieselbe in an sich bekannter Weise, z.B. nach einer der in der Peptidchemie gebräuchlichen Methode, in die Amid- oder Estergruppe übergeführt werden.

Die zur verfahrensgemässen Herstellung der neuen Lipopeptide zu verwendenden Aminosäuren bzw. Peptide sind bekannt oder können nach an sich bekannten Methoden hergestellt werden.

Die Verfahrensprodukte der Formel (I), in denen $X=OH$ ist, sowie ihre diastereomeren Gemische, Salze und Komplexe besitzen selber auch eine immunpotenzierende Wirkung, wobei diese in vitro im gleichen Dosisbereich wie für die Lipopeptide der Formel I und ihre Derivate angegeben, auftritt. In vivo zeigen die genannten Verbindungen im oben beschriebenen Test zur Potenzierung der humoralen Immunität bei der intraperitonealen Verabreichung 5 Tage vor der Antigengabe einen Anstieg der Antikörpertiter im Serum im Dosenbereich von 1,0 bis 3 mg/kg Tier.

Die Herstellung der für das beanspruchte Verfahren benötigten Ausgangsstoffe, d.h. die Glyzeryl- bzw. Erythrityl-N-Acyl-cysteine kann folgendermassen erfolgen: ausgehend von 1,1,5,6-D-Mannitdiacetonid gewinnt man durch Perjodatoxidation 2-O-, 3-O-Isopropyliden-D-glyzerinaldehyd. In diesem reduziert man die Aldehydgruppe zur Carbinolgruppe und verestert diese mit p-Toluolsulfonsäure. Das so erhaltene 1-O-Tosyl-2(R)-O-,3-O-isopropylidenglyzerin kondensiert man mit N-Acyl-(R)-cystein in Gegenwart eines basischen Mittels, z.B. Kaliumcarbonat, und erhält so das N-Acyl-S-(2(R),3-dihydroxy-propyl)-(R)-cystein, mit $Z_2=OH$. Verbindungen der Formel (IX), in denen Z_2 eine der Gruppe X in Formel (I) entsprechende Bedeutung hat, können durch Umsetzung der soeben genannten N-Acyl-cystein-Derivate mit einer Verbindung der Formel H-X nach in der Peptidchemie gebräuchlichen oder bekannten Methoden, z.B. durch Kondensation, hergestellt werden.

Die erhaltenen Verfahrensprodukte können in an sich bekannter Weise in ihre Salze übergeführt werden, z.B. durch Umsetzen erhaltener saurer Verbindungen mit Alkali- oder Erdalkalihydroxiden oder erhaltener basischer Verbindungen mit Säuren. Infolge der engen Beziehung zwischen den neuen Verbindungen in freier Form und in Form ihrer Salze und Komplexe sind im vorausgegangenen und nachfolgend unter den freien Verbindungen sinn- und zweckgemäss gegebenenfalls auch die entsprechenden Salze zu verstehen.

Erhaltene Isomerengemische können auf Grund der physikalisch-chemischen Unterschiede der Bestandteile in bekannter Weise aufgetrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie und/oder fraktionierte Kristallisation. Vorteilhafterweise isoliert man das wirksamere der Isomeren.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Patentansprüchen dargelegt.

Nachfolgend sind Temperaturen in Celsiusgraden angegeben.

Beispiel 1:

N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-tripalmitoyloxybutyl-(R)-cystein:

1 g N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-trihydroxybutyl-(R)-cystein-benzhydylester werden in einer Mischung aus 6 ml Pyridin in 5 ml Methylenchlorid mit 1,83 ml Palmitinsäurechlorid acyliert. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur gibt man 1 ml Methanol zu und dampft zur Trockne. Den Rückstand filtriert man über 100 g Kieselgel Merck mit Chloroform als Lösungsmittel. Die nach Dünnschichtchromatographie (CHCl₃: Essigester = 98:2) reinen Fraktionen geben nach Eindampfen farblose Kristalle vom Smp. 60-62°.

0,9 g des so erhaltenen N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-tripalmitoyloxybutyl-(R)-cysteinbenzhydylesters (Zwischenprodukt) lässt man in einer Mischung aus 3 ml Trifluoressigsäure und 12 ml Methylenchlorid 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Dann dampft man zur Trockne, verreibt den Rückstand mit Eiswasser, saugt ab und trocknet den Festkörper. Dann extrahiert man ihn mit Benzin und kristallisiert aus Aceton um. Man erhält farblose Kristalle des N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-tripalmitoyloxybutyl-(R)-cysteins vom Smp. 76-76,5° und der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ (c = 0,819, Dioxan).

Den als Ausgangsmaterial verwendeten N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-trihydroxybutyl-(R)-cystein-benzhydylester und die wiederum zu dessen Herstellung nötigen Ausgangsstoffe gewinnt man auf folgende Weise:

2,53 g N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-trihydroxybutyl-(R)-cystein lässt man in einer Mischung aus 12 ml Ethanol und 32 ml Chloroform mit 1,37 g Diphenyldiazomethan 15 Stunden bei Raumtemperatur reagieren. Man dampft zur Trockne und reinigt den entstandenen Benzhydylester an 150 g Kieselgel in Chloroform als Lösungsmittel. Rf = 0,3 (CHCl₃:Aceton = 95:5) Kieselgel Merck, Dünnschicht.

N-Palmitoyl-S-2(R),3(R),4-trihydroxybutyl-(R)-cystein gewinnt man auf folgende Weise:

8,2 g N-Palmitoyl-S-((2,4-ethyliden)-erythrityl)-(R)-cystein werden in 100 ml Dimethoxyethan bei 80° während 4,5 Stunden mit 100 ml 3-proz. HBF₄ behandelt.

Dann kühlt man auf 0°, wobei das Hydrolyseprodukt ausfällt. Nach Absaugen und Trocknen kristallisiert man aus Essigester um. Smp. 160-165°, Sintern ab 93°.

Rf = 0,285 (CHCl₃:MeOH = 6:4) Dünnschicht, Kieselgel, Merck.

Das Ausgangsmaterial erhält man folgendermassen:

20 g N-Palmitoyl-(R)-cystein, 27,6 g 1-Tosyl-2,4-ethyliden-D-erythrit und 17 g Pottasche werden unter Stickstoff in 240 ml Ethanol 15 Stunden bei 80° gerührt.

Dann filtriert man die Salze ab und dampft das Filtrat zur Trockne. Man nimmt den Rückstand in 200 ml H₂O:Tetrahydrofuran = 1:1 auf und säuert mit 2N-Salzsäure auf pH = 3 an. Dann schüttelt man dreimal mit Ether aus, stellt mit Pyridin den pH der Etherphase auf 4,5 ein, schüttelt mit Wasser aus, trocknet die Etherphase und dampft zur Trockne. Diesen Rückstand reinigt man über 200 g Kieselgel Merck mit Chloroform:Aceton = 8:2 (1 l) und dann mit CHCl₃:MeOH = 6:4 (1,2 l) als Elutionsmittel.

Die reinen Fraktionen werden eingedampft, mit Hexan verrieben und aus Essigester-Petrolether umkristallisiert.

Man erhält farblose Kristalle des N-Palmitoyl-S-((2,4-ethyliden)-erythrityl)-(R)-cysteins vom Smp. 62-65°.

Beispiel 2:

N-Palmitoyl-S-(2(R), 3-dipalmitoyloxypropyl)-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe:

1,28 g N-Palmitoyl-S-[2(R), 3-dihydroxypropyl]-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe (Me bedeutet hier und im Folgenden CH₃) werden in 15 ml Pyridin aufgenommen, 0,898 ml Palmitinsäurechlorid zugegeben und die Lösung 24 Stunden bei 45° gehalten. Man dampft dann ein und verreibt den Rückstand zweimal mit je 10 ml Wasser. Das Produkt wird durch Chromatographie an Kieselgel im System Chloroform, bzw. Chloroform-Methanol (98:2) gereinigt. Das dünnschichtchromatographisch einheitliche Lipopeptid N-Palmitoyl-S-(2(R), 3-di-palmitoyloxypropyl)-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OCH₃ zeigt im System Chloroform-Methanol (95:5) auf Silikagel einen Rf-Wert von 0,65.

Den Ausgangsstoff, N-Palmitoyl-S-[2(R), 3-dihydroxypropyl]-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe, und die wiederum zu dessen Herstellung nötigen Ausgangsstoffe (2 Reihen) erhält man in absteigender Reihenfolge folgendermassen:

Zu 0,866 g N-Palmitoyl-S-[2(R), 3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein und 1,248 g H-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe in 20 ml Dimethylformamid gibt man 0,5 g Dicyclohexyl-carbodiimid und 0,3 g N-Hydroxybenzotriazol. Nach 10 Stunden bei 45° dampft man ein und reinigt den Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel im System Chloroform, bzw. Chloroform-Methanol (95:5). Das dünnschichtchromatographisch reine Produkt zeigt im System Chloroform-Methanol (9:1) auf Silikagel einen Rf-Wert von 0,35.

H-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OCH₃:

2,0 g Z-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OCH₃ (Z = Benzyloxycarbonyl) werden in 200 ml Trifluorethanol in Gegenwart von 0,2 g Pd-Kohle (10%ig) hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrates wird H-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe als weisses Pulver erhalten. Auf Silikagel: Rf (Chloroform-Methanol 9:1) = 0,60.

5 Z-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OCH₃:

1,03 g Z-Phe-OH und 3,44 g H-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe werden in 30 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,75 g Dicyclohexylcarbodiimid und 0,53 g N-Hydroxybenzotriazol versetzt. Nach 24 Stunden bei 20° filtriert man das ausgeschiedene Produkt und kristallisiert aus heissem Acetonitril um. Das schwer lösliche Peptid hat auf Silikagel im System Chloroform-Methanol (1:1) einen Rf-Wert von 0,78.

10 H-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe:

2,1 g Z-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe werden in 30 ml Trifluorethanol in Gegenwart von 0,21 g Pd-Kohle (10%ig) hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrates erhält man H-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe als weissen Schaum. Auf Silikagel: Rf (Chloroform-Methanol 1:1) = 0,75.

Z-Ile-Ile-Phe-Ala-OMe:

15 Zu 1,62 g Z-Ile-OH und 2,22 g H-Ile-Phe-Ala-OMe in 40 ml Dimethylformamid gibt man 0,933 g N-Hydroxybenzotriazol und 2,39 g N-Benzyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid-Tosylat. Nach 24 Stunden bei 4° wird abfiltriert, der Rückstand mit Wasser gewaschen und aus heissem Acetonitril umgefällt. Rf auf Silikagel (Essigester-Chloroform 1:1) = 0,30.

H-Ile-Phe-Ala-OMe:

20 3,05 g Z-Ile-Phe-Ala-OMe werden in 100 ml Trifluorethanol in Gegenwart von 0,3 g Pd-Kohle (10%ig) hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen des Filtrates erhält man H-Ile-Phe-Ala-OMe als weisses Pulver. Rf auf Silikagel (Chloroform-Methanol 1:1) = 0,72.

Z-Ile-Phe-Ala-OMe:

25 2,2 g Z-Ile-OH und 2,38 g HCl.H-Phe-Ala-OMe werden in 40 ml Dimethylformamid gelöst und 1,71 g Dicyclohexylcarbodiimid, 1,27 g N-Hydroxybenzotriazol und 1,04 ml N-Ethylmorpholin zugegeben. Nach 24 Stunden bei 4° wird abfiltriert, das Filtrat auf die Hälfte eingeeengt und mit 200 ml Wasser versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Acetonitril umkristallisiert. Smp. 201-203°.

HCl.H-Phe-Ala-OMe:

30 3,84 g Z-Phe-Ala-OMe werden in 40 ml Methanol in Gegenwart von 8,5 ml Chlorwasserstoff in Methanol (1,18 N) und 0,4 g Pd-Kohle (10%ig) hydriert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator und Eindampfen der Lösung erhält man HCl.H-Phe-Ala-OMe als weisses Pulver. Auf Silikagel:Rf (Toluol-Aceton 1:1) = 0,38.

Z-Phe-Ala-OMe:

35 Zu 46,4 g Z-Phe-OH und 21,18 g HCl.H-Ala-OMe in 500 ml Dimethylformamid gibt man 31,9 g Dicyclohexylcarbodiimid, 23,7 g N-Hydroxybenzotriazol und 19,5 ml N-Ethylmorpholin. Nach 24 Stunden bei 4° wird abfiltriert, das Filtrat auf ca. die Hälfte eingeeengt und mit 1 l Wasser versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Smp. 125-126°, $[\alpha]_D^{20} = 23^\circ$ (c=0,5 in Methanol).

N-Palmitoyl-S-[2(R), 3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein:

13,9 g N-Palmitoyl-(R)-cystein, 5,5 g Kaliumcarbonat und 15 g 1-O-Tosyl-2(R)-O-3-O-isopropyliden-glyzerin erhitzt man 8 Stunden bei 80° in 250 ml Ethanol unter Stickstoff. Man reinigt das nach dem Eindampfen erhaltene Reaktionsgemisch durch Chromatographie an 400 g Kieselgel Merck durch Elution, zuerst mit Chloroform/Aceton (8:2) dann mit Chloroform/Methanol (8:2). Man erhält so das Kaliumsalz des N-Palmitoyl-S-(2(R),3-isopropylidendioxypropyl)-(R)-cysteins, das durch 4-stündiges Erhitzen auf 80° in 80 % wässriger Essigsäure verseift wird. Man dampft zur Trockne, löst den Rückstand in Chloroform und schüttelt mit Wasser aus. Nach Trocknen und Eindampfen der Chloroform-Phase erhält man einen farblosen Rückstand 45 der aus Cyclohexan umkristallisiert wird und das N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-(R)-cystein darstellt. Fp. 110°, $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ (c = 0,9, MeOH).

Das N-Palmitoyl-(R)-cystein kann folgendermassen hergestellt werden:

45 g (R)-Cystein (0,37 Mol) suspendiert man in 350 ml Pyridin und tropft unter gutem Rühren und in einer Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur eine Lösung von 140 ml (1,67 Äquivalente) Palmitinsäurechlorid 50 in 550 ml Methylenchlorid zu. Nach 20-stündigem Rühren säuert man mit 2N-Salzsäure an und verteilt zwischen Chloroform und Wasser. Nach Trocknen und Eindampfen der Chloroform-Phase erhält man ein Kristallgemisch, bestehend aus etwa einem Drittel Dipalmitoylcystein und etwa drei Drittel Monopalmitoylcystein. Man extrahiert dreimal mit 1 l heissem Aceton, aus dem ein 1:1-Gemisch von Di- und Mono-Palmitoylcystein auskristallisiert. Aus der Acetonlösung erhält man durch Eindampfen N-Palmitoylcystein, 55 das aus Benzin umkristallisiert wird. Fp 65-67°. $[\alpha]_D^{20} = +1^\circ$ (c = 0,8; Methanol).

Die Mischungen aus Di- und Mono-palmitoyl-cystein werden in methanolischer Lösung unter Zugabe einer wässrigen Lösung von 12 g Natriumsulfid mit 2 ml konz. Natronlauge 15 Min. bei Raumtemperatur behandelt. Nach Abdampfen des Methanols und Ansäuern des Rückstandes mit 2N-Salzsäure erhält man

durch Chloroform-Extraktionen das restliche N-Palmitoyl-cystein, das ebenfalls aus Benzin umkristallisiert wird.

Beispiel 3:

5

Analog Beispiel 2 erhält man N-Palmitoyl-S-[2(R), 3-dipalmitoyloxypropyl]-Cys-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, R_f = 0,75 (Chloroform: Methanol:Wasser:Eisessig = 75:25:5:0,5).

Beispiel 4:

10

N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein:

12 g (20 mMol) N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein-benzhydriylester löst man in einer Mischung aus 60 ml Pyridin und 60 ml Methylenchlorid und tropft bei 0-10° 14,5 ml (13,2 g) Palmitinsäurechlorid zu. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur ist die Reaktion gemäss Dünnschichtchromatogramm
15 beendet. Man gibt zur Suspension (Pyridinhydrochlorid) 10 ml Methanol, rührt 20 Min. bei 25° und dampft dann das Reaktionsgemisch weitgehend ein. Man nimmt den Rückstand in Chloroform auf, schüttelt je zweimal mit 0,5 N-Salzsäure, 10 % Natriumbicarbonat und Wasser aus, trocknet die Chloroform-Phase mit Natriumsulfat und dampft sie zum Sirup ein. Den reinen Ester erhält man durch Chromatographie dieses Sirups über Kieselgel in Chloroform. Die chromatographisch einheitlichen Fraktionen (DC-Kontrolle auf
20 Kieselgel in Chloroform:Essigester 98:2, R_f = 0,5) werden eingedampft und aus Aceton umkristallisiert. Man erhält farblose Kristalle des N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein-benzhydriylesters (Zwischenprodukt) vom Smp. 69-71°.

6,3 g (2,78 mMol) N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein-benzhydriylester löst man in einer Mischung aus 12 ml Trifluoressigsäure und 48 ml Methylenchlorid. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur dampft man die Lösung ein und verreibt den öligen Rückstand mit Wasser. Das auskristallisierte N-
25 Palmitoyl-S-[2(R),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein wird abgesaugt, getrocknet und zur Entfernung des Benzhydrois dreimal mit Benzin verrieben. Man kristallisiert den Rückstand aus Aceton-Wasser und erhält so farblose Kristalle von N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein vom Smp. 71-75° und $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ$ (Dioxan).

30 Den oben als Ausgangsstoff verwendeten N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cysteinbenzhydriylester erhält man z.B. auf folgende Weise:

23,4 g (54 mMol) N-Palmitoyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein löst man in 150 ml Chloroform-Aethanol-Gemisch 1:1 und tropft dazu bei Raumtemperatur eine Lösung von 13,6 g (70 mMol) Diphenyldiazomethan in 150 ml Chloroform. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur ist die anfänglich rote Lösung
35 entfärbt und nach DC (Chloroform:Methanol = 9:1, Kieselgel) die Reaktion beendet.

Man dampft im Vakuum zur Trockne und extrahiert den Rückstand kalt mit Petroläther. Der Rückstand wird über Kieselgel mit Methylenchlorid als Lösungsmittel filtriert. Man erhält so farblose Kristalle des Benzhydriylesters vom Smp. 88-91°.

40 Beispiel 5:

N-Palmitoyl-S-[2(S),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein:

Durch Umsetzung von N-Palmitoyl-S-(2(R,S),3-dihydroxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydriylester mit Palmitinsäurechlorid, wie in Beispiel 4 für die R-Verbindung angegeben, erhält man den N-Palmitoyl-S-(2(R,S),3-
45 dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydriylester; farblose Kristalle vom Smp. 84-85°.

Wenn man dieses Diastereomeren-Gemisch (19,8 g) an einer Säule mit 250 g Kieselgel (Merck) mit Methylenchlorid als Lösungsmittel chromatographiert, so erhält man in einer ersten Fraktion (1,55 g) das R-Diastereomere (R_f = 0,61, Methylenchlorid:

Essigester = 98:2, Dünnschicht, Kieselgel), in einer zweiten Fraktion 12,7 g eines R,S-Diastereomerengemisches und in einer dritten Fraktion 1,1 g des S-Diastereomeren N-Palmitoyl-S-[2(S),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cysteinbenzhydriylester (R_f = 0,53 in Methylenchlorid:Essigester = 98:2).
50

Aus N-Palmitoyl-S-[2(S),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cysteinbenzhydriylester erhält man analog Beispiel 4 N-Palmitoyl-S-[2(S),3-dipalmitoyloxypropyl]-(R)-cystein; farblose Kristalle vom Smp. 64-65°, $[\alpha]_D^{20} = +1^\circ$ (Dioxan).

55

Beispiel 6:

Analog Beispiel 4 erhält man aus den entsprechenden Dihydroxypropylcysteinbenzhydylestern, z.B. aus

- 5 N-Myristoyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-(R)-cystein-benzhydylester, farblose Kristalle von Smp. 90-92°; N-Stearoyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-(R)-cystein-benzhydylester, farblose Kristalle vom Smp. 95°-97° oder N-Lauroyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-(R)-cystein-benzhydylester, farblose Kristalle vom Smp. 95-97°, durch Umsetzung mit den entsprechenden Fettsäurehalogeniden die entsprechenden diacylierten Benzhydylester (Zwischenprodukte), z.B.
- 10 N-Lauroyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydylester, Smp. 65-68°; N-Myristoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydylester, Smp. 68-70°; N-Stearoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydylester, Smp. 70-72°; N-Palmitoyl-S-(2(R),3-distearoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydylester, farblose Kristalle, Smp. 80-82° oder N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dibehenoyloxypropyl)-(R)-cysteinbenzhydylester, farblose Kristalle, Smp. 85-88°.
- 15 Daraus erhält man analog Beispiel 4 die folgenden Endprodukte der Formel I:
N-Lauroyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cystein, farblose Kristalle, Smp. 70-72°; N-Myristoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cystein, farblose Kristalle Smp. 71-73°; N-Stearoyl-S-(2(R),3-dipalmitoyloxypropyl)-(R)-cystein, farblose Kristalle, Smp. 74-77°;
N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dilauroyloxypropyl)-(R)-cystein, Smp. 54-56°;
- 20 N-Palmitoyl-S-(2(R),3-distearoyloxypropyl)-(R)-cystein, farblose Kristalle, Smp. 82-85°;
N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dioleoyloxypropyl)-(R)-cystein, farbloses Öl, R_f in Chloroform:Methanol = 9:1 (Dünnschicht-Kieselgel-Merck) = 0,35;
N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dibehenoyloxypropyl)-(R)-cystein, farblose Kristalle, Smp. 87-90°;
N-Palmitoyl-S-(2(R),3-di-(dihydrosterkuloyloxypropyl)-(R)-cystein, farbloses Wachs, R_f = 0,38 (gleiche Bedingungen wie oben für das N-Palmitoyl-2,3-dioleoyloxyDerivat angegeben).
- 25

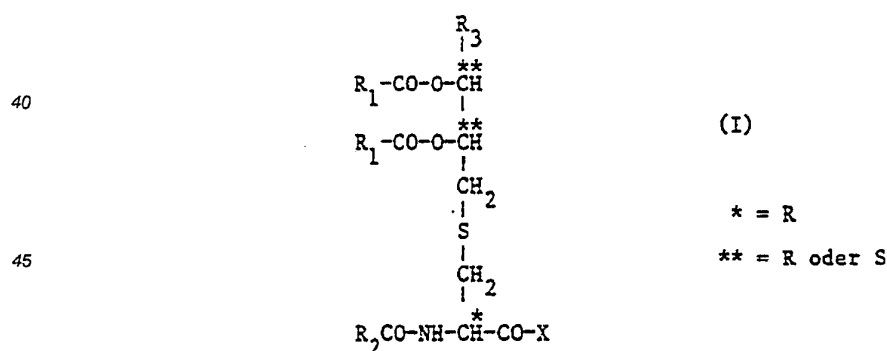
Die vorstehend genannten Dihydroxypropyl-cysteinbenzhydylester (Ausgangsprodukte) erhält man analog Beispiel 4 aus den

entsprechenden Dihydroxy-propyl-cysteinen mit Diphenyldiazomethan, z.B. aus N-Myristoyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein, farblose Kristalle vom Smp. 140-150°, N-Stearoyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein, farblose Kristalle vom Smp. 140-150° und N-Lauroyl-S-[2(R),3-dihydroxypropyl]-(R)-cystein, farblose Kristalle vom Smp. 140-150°.

30

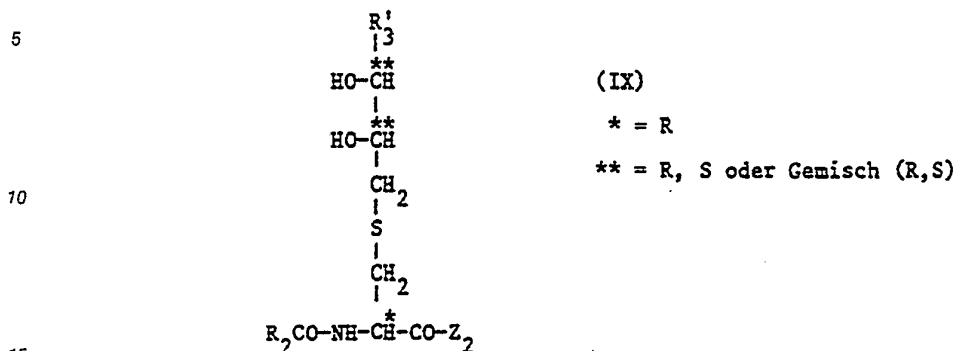
Patentansprüche

- 35 1. Verfahren zur Herstellung von neuen Verbindungen der Formel



- 50 worin R₁ und R₂ je einen gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder gemischt aliphatisch-cycloaliphatischen, gegebenenfalls auch durch Epoxy substituierten, Kohlenwasserstoffrest mit 11-21 C-Atomen, R₃ Wasserstoff oder den Rest R₁-CO-O-CH₂-, wo R₁ die obige Bedeutung hat, und X eine peptidisch gebundene natürliche aliphatische Aminosäure, die keine freien Hydroxygruppen enthält, mit freier, veresterter oder amidierter Carboxylgruppe, oder eine Aminosäuresequenz von 2-10, vorzugsweise 2-5, natürlichen aliphatischen Aminosäuren, deren terminale Carboxylgruppe in freier, veresterter oder amidierter Form vorliegt und worin keine freien Hydroxygruppen vorhanden sind, bedeuten, oder
- 55 X = OH ist, wobei die mit * bzw. ** bezeichneten Asymmetriezentren die absolute R bzw. S- oder R-Konfiguration besitzen, und gegebenenfalls von Gemischen der an den **C-Atomen epimeren R- und S-

Verbindungen, und ihren Salzen und Komplexen, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel



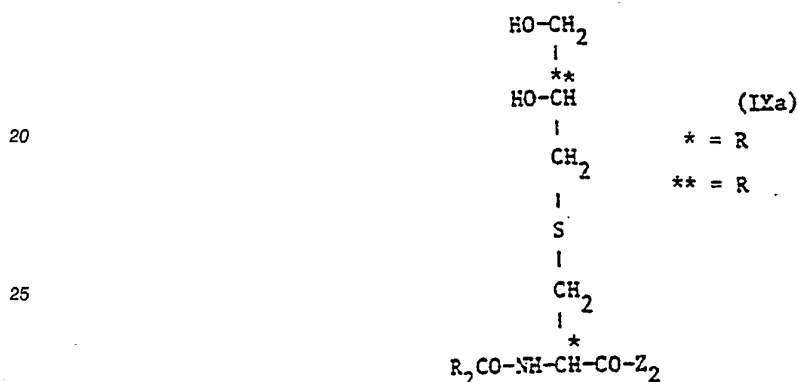
worin R_2 die für Formel (I) angegebene Bedeutung besitzt und R'_3 Wasserstoff oder die Gruppe $\text{H}-\text{O}-\text{CH}_2-$ darstellt, und Z_2 Hydroxy, eine peptidisch gebundene natürliche aliphatische Aminosäure, die keine freien Hydroxygruppen enthält, mit freier, veresterter oder amidierter Carboxylgruppe, oder eine Aminosäuresequenz von 2-10, vorzugsweise 2-5, natürlichen aliphatischen Aminosäuren, deren terminale Carboxylgruppe in freier, veresterter oder amidierter Form vorliegt und worin keine freien Hydroxygruppen vorhanden sind, bedeutet, oder ein Derivat einer solchen Verbindung, worin der Rest $-\text{CO}-\text{Z}_2$ eine geschützte Carboxylgruppe bedeutet, oder ein Salz einer Verbindung der Formel IX acyliert, und, wenn man eine Verbindung erhalten hat, worin der Rest $-\text{CO}-\text{Z}_2$ eine geschützte Carboxylgruppe bedeutet, die Schutzgruppe abspaltet, und, wenn erwünscht, in einer erhaltenen Verbindung der Formel I, worin der Rest X den Rest einer Aminosäure oder Peptidsequenz mit freier terminaler Carboxylgruppe bedeutet, dieselbe in eine Amidgruppe oder Estergruppe überführt, und/oder eine erhaltene Verbindung der Formel I in ihre Salze oder Komplexe überführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin ein Acylrest $\text{R}_2\text{CO}-$ sich von gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren mit 14-18 C-Atomen ableitet, und man mit Acylierungsmitteln acyliert, die sich von derartigen Fettsäuren ableiten.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin ein Acylrest $\text{R}_2\text{CO}-$ sich von der Palmitinsäure, Stearinsäure oder der Oelsäure ableitet, und man mit Acylierungsmitteln acyliert, die sich von derartigen Fettsäuren ableiten.
4. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin ein Acylrest $\text{R}_2\text{CO}-$ sich von Epoxyderivaten von ungesättigten Fettsäuren mit 14-18 C-Atomen ableiten, und man mit Acylierungsmitteln acyliert, die sich von derartigen Fettsäuren ableiten.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin ein Acylrest $\text{R}_2\text{CO}-$ sich von der Laurin-, Myristin-, Behen-, Dihydrostercul-, Malval-, Hydnocarpus- oder Chaulmoograsäure ableitet, und man mit Acylierungsmitteln acyliert, die sich von derartigen Fettsäuren ableiten.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, **dadurch gekennzeichnet**, dass man von Ausgangsstoffen ausgeht, in denen der Acylrest $\text{R}_2\text{CO}-$ von demjenigen verschieden ist, der durch Acylierung eingeführt wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel IX einsetzt, worin der Rest Z_2 den Rest von Asparagin, Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Norvalin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin, oder von einer Aminosäuresequenz, bestehend aus 2-10, vorzugsweise 2-5, der obengenannten Aminosäuren bedeutet.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-6, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel IX einsetzt, worin der Rest Z_2 den Rest von Asparagin, Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Norvalin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin, deren Carboxylgruppe in veresterter oder amidierter

Form vorliegt, oder von einer Aminosäuresequenz, bestehend aus 2-10, vorzugsweise 2-5, der obengenannten Aminosäuren, deren terminale Carboxylgruppe in veresterter oder amidierter Form vorliegt, bedeutet.

- 5 9. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-8, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin in der Peptidkette Z_2 die Aminosäuren mit hydrophilem Charakter (Asparagin oder Glutamin) direkt miteinander verbunden sind.
- 10 10. Verfahren gemäss Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Ausgangsstoffe verwendet, worin die Sequenz der Aminosäuren mit hydrophilem Charakter direkt an die Carboxylgruppe des Cysteins in Triacyl-Glyceryl- bzw. Tetraacyl-Erythrityl-cystein-Teil gebunden ist.
11. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-10, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel

15



30 worin Z_2 den Rest einer Aminosäure oder einer Peptidsequenz mit 2-5 Aminosäuren darstellt, verwendet.

12. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-11, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel IX verwendet, in der Z_2 eine Peptidkette bedeutet, mit der Massgabe, dass die Sequenz der ersten 5 Aminosäuren dieser Peptidkette von der Sequenz -Ser-Ser-Asn-Ala-Lys- verschieden ist.

35

13. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-6 und 9-10, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel IX verwendet, worin der Rest Z_2 den Rest einer Aminosäure oder Aminosäuresequenz mit terminaler veresterter Carboxylgruppe bedeutet, deren Esterrest sich von einem niederen aliphatischen Alkohol mit 1-7 C-Atomen, einem Ethylenglykol, Propylenglykol oder dem Glycerin ableitet.

40

14. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1-6 und 9-10, **dadurch gekennzeichnet**, dass man eine Verbindung der Formel IX verwendet, worin Z_2 der Rest einer Aminosäure oder Aminosäuresequenz mit terminaler Amidgruppe $-\text{CONH}_2$ oder mit einer sich von einem niederen aliphatischen Amin mit 1-7 C-Atomen, dem Pyrrolidin, Piperidin oder Piperazin ableitenden terminalen Amidgruppe ist.

45

15. Verfahren gemäss Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-Cys-Phe-Ile-Ile-Phe-Ala-OH oder N-Palmitoyl-S-(2(R),3-dihydroxypropyl)-Cys-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, oder ein Epimeres dieser Verbindungen mit entsprechender Konfiguration an 2-C-Atom des Propylrestes, mit einem den Palmitoylrest einführenden Mittel behandelt.

50

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, dass man erhaltene Verfahrensprodukte in Ammoniumsalze, Alkali- oder Erdalkalisalze oder in pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze überführt.

55

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, **dadurch gekennzeichnet**, dass man erhaltene Verfahrensprodukte in ein Kupfer-, Zink-, Eisen- oder Kobalt-Komplexsalz der Lipopeptide überführt.