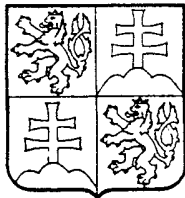


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 27.03.90

(32) 27.03.89

(31) 89/62

(33) YU

(40) 13.08.91

(21) 01490-90.Q

(13) A3

5(51) C 13 K 7/00

(71) PLIVA FARMACEUTSKA, KEMIJSKA, PREHRAMBENA I KOZMETICKA., Zagreb, YU

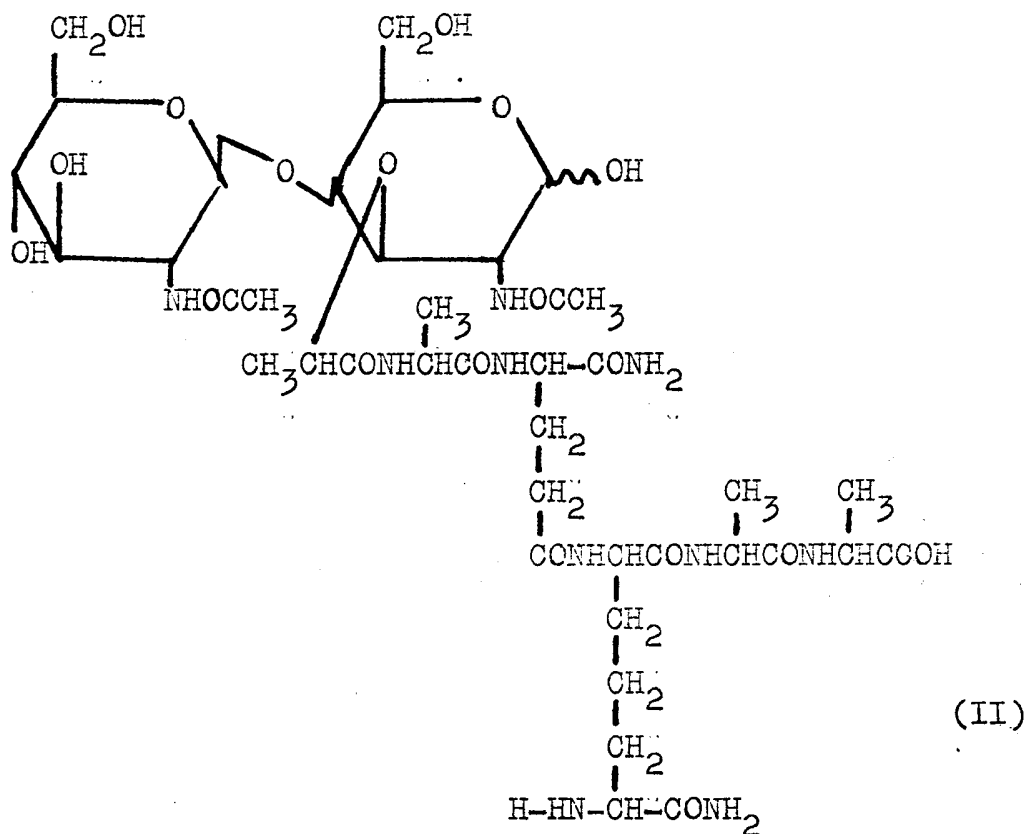
(72) Sušković Božidar, Zagreb, YU
Naumski Radmila, Zagreb, YU
Gomerčić Vera, Zagreb, YU
Mubrin Zdenko, Zagreb, YU

(54) Způsob přípravy N-acyl-derivátů monomeru peptidoglykanu

(57) Způsob přípravy N-acyl-derivátů monomeru peptidoglykanu obecného vzorce I, v němž R znamená acylovou skupinu alkykarboxylové kyseliny s přímým řetězcem se 2 až 18 atomy uhlíku, alkykarboxylové kyseliny s větveným řetězcem s 5 až 18 atomy uhlíku, nenasycené alkenylkarboxylové kyseliny s 12 až 18 atomy uhlíku nebo aromatické karboxylové kyseliny se 7 až 12 atomy uhlíku, a jejich farmaceuticky přijatelných solí, vyznačující se tím, že monomer peptidoglykanu (PGM) se acyluje za přítomnosti báze reakcí s kyselinou obecného vzorce III, v němž R znamená jako v obecném vzorci I, při čemž kyselina je v aktivované formě. Nové sloučeniny (obecného vzorce I) a jejich farmaceuticky přijatelné soli jsou zvláště užitečné pro přípravu imunomodulátorů a imunoadjuvantů pro lidi a zvířata.

Tento vynález se týká způsobu přípravy nových N-acyl-derivátů monomeru peptidoglykanu (PGM) a jeho farmaceuticky přijatelných solí, které jsou použitelné zvláště jako imunostimulátory a imunoadjuvanty.

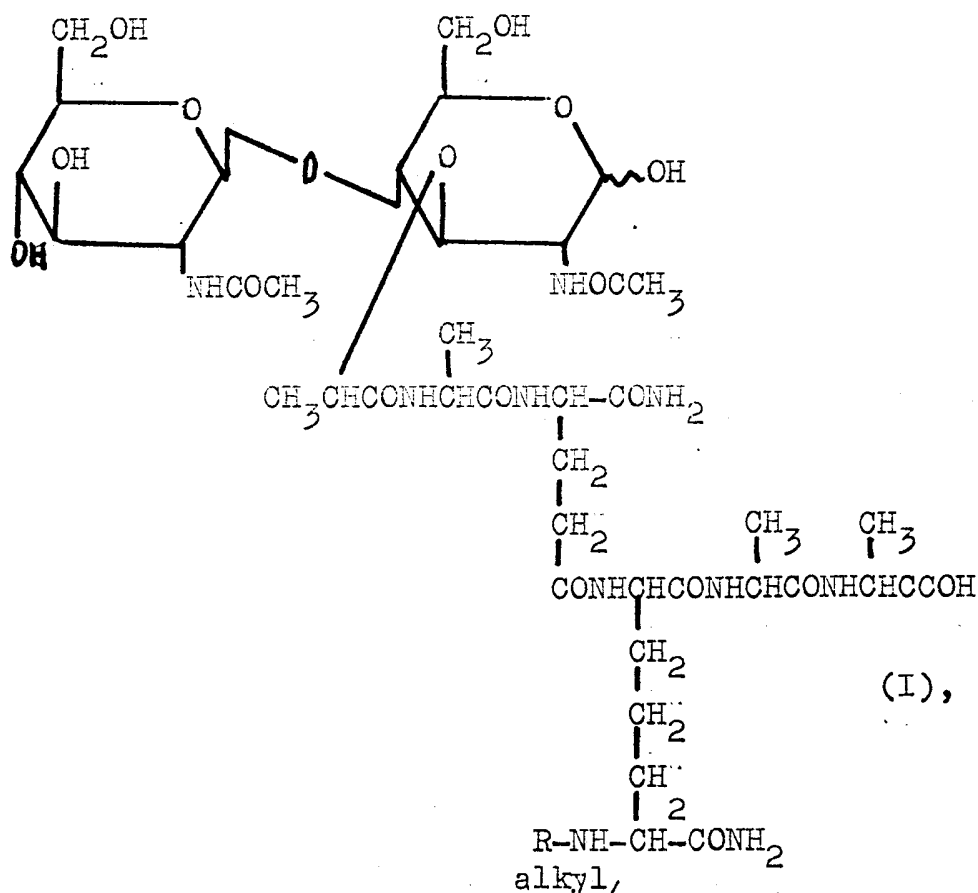
Je známo, že monomer peptidoglykanu obecného vzorce II



[Carbohydr. Res. 110, 320 až 325 (1982).] vykazuje imunomodulační [Z. Immun. Forsch. 155, 312 až 328 (1979).] a také antimetastasovou účinnost [Eur. J. Cancer O col. 19, 681 až 686 (1983), Cancer Immunol. Immunother. 15, 84 až 86 (1983), Cancer Immunol. Immunother. 18, 49 až 53 (1984).]. Je to látka netoxická a apyrogenní. Je dobře rozpustná ve vodě,

ale není rozpustná v organických rozpouštědlech. Její vysoce hydrofilní a lipofobní charakter jí neumožňuje pronikat lipofilními membránami v organismu. Rozsah lipofilního a hydrofobního charakteru takových sloučenin by mohl významně ovlivňovat jejich aktivitu.

Předmětem tohoto vynálezu je příprava nových N-acyl-derivátů monomeru peptidoglykanu obecného vzorce I



v němž R znamená acylovou skupinu karboxylové kyseliny s přímým řetězcem se 2 až 18 atomy uhlíku, alkylkarboxylové kyseliny s rozvětveným řetězcem s 5 až 18 atomy uhlíku,

nenasycené alkenylkarboxylové kyseliny se 12 až 18 atomy uhlíku nebo aromatické karboxylové kyseliny se 7 až 12 atomy uhlíku, a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Příklady skupiny R v obecném vzorci I, pokud znamená acylovou skupinu alkylnkarboxylové kyseliny s přímým řetězcem se 2 až 18 atomy uhlíku, jsou acetylová, kapryloylová, kapri-
noylová, lauroylová, palmitoylová a stearylová skupina.

Výhodným příkladem skupiny R v obecném vzorci I, pokud znamená acylovou skupinu alkylnkarboxylové kyseliny s rozvětveným řetězcem s 5 až 18 atomy uhlíku, je pivaloylová skupina.

Výhodným příkladem skupiny R v obecném vzorci I, pokud znamená acylovou skupinu nenasyčené alkenylkarboxylové kyseliny se 12 až 18 atomy uhlíku, je olejlová skupina.

Výhodným příkladem skupiny R v obecném vzorci I, pokud znamená acylovou skupinu aromatické karboxylové kyseliny se 7 až 12 atomy uhlíku, je benzoylová skupina.

Mezi farmaceuticky přijatelné soli nových N-acyl-derivátů monomeru peptidoglykanu (PGM) patří také soli těchto derivátů s anorganickými nebo organickými bázemi, jako jsou například soli alkalických kovů (například sodné soli, dra-

selné soli), soli kovů alkalických zemin (například vápenaté soli), amonné soli, soli organických bází (například soli s ethanolaminem a soli s triethanolaminem) a jiné fyziologicky tolerovatelné soli.

Při přípravě nových N-acyl-derivátů PGM obecného vzorce I byly použity známé způsoby acylace pGM obecného vzorce II reakcí s odpovídající kyselinou obecného vzorce III



v němž R znamená jak shora uvedeno v obecném vzorci I, při čemž kyselina existuje v aktivované formě, například jako anhydrid, zvláště jako aktivní ester, jako například ester, který se vytvoří reakcí kyseliny s N-hydroxysukcinimidem, N-hydroxybenzotriazolem, N-hydroxyftalimidem a podobnými alkoholy. Příprava aktivních esterů se provádí za přítomnosti dehydratačních činidel, jakými jsou například dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo jiné konvenční karbodiimidy popsané v literatuře, N,N-karbonyldiimidazol, p-toluensulfonát a jiné známé sulfonáty. Reakční podmínky pro použití takových činidel jsou popsány v literatuře. Výhodné jsou reakce s karbodiimidy. Reakce se provádějí při teplotě 20 až 25 °C a dávají vysoké výtěžky. Acylace PGM, například anhydridem kyseliny octové, se provádí za přítomnosti bází, jako je například hydrogenuhličitan sodný, acylace odpovídajícím aktivním esterem kyseliny se provádí v inertním

rozpouštědla, jako je například dimethylformamid (DMF), za přítomnosti organické báze jako katalyzátoru. PGM a aktivní ester se používají v poměru 1 : 1,3 až 1 : 2 (mol/mol), poměr PGM k rozpouštědлу se pohybuje v rozmezí od 1 : 30 do 1 : 100 (hmotnostní díly k objemovým dílům). Organická báze je ve formě aminu, jako je například triethylamin (TEA). Tato báze se přidává k PGM v poměru od 1 : 2 do 1 : 5 (mol na mol). Reakce se provádí 24 hodin při teplotě 20 až 25 °C. Průběh reakce se sleduje chromatografií na tenké vrstvě (TLC) silikagelu, jako adsorbentu, a v takovém rozpouštědlovém systému, který je vhodný pro dělení produktů reakce od výchozích reakčních činidel, jako je například rozpouštědlový systém propanol - voda v poměru 7 : 3 (objemové díly k objemovým dílům) (systém A).

Přidáním organického rozpouštědla, v němž se produkt nerozpouští, jako je například ethylacetát (EtOAc), se získá produkt. Produkt se pak vyčistí konvenčními způsoby, jako je například chromatografie na koloně na různých adsorbentech, např. na silikagelu, eluce shora uvedeným rozpouštědlovým systémem A, nebo na Sephadexu, eluce vodou.

Dalším předmětem tohoto vynálezu je získání způsobu přípravy farmaceutických prostředků obsahujících účinnou a ještě fyziologicky tolerovatelnou dávku nového N-acylderivátu

monomeru peptidoglykanu obecného vzorce I nebo jeho farmaceuticky přijatelných solí, které se označují jako imunomodulační nebo imunoaktivní léčivé prostředky. Účinné sloučeniny se mohou formulovat v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem. Tyto farmaceutické prostředky se s výhodou podávají parenterálně.

Biologická účinnost sloučenin, které jsou uvedeny v bodech předmětu vynálezu, byla testována na myších samcích CBA, starých 2 až 2,5 měsíce. Zvířata byla adaptována na laboratorní podmínky přizpůsobováním alespoň jeden týden před každým testováním. Účinnost N-acyl-derivátu PGM byla srovnávána s výsledky získanými s kontrolní skupinou myši, jimž byl podáván fyziologický roztok (negativní kontrola) a originální PGM (pozitivní kontrola). Všechny testované sloučeniny byly podávány do organismu intravenózní (iv.) cestou v jediné dávce 200 $\mu\text{g}/\text{myš}$, resp. 10 mg/kg. Při testování imunofarmakologické účinnosti byly zjišťovány následující účinky: hmotnost sleziny, počet lymfocytů a počet PFC (plaky tvořících buněk) způsobem podle Jerneho ["Cell Bound Antibodies", Whister Institute Press, Philadelphia, str. 109 (1963)]. Hmotnost sleziny byla vyjadřována v mg. Počet lymfocytů sleziny byl vyjadřován jako absolutní číslo v 1 ml, zatímco počet PFC byl vyjadřován jako celkové číslo a jako účinnost v 10^6 lymfocytech sleziny. Testované skupiny

a odpovídající kontrolní skupiny obsahovaly po 5 až 7 myších. Účinnost každého N-acyl-derivátu PGM byla zjišťována alespoň třikrát v různých obdobích. Statistická analýza byla provedena s parametry Studentova t-testu podle původního programu pro počítač Stat Works. Významnost rozdílů byla zjišťována oboustranným testem při hladině přijatelnosti rovné nebo menší než 5 %. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Imunologická účinnost N-acyl-derivátů PGM

		N hmotnost sleziny		počet Ly sleziny		PFC		PFC/ml Ly			
		t/p	t/p	t/p	t/p	t/p	t/p	t/p	t/p	t/p	t/p
příklad číslo 1											
kontrola	%	17	109,1±17,34 100	37,7±7,56 100	74,3±34,40 100	105,0±93,04 100					
PGM	%	17	111,7±10,66 102	35,1±5,06 93	82,9±31,71 112	219,1±96,98 118					
č. 1637	%	18	123,6±10,63 113	37,0±6,90 100	93,4±37,55 126	219,2±67,11 118					
příklad číslo 2											
kontrola	%	11	103,3±18,55 100	38,7±9,16 100	56,3±26,55 100	138,3±74,30 100					
PGM	%	11	107,5±9,40 104	35,0±6,01 90	76,2±32,95 135	206,9±113,24 150					2,97 0,01
kontrola	%	18	99,8±17,14 100	34,2±9,45 100	69,3±42,49 100	198,3±144,16 100					
č. 1640	%	19	113,4±22,28 114	34,1±9,56 100	95,7±28,45 138	282,1±142,64 142					1,78 0,1
příklad číslo 3											
kontrola	%	16	120,2±17,83 100	38,8±8,19 100	55,7±40,52 100	122,1±80,16 100					
PGM	%	17	138,7±11,72 115	47,2±9,53 122	88,8±72,51 159	156,1±102,78 128					
č. 1645	%	18	120,4±12,36 100	46,1±11,70 119	88,5±75,95 159	154,2±111,12 126					

Tabulka 1 (pokračování)

příklad číslo 4	16	120,2±17,83	38,8±8,19	55,7±40,52	122,1±80,16	
kontrola		100	100	100	100	
%						
PGM	17	138,6±11,72	47,2±9,52	88,8±72,50	156,1±102,78	
%		115	122	159	128	
č. 1646	17	124,4±16,54	42,1±10,55	81,6±79,80	169,9±151,32	
%		103	109	147	139	
příklad číslo 5	15	121,3±16,3	57,1±21,44	77,5±28,59	163,6±61,00	
kontrola		100	100	100	100	
%						
PGM	18	129,5±11,80	49,5±8,98	107,7±57,78	190,4±79,53	
%		107	87	139	116	
č. 1647	18	135,5±22,60	45,2±8,50	125,4±68,45	254,2±132,36	
%		112	79	162	155	2,44
						0,05
příklad číslo 6	21	128,9±14,26	38,8±8,45	47,1±28,06	105,9±54,24	
kontrola		100	100	100	100	
%						
PGM	23	134,3±13,9	43,8±8,82	56,0±23,14	117,1±48,37	
%		104	113	119	111	
kontrola	28	119,0±20,93	35,9±9,13	57,8±40,45	152,5±127,30	
%		100	100	100	100	
č. 1648	28	123,4±23,15	39,1±10,92	95,8±75,30	266,5±279,40	
%		104	109	166	175	1,95
						0,1
příklad číslo 7	18	108,4±16,71	41,2±10,28	86,1±25,80	1940±79,48	
kontrola		100	100	100	100	
%						
PGM	18	111,8±10,68	38,8±9,06	87,6±29,76	214,4±95,61	
%		103	94	102	111	
č. 1665	17	131,7±14,40	42,3±7,96	97,1±41,86	210,8±88,40	
%		121	103	113	109	

Tabulka 1 (pokračování)

příklad číslo 8	17	106,4±12,49	43,8±10,39	77,1±33,81	170,9±93,98
kontrola		100	100	100	100
%					
PGM	17	112,7±10,38	40,9±7,86	76,9±28,55	163,6±72,39
%		106	93	100	90
č. 1668	18	112,3±12,08	41,9±5,66	85,8±33,17	202,7±91,97
%		106	96	111	119
příklad číslo 9	16	117,4±18,71	45,9±10,47	69,2±23,72	139,1±50,43
kontrola		100	100	100	100
%					
PGM	18	121,6±14,54	46,7±7,99	72,8±22,20	141,4±40,57
%		104	102	105	102
č. 1700	18	125,5±19,44	42,9±9,82	76,4±24,94	163,8±52,95
%		107	94	110	118

1637	znamená sodnou sůl N-stearoyl-PGM	1640	znamená sodnou sůl N-benzoyl-PGM
1645	znamená sodnou sůl N-kapryol-PGM	1646	znamená sodnou sůl N-kaprinoyl-PGM
1647	znamená sodnou sůl N-lauroyl-PGM	1648	znamená sodnou sůl N-palmitoyl-PGM
1665	znamená sodnou sůl N-oleoyl-PGM	1668	znamená sodnou sůl N-acetyl-PGM
1700	znamená sodnou sůl N-pivaloyl-PGM	Ly	znamená lymfocyty

Statisticky významné zvýšení hmotnosti sleziny bylo zjištěno po aplikaci sodné soli N-stearoyl-PGM a sodné soli N-oleoyl-PGM (13 % a 21 % ve srovnání s kontrolními hodnotami). Relativní zvýšení hmotnosti sleziny bylo zjištěno také po použití sodné soli N-benzoyl-PGM, sodné soli N-lauroyl-PGM a sodné soli N-pivaloyl-PGM; i když rozdíly vzhledem ke kontrolním hodnotám nebyly významně zvýšeny, byla zde zřetelná tendence zlepšené účinnosti uvedených derivátů. Změny v počtech lymfocytů sleziny (absolutní počet v 1 ml) byly různé pro každý derivát. U skupiny myší, jimž byla podána sodná sůl N-lauroyl-PGM, bylo zjištěno statisticky významné snížení o 20 % ve srovnání s kontrolními hodnotami. U myší, na něž bylo působeno sodnou solí N-kapryol-PGM, bylo získáno statisticky významné zvýšení počtu lymfocytů sleziny (19 %). Po podání pivaloyl- a acetyl-derivátů bylo u myší zjištěno snížení počtu lymfocytů sleziny o 4 až 6 %, naproti tomu při aplikaci oleoyl-, kaprinoyl- a palmitoyl-derivátů PGM bylo nalezeno zvýšení o 3 až 9 %. I když byla zřejmá jistá tendence těchto získaných změn, neměly tyto změny žádnou statistickou významnost. Sodné soli stearoyl- a benzoyl-derivátů PGM neměly na počet lymfocytů sleziny žádný vliv. Prakticky všechny testované sloučeniny vykazovaly zvýšené PFC. Toto zvýšení se pohybovalo v rozmezí od 10 do 66 %, vzhledem ke kontrolním hodnotám. Statisticky významný rozdíl byl však nalezen pouze pro sodné soli N-benzoyl-, N-lauroyl-

a N-palmitoyl-derivátů PGM. Všechny použité sloučeniny zvyšovaly aktivitu PFC, jak je zřejmé z počtu lymfocytů sleziny. Tato hodnota se pohybovala v rozmezí od 9 % do 75 % ve srovnání s hodnotami nalezenými u kontrolní skupiny myší, statisticky významný rozdíl byl zjištěn u lauroyl-derivátů PGM. Zřetelně vyjádřená tendence zvýšení byla nalezena u benzoyl- a acetyl-derivátů PGM, kdy rozdíly ve srovnání s kontrolními hodnotami prakticky dosáhly statisticky významné hodnoty (0,5 menší než p menší než 0,1).

Na základě získaných výsledků lze uzavřít, že všechny studované N-acyl-deriváty monomeru peptidoglykanu vykazují jistou imunostimulační účinnost, i když se jednotlivé deriváty liší svojí efektivitou. Jedna z možných interpretací různých výsledných rozdílů v počtu lymfocytů a ve zvýšení hmotnosti sleziny by mohla spočívat v různých mechanismech účinku PGM a jeho N-acyl-derivátů, uvedených v bodech předmětu vynálezu, na buněčný imunitní systém. Jiným možným důvodem by mohla být skutečnost, že se podobají v mechanismu účinku, ale liší se svojí vnitřní účinností; vliv na humorální imunitu je zřejmý ze změn v aktivitě PFC a v jistém rozsahu se liší od vlivu na počet lymfocytů sleziny. Významný vliv na celkovou PFC aktivitu byl nalezen u benzoyl-, lauroyl- a palmitoyl-derivátů PGM, které v podstatě nemění nebo nesnižují počet lymfocytů v 1 mg tkáně sleziny.

Strukturní modifikace molekuly PGM vedou k nové a nikoliv zřejmé biologické účinnosti N-acyl-derivátů PGM, uvedených v bodech předmětu vynálezu, demonstrováných dvěma různými směry: významný vliv na imunitní odpověď buňky, charakteristický pro benzoyl- a kapryloyl-deriváty PGM; na druhé straně benzoyl-, lauroyl- a palmitoyl-deriváty byly významněji zahrnuty v humorální imunitě. Získané výsledky ukazují na nejlepší účinnost lauroyl-derivátu PGM vzhledem k jeho vlivu na buněčnou a humorální imunitu. Vedle toho vykazuje lepší účinnost ve srovnání s původním PGM, jestliže je podáván ve stejné koncentraci.

Tento vynález je islutrován následujícími příklady.

Příklad 1

Příprava sodné soli N-acetyl-PGM

K roztoku PGM (500 mg, 0,495 mmolu) ve vodě (7 ml) se přidá nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3 , 2,75 ml) a směs se v ledové lázni ochladí na 5 °C. Do ochlazené směsi se přikape anhydrid kyseliny octové (2,75 ml, 29 mmolů) a směs se míchá 24 hodin při 20 °C. Směs se zahustí odpařením za sníženého tlaku. Získá se olejovitá sraženina (0,95 g), která se rozpustí ve vodě (2,5 ml) a rozdělí na koloně naplněné 150 ml nosičem "Sephadex G-25 fine", eluce vodou. Frakce, které obsahují produkty,

se spojí a lyofilizují. Výtěžek 490 mg (92 %). Teplota tání 196 až 198 °C. UF spektrum (H₂O, max): 202 nm. IČ spektrum (KBr): 3400 až 3240, 1660, 1550 a 1410 cm⁻¹. ¹H NMR spektrum (D₂O, ppm): 1,90 s, 3H (CH₃CONH-A₂pm), 1,96 s, 3H (CH₃CO. .NH-Glc), 2,03 s, 3H (CH₃CONH-Mur). Význam zkratk je následující: A₂pm znamená diaminopimelylovou skupinu, Mur znamená muraňoylovou skupinu a Glc znamená glukosaminylovou skupinu.

Příklad 2

Příprava N-stearoyl-PGM

K roztoku PGM (1,546 mg, 1,53 mmolu) v dimethylformamidu (DMF, 26,6 ml) se přidá sukcinimidostearát (800 mg, 2,09 mmolu) a triethylamin (TEA) (0,4 ml, 2,18 mmolu). Směs se míchá dvacet hodin při teplotě 20 až 25 °C. Získá se želatinová suspence, do které se za míchání přikape ethylacetát (180 ml). Směs se míchá dalších pět hodin. Sraženina se odfiltruje a vysuší. Výtěžek 2 g. Produkt se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu (25 g), eluce rozpouštědlovým systémem A. Frakce, které obsahují produkt, se spojí a zahustí odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku. Výtěžek 1,44 g (57 %). Teplota tání: 217 až 220 °C. UF spektrum (max, H₂O): 204 nm. IČ spektrum (KBr): 3280, 2910, 2350, 1635 a 1530 cm⁻¹.

Příklad 3

Příprava N-pivaloyl-PGM

K roztoku PGM (500 mg, 0,495 mmolu) v dimethylformamidu (10 ml) se přidá sukcinimido-pivalát (137 mg, 0,688 mmolu) a triethylamin (TEA) (0,13 ml, 0,7 mmolu). Směs se míchá 24 hodin při 25 °C. Do čirého roztoku se přikape ethylacetát (50 ml) a výsledná sraženina se míchá dvě hodiny.

Sraženina se odfiltruje, promyje se ethylacetátem (dvakrát pěti ml) a vysuší. Výtěžek 550 mg. Produkt se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce rozpouštědlovým systémem A. Frakce, které obsahují produkt, se spojí a zahustí se odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku. Výtěžek 270 mg (49,8 %). Teplota tání: 202 až 204 °C. UF spektrum (max, H₂O): 201 nm. IČ spektrum (KBr): 3400, 3300, 3080, 3050, 2980, 1650 a 1540 cm⁻¹.

Příklad 4

Příprava N-oleoyl-PGM

K roztoku PGM (500 mg, 0,495 mmolu) v dimethylformamidu (9 ml) se přidá sukcinimido-oleát (258 mg, 0,679 mmolu) a triethylamin (TEA) (0,13 ml, 0,7 mmolu). Směs se míchá 24 hodin za teploty 25 °C. Potom se přikape ethylacetát (50 ml) a výsledná sraženina se míchá tři hodiny. Sraženina se odfiltruje a vysuší. Výtěžek 680 mg. Sraženina se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu,

eluze rozpouštědlovým systémem A. Frakce, které obsahují produkt, se spojí a zahustí odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku. Výtěžek: 0,345 g (54,6 %). Teplota tání 204 až 206 °C. UF spektrum (max, H₂O): 198 nm. IČ spektrum (KBr): 3300, 2950, 2875, 1640 a 1555 cm⁻¹.

Příklad 5

Příprava N-benzoyl-PGM

K roztoku PGM (1,346 mg, 1,33 mmolu) v dimethylformamidu (23,3 ml) se přidá sukcinimido-benzoát (400 mg, 1,825 mmolu) a triethylamin (TEA) (0,35 ml). Směs se míchá 24 hodin za teploty 25 °C. Přikape se 160 ml ethylacetátu a výsledná suspenze se míchá 5 hodin. Sraženina se odfiltruje, promyje se dvakrát 10 ml ethylacetátu a vysuší. Výtěžek 1,45 g. Produkt se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu, eluce rozpouštědlovým systémem A. Frakce, které obsahují produkt, se spojí a zahustí odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku. Výtěžek 1,04 g (69,1 %). Teplota tání 173 až 175 °C. UF spektrum (max, H₂O): 203 a 224 (sh) nm. IČ spektrum (KBr): 3260, 1680 a 1515 cm⁻¹.

Příklady 6 až 9

Podobným způsobem jako je popsáno v příkladech 2 až 5 byly získány následující deriváty: kapryloylový-PGM, kapri-noyl-PGM, lauroyl-PGM a palmitoyl-PGM. Základní fyzikální konstanty uvedených derivátů jsou v tabulce 2.

Tabulka 2

Základní fyzikální konstanty N-^{a/}kapryloyl-, N-kaprinoyl-,
N-lauroyl- a N-palmitoyl-derivátů PGM

N-acyl-PGM	t.t. (°C)	UF-spektrum (max, H ₂ O, nm)	IČ-spektrum (KBr, cm ⁻¹)
kapryloyl	194 až 195	203	3280, 2930, 1655, 1638, 1545
kaprinoyl	196 až 197	203	2990, 1610, 1580, 1090
lauroyl	203 až 205	204	3280, 2920, 2850, 1655, 1543
palmitoyl	205 až 208	203	3280, 2920, 2845, 1635, 1520

Příklad 10

Příprava N-stearoyl-PGM

K roztoku kyseliny stearové (284,5 mg, 1 mmol) ve směsi rozpouštědel ethylacetát - tetrahydrofuran (1 : 1, objemové díly k objemovým dílům, 25 ml) se přidá N-hydroxy-benzothiazol (HOBT) (162,2 mg, 1,2 mmolu) a DCC (247 mg, 1,2 mmolu). Směs se míchá 16 hodin při 20 až 25 °C. Získaný produkt se odfiltruje a promyje se na filtru ethylacetátem (2 x 3 ml). Matečné louhy a extrakty se spojí a za sníženého tlaku se odpaří dosucha. Surový produkt (470 mg) se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu (5 g), eluce rozpouštědlovým systémem chloroform - methanol (100 : 1, v objem. dílech).

Získá se 350 mg vyčištěného N-benztriazol-stearátu, který se rozpustí v dimethylformamidu (20 ml). K tomuto roztoku se přidá PGM (511 mg, 0,499 mmolu) a triethylamin (TEA) (0,13 ml) a směs se míchá 16 hodin při teplotě 20 až 25 °C. Získá se želatinosní sraženina, ke které se přidá ethylacetát (88 ml). Směs se míchá další hodinu. Sraženina se odfiltruje, resuspenduje se v ethylacetátu (45 ml), míchá se jednu hodinu a ještě jednou se odfiltruje a vysuší. Výtěžek 621 mg. Produkt se vyčistí chromatografií na koloně silikagelu (8 g), eluce rozpouštědlovým systémem A. Frakce, které obsahují produkt, se spojí, rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a produkt se vysuší. Výtěžek 542,5 mg (85 %). Produkt byl identický s produktem z příkladu 2.

Příklad 11

Příprava sodné soli N-stearoyl-PGM

Do vody (20 ml), v níž bylo rozpuštěno ekvimolární množství hydroxidu sodného se přidá N-stearoyl-PGM z příkladu 2 (1 276,5 mg, 1 mmol). Čirý roztok se míchá jednu hodinu a lyofilizuje se. Výtěžek 1 281 mg.

Příklad 12

Příprava sodné soli N-stearoyl-PGM

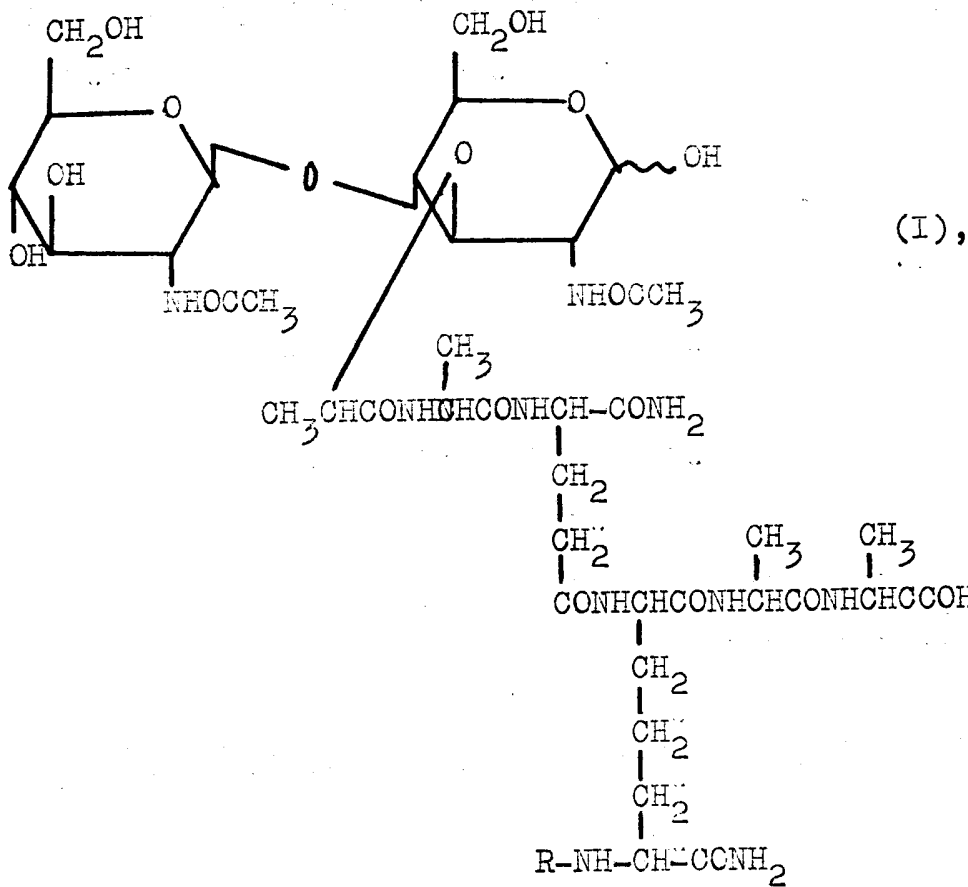
Postupem podle příkladu 2 se surový produkt, který byl

získán vysrážením ethylacetátem, suspenduje ve vodě, zneutralizuje se přidáním hydroxidu sodného na pH 7. Čirý roztok se nanese na kolonu s nosičem Sephadex G-25 fine, která se eluuje vodou. Frakce, které obsahují produkt identický s produktem získaným podle příkladu 11, se spojí a lyofilizují.

Podobným způsobem jako v příkladech 11 a 12 byly získány další farmaceuticky přijatelné soli.

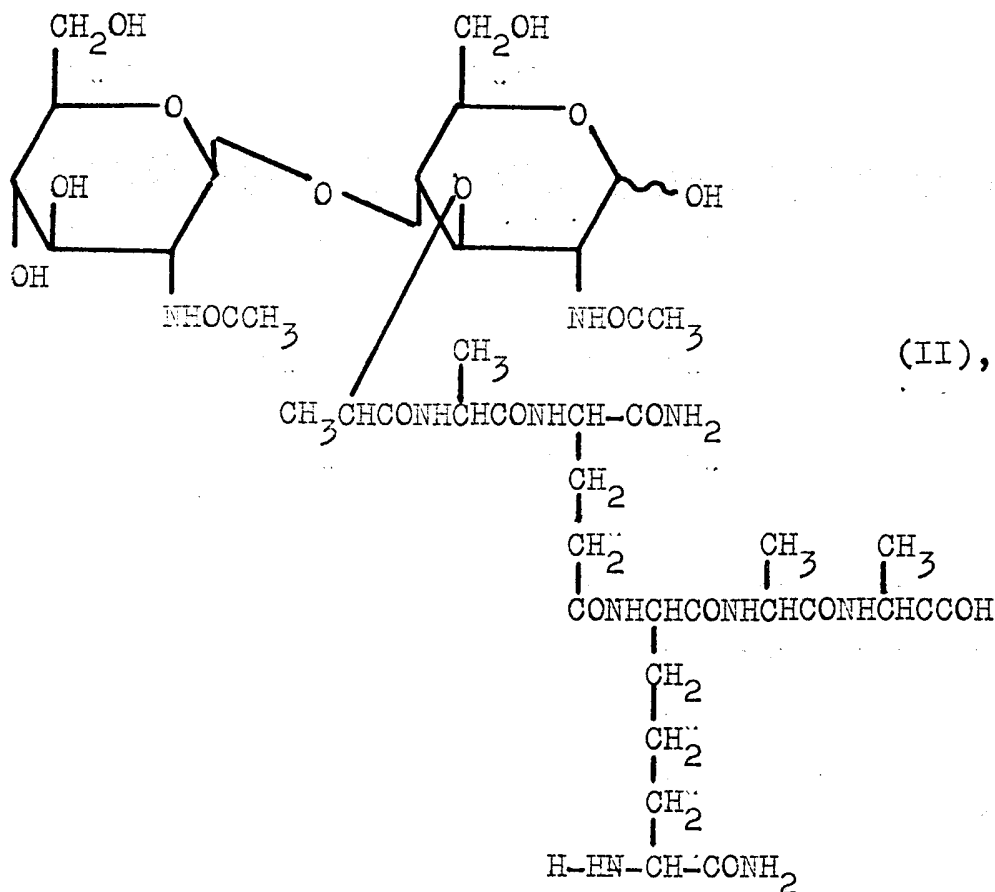
P A T E N T O V E N A R O K Y

1. Způsob přípravy N-acyl-derivatu mGncMeru peptido-glykanu obecného vzorce I



v němž R znamená acylovou skupinu alkytkarboxylové kyseliny s přímým řetězcem se 2 až 18 atomy uhlíku, alkytkarboxylové kyseliny s větveným řetězcem s 5 až 18 atomy uhlíku, nenasycené alkenylkarboxylové kyseliny s 12 až 18 atomy uhlíku nebo aromatické karboxylové kyseliny se 7 až 12 atomy uhlíku, a jejich farmaceuticky přijatelných solí, vyznačující se tím, že PGM obecného vzorce II

PŘÍL. PRO VYHLEDÁNÍ A OBJEVY	URÁD PRO VYHLEDÁNÍ A OBJEVY	30 V 90	024491	51



se acyluje reakcí s kyselinou obecného vzorce III



v němž R znamená jako v obecném vzorci I,
za přítomnosti báze, při čemž kyselina je v aktivované formě.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že kyselina obecného vzorce III je ve formě anhydridu nebo esteru.

Zastupuje:

~~PATENTSERVIS~~
~~PRAHA~~

Amal