

1745/94

KÖZZÉTÉTEL
70743
PÉLDANY

Glikozilezett szteroid származékok

és ezeket hatóanyagként
tartalmazó
gyógyszerkészítmények

THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY,

Princeton, NJ, Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés napja: 1994. 06. 10.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/ US92/10778

Elsőbbsége: 1991. 12. 13. (806 985) US

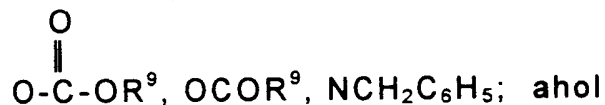
A nemzetközi közzététel száma: WO 93/11772

KIVONAT

A találmány tárgya új (Ia) általános képletű glikozilezett szteroid származékok és mindezek gyógyászatilag elfogadható sói, biológiai membránok permeabilitásának fokozására.

Az (Ia) általános képletben

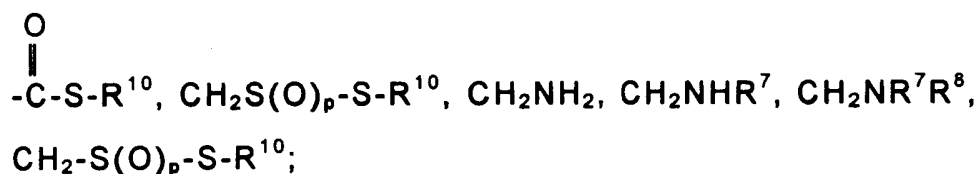
A jelentése O, OH, OR⁶, NR⁷R⁸, N₃, NHCOR⁷, OCOAr,



Ar jelentése fenilcsoport, vagy halogénatommal, C₁-C₁₂ alkilcsoporttal vagy C₁-C₃ alkoxycsoporttal egy-háromszorosan helyettesített fenilcsoport;

a jelentése (α)- vagy (β)-konfigurációjú egyszeres kötés, azzal a megkötéssel, hogy amennyiben A jelentése oxigénatom, úgy a jelentése kettős kötés;

R⁵ jelentése CO₂R¹⁰, CH₂OR⁹, CONH₂, CONHR⁷, CONR⁷R⁸,



R^6 jelentése egy 1-10 monoszacharidból álló glikozil-rész, amelynek mindegyik monoszacharid egységében az anomer szénatomokon a glikozides kötés konfigurációja egymástól függetlenül (α) vagy (β);

R^7 és R^8 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, C_1 - C_4 alkilcsoport, C_3 - C_7 cikloalkilcsoport, C_4 - C_{10} alkil-cikloalkil-csoport, fenil-, benzilcsoport vagy R^7 és R^8 együttesen egy $(\text{CH}_2)_f$ képletű csoportot képeznek, ahol f értéke 3 - 6;

R^9 jelentése hidrogénatom vagy C_1 - C_3 alkilcsoport;

R^{10} jelentése hidrogénatom, C_1 - C_{10} alkilcsoport, C_1 - C_{10} alkenilcsoport, C_1 - C_{10} alkinilcsoport, fenil- vagy benzilcsoport;

p jelentése 0, 1 vagy 2;

n jelentése 0, 1 vagy 2.

A találmány e vegyületek előállítására is vonatkozik.

A találmány szerinti vegyületek más, profilaktikus, preventív vagy terápiás szempontból jelentős vegyületek biológiai membránokon való átjutását segítik elő.

A találmány szerinti vegyületek a másik vegyülettel összekeverve vagy azzal képzett konjugátum formájában alkalmazhatók.



1795/93

KÖZZÉTÉTEL
FELDANI

234 1 1
A

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Budapest

Glikozilezett szteroid származékok

és ezeket hatóanyagként
tartalmazó
gyógyszerkészítmények

THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY,

Princeton, NJ, Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

KAHNE, Daniel Evan, Princeton, NJ

WALKER KAHNE, Suzanne, Princeton, NJ

Amerikai Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés napja: 1994. 06. 10.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/ US92/10778

Elsőbbsége: 1991. 12. 13. (806 985) US

A nemzetközi közzététel száma: WO 93/11772

Aktaszám: 79733-5303-SZŐ/KmO

A találmány tárgya új glikozilezett szteroid-származékok, molekuláknak biológiai membránokon és vér-agy gáton át történő transzportjának elősegítésére. A találmány tárgyát képezi továbbá új glikozilezési eljárás e glikozil-szteroid-származékok hatékony előállítására.

A kívánt biológiai válasz kiváltásához egy diagnosztikus, profilaktikus vagy terápiás szempontból érdekes molekula (a továbbiakban "terápiás szempontból jelentős molekula" vagy "terápiás szempontból jelentős vegyület") a hatóhelyen hatékony koncentrációban kell, hogy jelen legyen. A terápiás szempontból jelentős vegyület hatóhelyen elért végső koncentrációját számos tényező határozza meg, így az adagolt mennyiség, a vegyület felszívódásának, eloszlásának, biotranszformációjának és kiválasztásának mértéke és sebessége [lásd: Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th Edition, MacMillan Publishing Co., Inc., New York, 1980, propoxi. 1-39]. E tényezőket ráadásul befolyásolhatja az adagolási mód is.

A terápiás szempontból jelentős vegyületeket leggyakrabban parenterálisan (intravénásan, szubkután és intramuszkulárisan) és enterálisan (orálisan bevitel) adagolják, habár bőrön vagy nyálkahártyán át (orális, nazális, rektális, vaginális stb.) történő adagolási módok is ismeretesek. A parenterális adagolási módokat általában különösen hatékony adagolási formáknak tekintik, amelyek révén számos terápiás szempontból jelentős vegyület gyors vérszint növekedése érhető el. A parenterális módszerek előnyösek abban is, hogy megkerülik az elsődleges (idegen kifejezéssel first passage) máj-metabolizmust. Egy terápiás szem-

pontból jelentős vegyület parenterális adagolása azonban okozhat fájdalmat, irritációt, hosszú idő alatt esetleg szöveti károsodást, továbbá magában hordozza fertőzés lehetőségét is. Ráadásul a parenterális adagolási módszerek gyakran kényelmetlenek, különösen azok a módszerek, amelyek alkalmazása egészségügyi személyzetet igényel (így például intravénás adagolás).

Az enterális adagolási módszerek könnyebben kivitelezhetők, mint a parenterális módszerek és általában gazdaságosabbak, valamint a kezelt egyén által is jobban elviselhetők. Orálisan adagolt terápiás szempontból jelentős vegyületek felszívódása azonban lehet nem kielégítő mértékű és vészhelyzetben való hatékony alkalmazásukat a bejuttatás és felszívódás közötti időszak meggátolhatja. Ezen túlmenően, számos terápiás szempontból jelentős vegyület orálisan nem is adagolható, minthogy azelőtt, hogy a hatóhelyet elérnék, elbomlanak emésztő enzimekkel, sával és felületaktív fehérjékkel a bélben végbemenő kölcsönhatásuk révén. Más terápiás szempontból jelentős vegyületek a nagymértékű elsődleges máj-metabolizmus miatt válnak hatástalanná az orális adagolást követően.

Hosszabb ideje folynak kutatások nem-parenterális módszerek irányában, amelyek a gyógyszerkészítmények bélben való bomlékonyságát és az elsődleges máj-metabolizmust kiküszöbölik. Ezek között dolgozták ki a transzdermális, orális nyálkahártyán át történő, rektális és nazális adagolási módszereket. Ilyen módszer az is, amikor a terápiásan jelentős vegyületet orálisan adagolják, de a vegyületet egy védő gyógyszer-bejuttató rendszerbe foglalják, amelyből a hatóanyag egy előre meghatározott

ponton az alsó gyomor-bélrendszere szakaszban válik szabaddá. Ezeknek az alternatív adagolási módszereknek a hatékonyságát azonban gyakran behatárolja a terápiásan jelentős vegyületnek az eljuttatás vagy alkalmazás helyén való gyenge felszívódása. Ismertek hatékony stratégiák, amelyek terápiás szempontból jelentős vegyületek sejtmembránokon át történő abszorpcióját fokozzák, és az adagolási módtól függetlenül gyengén felszívódó gyógyszerkészítmények hatékonyságát növelni képesek. Ilyen, a transzmembrán abszorpció fokozására alkalmas stratégiák különösen hasznosak lehetnek bőr- és nyálkahártyaszöveteken, beleértve a gasztrointesztinális, urogenitális és légzőszervi rendszerek nyálkahártya-szövetét, át adagolt terápiásan jelentős vegyületek esetében.

A biológiai membránok alap szerkezeti egysége egy foszfolipid típusú kettős réteg, amelybe különféle méretű és összetételű fehérjék vannak beágyazva. A foszfolipid kettős réteg azon felszíne, amely a vizes celluláris környezet felé néz, a foszfolipidek hidofil fejrészéből tevődik össze; míg a belső rész felé néző részt hidrofób zsírsav acil részletek képezik. A membrán fehérjék transzport folyamatokban vehetnek részt és celluláris regulációs mechanizmusok receptoraiként szolgálhatnak.

A biológiai membránokon való átjutás diffúzióval, facilitált diffúzióval, aktív transzporttal, receptor által szabályozott endocitózis és pinocitózis révén. A passzív diffúzió kisméretű, zsíroldékony molekulák esetében a leghatékonyabb. A biológiai membránok azonban gyakorlatilag nem-áteresztők (impermeábilisak) a legtöbb vízóldékony molekula, például nukleozidok, amino-

savak, fehérjék és más hidrofil, terápiásan jelentős vegyület számára. Az ilyen típusú vegyületek valamilyen vivőanyag (karrier) által szabályozott transzport rendszer közvetítésével jutnak be a sejtbe, amikor is specifikus egységek könnyítik meg a membránon való átjutást. A természetes karrierok jelentősége a membránon való átjuttatás elősegítése szempontjából azonban csekély, mivel e rendszerek csak meghatározott molekula-elrendeződés esetén működnek. Számos terápiás szempontból jelentős vegyület abszorpciója nem kielégítő, minthogy lipofilitásuk nem elegendő a sejtmembránon passzív diffúzióval történő átjutáshoz, és természetes transzport rendszerek sem ismerik fel azokat.

A terápiás szempontból jelentős vegyületek biológiai membránokon való átjutásának fokozására irányuló eddig tanulmányozott stratégiák két nagy osztályba sorolhatók. Az elsőbe mindazok a stratégiák tartoznak, amelyekben a terápiás szempontból jelentős vegyületet módosítják vagy magának a vegyületnek a lipofilitását megnövelve vagy azt egy olyan egységhez hozzákapcsolva, amelynek membránnal való kölcsönhatása ismert. E stratégiák közös célja abban áll, hogy a membránon át történő passzív diffúziót fokozzák a diffúzió energia gátjának csökkentése és/vagy a vegyület membrán-felszíni lokális koncentrációjának növelése révén. Ezekhez a stratégiákhoz sorolható az a megközelítés is, amikor a terápiás szempontból jelentős vegyületet olyan rendszerekhez kapcsolják, amelyekről ismert, hogy kölcsönhatásba lépnek a biológiai membránokban működő transzport mechanizmusokkal; a cél ilyenkor a transzport mechanizmus (aktív vagy facilitált transzport vagy receptor által szabályozott

endocitózis) előnyeinek kihasználásával a vegyület membránon való átjuttatásának fokozása.

Sokan tanulmányozzák a megvalósíthatóságát annak, hogy egy hidrofil vegyület membránon való átjutását úgy fokozzák, hogy azt egy olyan rendszerhez kapcsolják, amelyről ismert, hogy a foszfolipid membránnal kölcsönhatásba tud lépni. Így többek között leírtak oligonukleotid-koleszterin konjugátumokat [Letsinger RL és munkatársai, "Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: Synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556 (September 1989); Stein CA és munkatársai, "Mode of Action of 5'-Linked Cholesteryl Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides in Inhibiting Syncytia Formation and Infection by HIV-1 and HIV-2 in Vitro." Biochemistry 30: 2439-2444 (1991)].

Molekulák agyba való irányítása szükségessé teszi a vér-agy gáton való átjutást (a vér-agy gát olyan kapilláris rendszer, sajátos morfológiai jellemzőkkel, amely a rendszert elhatároló membránnak tekinthető; a membrán az agy intersticiális részét választja el a vértől). A biológiai membránokhoz hasonlóan a vér-agy gát is viszonylag impermeábilis számos hidrofil, terápiás szempontból jelentős vegyülettel szemben. Az agyba való irányításra kifejlesztett stratégiák között vannak közvetlen bejuttató módszerek invazív eljárások vagy hipertóniás anyagok intraartériás infúziója révén, és olyan módszerek, amikor a hidrofil vegyületet lipid-oldékony rendszerekké alakítják át. Facilitált transzportra irányuló újabb törekvés, amelyet a 4 902 505. sz. amerikai egyesült

államokbeli szabadalmi leírás ismerteti, szerint egy bejuttatandó peptidet egy olyan peptid karrierhez kapcsolnak, amely képes önmagában a gáton való átjutásra receptor által szabályozott transzcitózis révén.

A bejutást fokozó stratégiák másik csoportját azok képezik, amelyek értelmében a terápiás szempontból jelentős vegyületeket más, ismert membrán permeabilizáló képességgel bíró vegyületekkel együtt adagolják meghatározott testfelületekre. Így például, megkísérelték az inzulint olyan adjuváns szerekkel, például epe-sókkal, összekeverni, amelyek az inzulin nazális felszívódását növelhetik [Hirai és munkatársai, *Int. J. Pharmaceutics* 9: 165-184 (1981); Hirai és munkatársai, *Diabetes* 27: 296-199 (1978); 1,527,506 sz. nagy-britanniai és 4,153,689. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások; és Pontiroli és munkatársai, *Br. Med. J.* 284: 303-386 (1982)]. A 0 444 778. számú európai szabadalmi leírásban ismertetik alkil-szacharidok alkalmazását helyileg alkalmazott hatóanyagok penetrációjának fokozására nyálkahártyával borított epitél szövetekbe általában, különösen pedig szaruhártya epitél szövetbe. A 4 856 848. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban répacukor észterek, különösen répacukor-monolaurát, alkalmazását transzdermálisan bejuttatandó hatóanyagok transzdermális fluxusának növelésére igénylik. A 4 746 508. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik fuzidinsav és cefalosporin-származékok alkalmazását humán és állati testfelületek hatóanyagokkal szembeni permeabilitásának fokozására.

Ismeretes, hogy a találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékok foszfolipid membránokkal kölcsönhatásba lépnek, s ezáltal terápiás szempontból jelentős vegyületek penetrációját ilyen típusú membránokon, ide tartoznak a biológiai membránok is, keresztül fokozzák. Más, korábban alkalmazott adjuváns szerekhez és bejutást növelő szerekhez (például epesavhoz és fuzidinsavhoz) hasonlóan a találmány szerinti új származékok ampifil tulajdonságú anyagok faciális értelemben. A találmány szerinti új szteroid-származékok azonban jelentősen eltérő szerkezettel rendelkeznek, mivel hidrofil felszínükön glikozilcsoportokat tartalmaznak, és e tekintetben különböznek valamennyi korábban ismert faciálisan ampifil szteroidtól. Azt találtuk, hogy a hidrofil felszín glikozilezése jelentősen megváltoztatja mind a szteroidok oldhatóságát, mind asszociációjuk módját. Megállapítottuk, hogy e glikozilezett szteroidok mesterséges és biológiai membrán permeabilizáló képessége hatékonyabb, mint a megfelelő nem-glikozilezett szteroidoké. Így a találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékokat terápiásan jelentős vegyületek sejtmembránokon való átjuttatásának növelésére alkalmazhatjuk, vagy a vegyületekkel összekeverve vagy a vegyületekkel képzett konjugátumok formájában.

Korábban nem állt rendelkezésre eljárás valamennyi találmány szerinti glikozilezett szteroid származékok szintézisére. Számos, triglikozidokat alkalmazó glikozilezési reakciót írtak le [Ferrier RJ és munkatársai, "A Potentially Versatile Synthesis of Glycosides." Carbohydrate Research 27: 55-61 (1973); Garegg PJ és munkatársai, "A reinvestigation of glycosidation reactions

using 1-thioglycosides as glycosyl donors and thiophilic cations as promoters." Carbohydrate Research 116: 162-5 (1983); Nicolaou KC és munkatársai, "A Mild and General Method for the Synthesis of O-Glycosides." J. Am. Chem. Soc. 105: 2430-2434 (1983); Lonn H. "Synthesis of a tri- and a hepta-saccharide which contain α -L-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins." Carbohydrate Research 139: 105-113 (1985); Andersson F. és munkatársai "Synthesis of 1,2-cis-linked glycosides using dimethyl(methylthio)sulfonium triflate as promoter and thioglycosides as glycosyl donors." Tetrahedron Letters. 3919-3922 (1986); Brown DS és munkatársai, "Preparation of cyclic ether acetals from 2-benzenesulphonyl derivatives: a new mild glycosidation procedure." Tetrahedron Letters 29/38: 4873-4876 (1988); Ito Y. és munkatársai "Benzeneselenenyl triflate as a promoter of thioglycosides: a new method for O-glycosylation using thioglycosides." Tetrahedron Letters propoxi. 1061-4 (1988); Dasgupta F. és munkatársai, "Alkyl sulfonyl triflate as activator in the thioglycoside-mediated formation of β -glycosidic linkages during oligosaccharide synthesis." Carbohydrate Research 177: c13-c17 (1988)]. Azonban e módszerek egyikében sem alkalmaztak glikozilező ágensként glikozil-szulfoxidot.

Egy aktivált glikozilezett szulfoxid intermedier alkalmazását szteroidok glikozilezésére korábban mi írtuk le [lásd J. Am. Chem. Soc. 111: 6881-2 (1989)]; e publikációnkat leírásunkba referenciaként foglaljuk bele. Mindazonáltal, az említett módszer csupán előzetes eredménynek számít az (I) általános képletű szteroidok

glikozilezésével kapcsolatban. Megállapítottuk további kísérletek elvégzése alapján azokat az egyedi reakciókörülményeket, amelyek az (I) általános képletű glikozilezett vegyületek hatékony és sztereoszelektív szintéziséhez szükségesek. A reakcióban alkalmazott oldószer kritikus szerepet játszik a glikozilezés sztereoszelektivitása szempontjából. Nem-poláris, aprotikus oldószer az (α)-glikozid kötés képződésének irányába növeli a szelektivitást, míg poláris, aprotikus oldószer, például propionitril, a szelektivitást a (β)-glikozid kötés képződése irányába fokozza. A glikozilezéshez alkalmazott szulfoxid vegyület típusa szintén befolyásolja a reakció kimenetét. Így például, jó hozamú β -szelektivitás eléréséhez lényeges, hogy távozó csoportként para-metoxifenil-szulfoxidot alkalmazzunk. Az (α)- vagy (β)-glikozid kötést eredményező glikozilezési reakció hozamát szintén növelhetjük, ha a glikozilezési reakcióban egy ekvivalensnél kevesebb triflik-anhidridet alkalmazzunk.

Végül, a glikozilcsoport donorbán lévő védőcsoportok is befolyásolják a glikozilezési reakció sztereokémiáját. Amennyiben a glikozil donorbán védőcsoportként pivaloilcsoportot alkalmazzunk, úgy csak β -glikozid kötés létesül a glikozilezési reakcióban, tekintet nélkül arra, hogy aprotikus, nem-poláris vagy aprotikus, poláris oldószert alkalmazzunk a reakcióban.

Az ismertetett tényezőket együtt értékelve kitűnik, hogy az adott területen jártas szakember sem oldotta volna meg a találmány tárgyát képező feladatot további részletes kísérletezés nélkül.

A találmány lényegét az alábbiakban foglaljuk össze.

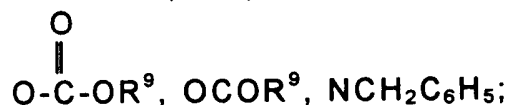
A találmány általánosságban új, faciálisan-ampifil, glikozilezett szteroid-származékokra vonatkozik, amelyek mind vizes közegben, mind membrán-jellegű közegben oldódnak. Ez az egyedülálló oldódási sajátság lehetővé teszi, hogy a glikozilezett szteroid-származékok más molekulák biológiai membránokon és vér-agy gáton át történő transzportját elősegítsék. Így a találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékokat használhatjuk, vagy a terápiás szempontból jelentős molekulával összekeverve vagy ilyen molekulával képzett konjugátum formájában a molekulának testfelszíneken, így - korlátozás nélkül - bukkális, szublinguális, szaruhártya, rektális, gyomor, bél, méhnyálkahártya (endometriális), nyaki, vaginális vagy vastagbél epitéliumon; továbbá szájgarat, fülcsatorna, légzőszervi traktus, orrgarat, húgycső, húgyhólyag és középfül membránon keresztül juttatásának növelésére. Egy másik megoldás szerint a találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékokat adagolhatjuk összekeverve a glikozilezett szteroid-származék terápiás szempontból jelentős vegyülettel képzett konjugátumával (glikozilezett szteroid-származék/terápiásan jelentős vegyület, továbbiakban "származék-vegyület-konjugátum") a felületen vagy membránon át történő transzport további növelésére vagy megkönnyítésére.

A találmány további szándéka szerint, a találmány szerinti új glikozilezett származékokat alkalmazhatjuk antivirális szerek, szisztémás inszekticidek és herbicidek növényi felszíneken való átjuttatására; valamint kontakt inszekticidek és miticidek (atkaölő szerek) ízeltlábúak testfelszínén való átjuttatására.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás új, faciálisan ampifil, glikozilezett szteroid-származékok és más glikozilezett szteroid-származékok előállítására.

Különösen érdekesek az (I) általános képletű szteroid-származékok, ahol a képletben

A jelentése O, OH, OR⁶, NR⁷R⁸, N₃, NHCOR⁷, OCOAr,



Ar jelentése fenilcsoport, vagy halogénatommal, C₁-C₁₂ alkilcsoporttal vagy C₁-C₃ alkoxicssoporttal egy-háromszorosan helyettesített fenilcsoport;

a jelentése (α)- vagy (β)-konfigurációjú egyszeres kötés, azzal a megkötéssel, hogy amennyiben A jelentése oxigénatom, úgy a jelentése kettős kötés;

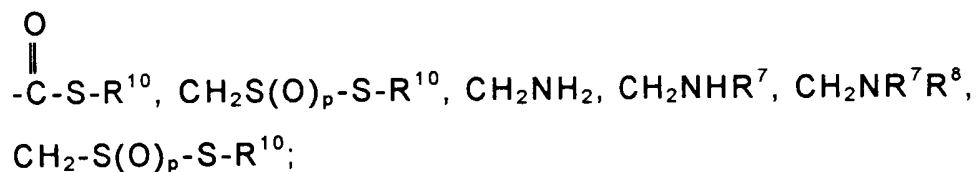
R¹ jelentése hidrogénatom, amelynek R² csoportra vonatkozott térhelyzete cisz- vagy transz;

R² jelentése metilcsoport;

R³ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, vagy OR⁶ képletű csoport;

R⁴ jelentése hidrogénatom, hidroxilcsoport, vagy OR⁶ képletű csoport;

R⁵ jelentése CO₂R¹⁰, CH₂OR⁹, CONH₂, CONHR⁷, CONR⁷R⁸,



R⁶ jelentése egy monoszacharid, amelyben az anomer szénatomon a glikozides kötés konfigurációja (α)- vagy (β); vagy 2-

-10 monoszacharidból álló oligoszacharid, amelynek mindegyik monoszacharid egységében az anomer szénatomokon a glikozides kötés konfigurációja egymástól függetlenül (α) vagy (β);

R^7 és R^8 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, C_1-C_4 alkilcsoport, C_3-C_7 cikloalkilcsoport, C_4-C_{10} alkil-cikloalkil-csoport, fenil-, benzilcsoport vagy együttesen $(CH_2)_f$ képletű csoport, ahol f értéke 3 - 6 közötti egész szám;

R^9 jelentése hidrogénatom vagy C_1-C_3 alkilcsoport;

R^{10} jelentése hidrogénatom, C_1-C_{10} alkilcsoport, C_1-C_{10} alkenilcsoport, C_1-C_{10} alkinilcsoport, fenil- vagy benzilcsoport;

monoszacharid jelentése egy adott esetben védett hexóz vagy dezoxihexóz, ahol a hexóz, illetve dezoxihexóz jelentése D- vagy L-allóz, D- vagy L-altróz, D- vagy L-glükóz, D- vagy L-mannóz, D- vagy L-gulóz, D- vagy L-idóz, D- vagy L-galaktóz, vagy D- vagy L-talóz; egy adott esetben védett furanóz vagy dezoxifuranóz, ahol furanóz, illetve dezoxifuranóz jelentése D- vagy L-ribóz, D- vagy L-arabinóz, D- vagy L-xilóz, vagy D- vagy L-lixóz; és a hexóz vagy furanóz hidroxilcsoportjainak védőcsoportja benzil-, pivaloilcsoport, trimetil-szilil-csoport, terc-butil-dimetil-szilil-csoport, terc-butil-difenil-szilil-csoport, triizopropil-szilil-csoport, acetyl-, tetrahidropiranil-csoport, benzoilcsoport, C_1-C_3 alkilcsoport, izopropilidén-, benzilidén-csoport, (2-metoxi-etoxi)-metil-csoport, ortoészter-csoport, p-metoxi-benzil-csoport és allilcsoport lehet;

p jelentése 0, 1 vagy 2;

n jelentése 0, 1 vagy 2;

továbbá mindezek gyógyászatilag alkalmas sói.

Érdekesek továbbá azok a konjugátumok, amelyekben egy terápiás szempontból jelentős vegyület egy (I) általános képletű vegyülethez van hozzákapcsolva bármelyik R^5 csoporton keresztül,

ahol a terápiás szempontból jelentős vegyületek lehetnek - korlátozás nélkül - például polién típus antibiotikumok, így például eritromicin, béta-laktám típusú antibiotikumok, és peptid-típusú vagy szteroid antibiotikumok; antifungális szerek, például 10-tiasztearinsav és 24-tiakolesztanol; peptidek vagy fehérjék, például regulációs faktorok, enzimek, antitestek, hormonok és toxinok; nukleotidok, nukleozidok és nukleinsavak; és szacharidok; és

ahol az (I) általános képletű képletben a szteroid váz A és B gyűrűjének egymáshoz viszonyított helyzete cisz- vagy transz, és a C-7 és C-12 atomokon az O-glikozid-kötés konfigurációja egymástól függetlenül (α) vagy (β).

A találmány tárgya eljárás bármilyen terápiásan jelentős vegyület biológiai membránon át történő transzportjának elősegítésére vagy egy találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékkal képzett keverék vagy származék-vegyület-konjugátum formájában.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás egy származék-vegyület-konjugátum transzmembrán transzportjának további növelésére olyan módon, hogy a származék-vegyület-

-konjugátumot egy találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékkal - amely lehet azonos vagy különböző a konjugátumot képező származékkal - képzett keverék formájában adagoljuk.

A találmány továbbá vonatkozik gyógyászati készítményekre, amelyek tartalmazznak:

1) egy (I) általános képletű vegyület hatásos mennyiségét és egy alkalmas gyógyászati vivőanyagot;

2) egy (I) általános képletű vegyület hatásos mennyiségét, egy terápiás szempontból jelentős vegyület hatásos mennyiségét és egy alkalmas gyógyászati vivőanyagot;

3) egy származék-vegyület-konjugátum hatásos mennyiségét és egy alkalmas gyógyászati vivőanyagot; vagy

4) egy (I) általános képletű vegyület hatásos mennyiségét, egy származék-vegyület-konjugátum hatásos mennyiségét és alkalmas gyógyászati vivőanyagot.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás (I) általános képletű glikozilezett szteroid-származékok hatékony szintézisére, olyan módon, hogy

a) egy védett glikozidot - amelyet egy cukor átalakítására alkalmas, a szakember számára jól ismert, szokásos módszerrel állítunk elő -, ahol a cukor valamennyi pozíciójában, kivéve az anomer pozíciót, az oxigénatomokat azonos vagy különböző védőcsoporttal védjük,

b) egy -S-R egységgel, ahol R jelentése C_1-C_{10} alkilcsoport, piridil-, furil-, tienil-, fenilcsoport vagy 1-3 halogénatommal, C_1-C_3 alkilcsoporttal, nitrocsoporttal, C_1-C_3 alkoxycsoporttal helyettesí-

tett fenilcsoport, szokásos körülmények között reagáltatunk, és a kapott védett tio-glikozidot

c) m-klór-perbenzoesavval reagáltatjuk, majd a kapott megfelelő szulfoxid-származékból

d) egy triflátot tartalmazó vegyülettel, például triflikanhidriddel, metil-trifláttal vagy trimetil-szilil-trifláttal, egy aktivált glikoziláló intermediert képezünk, amelyet

e) egy szteroiddal - amelyben a nem-glikozilezendő oxigén-atomokat előzőleg szokásos módszerekkel védjük -, 2,6-di(terc-butil)-4-metil-piridin jelenlétében, (α),(α) glikozid-kötés létesítésére toluolban, vagy (β),(β) glikozid-kötés létesítésére propionitrilben reagáltatunk, majd a kapott védett glikozilezett szteroid-származékból a védőcsoportokat

(f) szokásos módszerekkel eltávolítjuk.

A szintézist az I. reakcióvázlaton mutatjuk be.

Oxigén-védőcsoportokként vagy elektronszívó csoportokat, például észtercsoportokat, vagy elektronküldő csoportokat, például étercsoportokat, így alkil-, szilil-, fenil- vagy benzil-étereket alkalmazhatunk. Amennyiben védőcsoportként pivaloil-észter-csoportot alkalmazunk, úgy a létesülő glikozid-kötés konfigurációja (β),(β) függetlenül az alkalmazott oldószertől.

A találmány szerinti vegyületeket jellemezhetjük ^1H és ^{13}C -NMR spektroszkópiával, nagyfelbontású tömegspektroszkópiával, röntgen-krisztallográfiával és vékonyréteg-kromatográfiával.

A találmány tárgyát képezi eljárás a találmány szerinti új származék-vegyület-konjugátumok előállítására.

Biológiai membránok permeabilitását fokozó képességük alapján előnyösek azok az (I) általános képletű vegyületek, ahol a képletben

A jelentése OH, $\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{OR}^9$, OCOC_6H_5 , $\text{OCOC}_6\text{H}_5\text{-pOMe}$, NH_2 ;

a jelentése egyszeres kötés;

R^3 jelentése OR^6 képletű csoport,

R^4 jelentése OR^6 képletű csoport,

R^5 jelentése CO_2R^{10} , CONR^7R^8 ,

R^6 jelentése egy monoszacharid, amelyben a glikozid-kötés konfigurációja az anomer szénatomon (α) vagy (β);

monoszacharid jelentése egy adott esetben védett hexóz, például D- vagy L-glükóz, ahol a védőcsoport benzil- vagy pivaloilcsoport lehet.

Biológiai membránok permeabilitását fokozó képességük alapján előnyös vegyületek az alábbiak:

- (a) 3α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükozil-kólsav-metil-észter;
- (b) 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükozil-kólsav;
- (c) 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükozil-kólsav-metil-észter;
- (d) 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükozil-25-triptofanil-kólsav;
- (e) 3α -etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükozil-kólsav-metil-észter;
- (f) 3α -O-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükozil-kólsav-metil-észter,

- (g) 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter,
- (h) 3α -O-benzoil-cisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter,
- (i) 3α -hidroxí-cisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav;
- (j) 3α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter,
- (k) 3α -hidroxí-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav.

Különösen előnyös vegyület a fenti (g) vegyület, kémiai neve: 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter, és sav formája, kémiai neve: 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav.

Az ábrákhoz az alábbi magyarázatokat fűzzük:

1. ábra: CME, egy találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származék tiasztearinsav antifungális ágens hatékonyságát növelő hatása grafikus ábrázolásban,
2. ábra: CME, egy találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származék tiakolesztanol antifungális ágens hatékonyságát növelő hatása grafikus ábrázolásban,
3. ábra: CDE, amely a CME nem-glikozilezett változata, növelő hatásának hiánya tiakolesztanol hatékonyságára grafikus ábrázolva.

A találmányt részletesen az alábbiakban ismertetjük.

Diagnosztikus, profilaktikus vagy terápiás szempontból érdekes molekulák testfelszíneken való átjuttatása és/vagy sejtekbe

való bejuttatása szükségessé teszi egy vagy több szemipermeábilis biológiai membránon való átjutásukat. A találmány szerinti vegyületek alkalmasak biológiai membránok permeabilizálására (átjárhatóságuk fokozására) és ily módon elősegítik terápiás szempontból jelentős vegyületek testfelszínen és/vagy membránon való átjutását. A találmány egyik kiviteli módja szerint a terápiás szempontból jelentős vegyületet egy találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékkal összekeverve adagoljuk. Egy másik kiviteli mód szerint a felületen és/vagy membránon át a transzportot úgy segítjük elő, hogy a terápiás szempontból jelentős vegyületet egy származék-vegyület-konjugátum formájában adagoljuk, ahol a konjugátumban a vegyületet a glikozilezett szteroidhoz konjugáljuk, vagyis R^5 a terápiásan jelentős vegyülethez kapcsolódik. Eljárhatunk továbbá úgy is, hogy a származék-vegyület-konjugátumot egy találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékkal összekeverve adagoljuk; ez esetben a glikozilezett szteroid lehet azonos a konjugátumban lévő szteroid-származékkal, de attól eltérőt is alkalmazhatunk.

A találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékok várhatóan számos különféle vegyület terápiás hatékonyságát növelik. Következésképpen a találmány szerinti vegyületek számos terápiás alkalmazása lehetséges. Membrán-permeábilis terápiás ágensek sokféle betegség kezelésére alkalmazhatók, így például AIDS és más krónikus vírus-fertőzések, rákbetegségek, bakteriális és fungális fertőzések, valamint metabolikus betegségek, például lupusz, diabétesz és reumatoid artritisz kezelésére.

Úgy véljük, hogy a találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékok biológiai membránokkal való kölcsönhatásának és/vagy biológiai membránokat permeabilizáló képessége a vegyületek faciális amfifil jellegéből ered. E származékok glikozilezett felülete hidrofil, míg a nem-glikozilezett felszín hidrofób. A faciálisan amfifil szerkezet meglepő tulajdonságokkal ruházza fel a molekulákat, ideértve önasszociációs készségüket mind hidrofób, mind hidrofil környezetben, valamint amfifil érintkezési felületeken való rendeződésüket. Megállapítottuk, hogy bizonyos találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékok rétegekben kristályosodnak, amikor is hidrofób és hidrofil rétegek váltogathatják egymást. Ezzel szemben, a nem-glikozilezett eredeti szteroid vegyületek, bár bizonyos faciális amfifillicitást mutatnak, nem kristályosodnak egyenletesen és szervezett rétegekben úgy mint a glikozilezett szteroidok. Ráadásul a glikozilezett szteroidok oldékonysága lényegesen különbözik a megfelelő nem-glikozilezett vegyületek oldékonyságától. Közelebbről, a találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékok, míg vizes közegben az eredeti vegyületeknél jobban oldódnak, meglepő módon, szerves közegben oldhatóságuk nem jelentősen rosszabb. E megfigyelések alapján úgy gondoljuk, hogy a találmány szerinti új glikozilezett szteroid-származékok azáltal permeabilizálják a membránokat, hogy önasszociációval parányi, fordított micellákat képeznek, úgy, hogy a membránokon belül hidrofób felszínük a lipidek felé néz. E fordított micellák működhetnek vízzel töltött pórusokként, így lehetővé téve a terápiásan jelentős vegyületek

átjutását; vagy a fordított micellák membránban való jelenléte a membrán rendezettségét perturbálhatja.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti vegyületek proton és más ionok - például Ca^{2+} -, Na^{+} - vagy K^{+} -ion - biológiai membránokon át történő transzportját is megkönnyítik, e tulajdonságuk potenciális antifungális szerként vagy antibiotikumként való alkalmazhatóságukra utal.

A találmány szerinti származék-vegyület-konjugátumok alkalmazhatók in vivo, gyógyszerkészítmény komponenseként, a gyakran alkalmazott terápiás szerekhez hasonlóan.

A származék-vegyület-konjugátumot krónikusan vírus-fertőzött egyénnek adagolva az a vírust inaktiválhatja; vagy a származék-vegyület-konjugátum tartalmazhat egy antiszensz oligonukleotid szekvenciát, amely a vírus gén vagy onkogén aktivitását gátolja. Genetikus defektus esetén a terápiásan jelentős vegyület egy fehérje is lehet, amely a hiányzó vagy sérült fehérjét pótolja.

A származék-vegyület-konjugátum adagolható gyógyszerkészítményként különféle módokon, így szubkután, intravénás, intramuszkuláris, intraszternális, intranazális és intrakraniális injekció vagy infúzió formájában. A készítményt alkalmazhatjuk helyileg vagy inhalálás útján is.

Közelebbről, a találmány szerinti vegyületeket, így az (I) általános képletű vegyületeket és származék-vegyület-konjugátumokat alkalmazhatjuk krónikus vírusfertőzések, például AIDS (acquired immune deficiency syndrome, am. szerzett immunhiányos betegség) vagy herpesz simplex; autoimmun beteg-

ségek, például lupusz, reumatoid artritisz; diabétesz, cisztikus fibrózis, növekedési hormon hiány; és rákbetegségek kezelésére, bármilyen módon, amely egy emlősben a hatóanyag és a hatás-hely érintkezését eredményezi. Az adagolás történhet bármely, a gyógyszerek alkalmazásában szokásos módszerrel, egyedi terápiás szer formájában vagy más terápiás szerekkel kombinációban. Adagolhatók önmagukban is, de általában az adagolás együtt történik egy gyógyászati vivőanyaggal, amelyet az adagolás módja és szokásos farmakológiai gyakorlat alapján választunk meg.

Az adagolt dózis függ, nyilvánvalóan, az általában ismert tényezőktől, így az adott szer farmakodinamikai jellemzőitől, az adagolás módjától; a kezelt egyén korától, egészségi állapotától és testtömegétől; a tünetek jellegétől és súlyosságától, egyéb, egyidejűleg végzett kezelés jellegétől, a kezelés gyakoriságától és az elérendő hatástól. Általában, a terápiásan jelentős vegyület napi dózisa mintegy 0,1 mg/testtömeg kg-tól 100 mg/testtömeg kg-ig terjedhet. Rendszerint 0,5 és 50 közötti, előnyösen 1 és 10 mg/testtömeg kg közötti napi dózist alkalmazva, egy-hat részletre elosztva vagy tartós felszabadulást biztosító formában, a kívánt eredmény elérhető.

Belső adagolásra alkalmas dózis formák (készítmények) egyenként mintegy 1 mg-tól mintegy 500 mg-ig terjedő mennyiségű terápiás szempontból jelentős vegyületet tartalmaznak. E gyógyszerkészítményekben a terápiás szempontból jelentős vegyület rendszerint mintegy 0,5 - 95 tömeg%-ban van jelen a készítmény teljes tömegére vonatkoztatva.

stabilizálószer az antioxidánsok, például nátrium-biszulfit, nátrium-szulfit vagy aszkorbinsav, amelyek alkalmazhatók önmagukban vagy kombinációban. Használhatunk továbbá citromsavat és sóit, valamint nátrium-EDTA-t. A parenterálisan oldat készítmények adott esetben tartósító szereket is tartalmazhatnak, például benzalkónium-kloridot, metil- vagy propil-parabént és klór-butanolt használhatunk.

Az (I) általános képletű vegyületeket az 1. reakcióvázlaton bemutatottak szerint állíthatjuk elő.

Egy védett tioglikozidból meta-klór-peroxibenzoessavval szokásos körülmények között végrehajtott oxidációval a megfelelő szulfoxidot állítjuk elő. Ezt követően a védett glikozil-szulfoxid toluollal képzett oldatához -78°C hőmérsékleten triflik-anhidridet (Aldrich cégtől szereztük be) adunk, majd egy savmegkötő szer, például 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin (Aldrich) toluollal képzett oldatát, végül a nukleofil reagens toluollal készített oldatát adjuk a reakcióelegyhez -78°C hőmérsékleten. A reakcióelegyet ezután 15 - 30 percen át keverjük, majd a hűtőfürdőt eltávolítjuk, és további 10 percen át keverjük. A reakcióelegyet vizes nátrium-bikarbonát elegybe történő öntéssel megbontjuk, és a védett adduktumot kromatográfiával elkülönítjük. Az adduktumból a védőcsoportot szokásos körülmények között eltávolítjuk, és így az (I) általános képletű vegyületet kapjuk. A megfelelő tioglikozidot egy cukor szokásos körülmények között végzett védésével, majd az azt követő, a fentiek szerint kivitelezett tioglikozid képzési módszerrel kapjuk. E módszer szerint egy olyan (I) általános képletű szteroid-származék, amelynek a képletében R^3 és R^4

jelentése hidroxilcsoport, bisz-glikozilálás révén a glikozil-donorral α,α -glikozid-származékot képez, kivéve azt az esetet, amikor védőcsoportként pivaloilcsoportot alkalmazunk, ez esetben ugyanis csak a β,β -glikozid származékok képződnek a reakcióban alkalmazott oldószertől függetlenül.

Egy másik módszer szerint úgy járunk el, hogy a védett glikozil-szulfoxidot, a nukleofil reagenst és piridin-bázist propionitrilben $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten feloldjuk, majd az oldathoz $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten triflik-anhidridet adagolunk, végül a terméket a fentiek szerint elkülönítjük. E módszerrel egy (I) általános képletű szteroid-származék, ahol a képletben R^3 és R^4 jelentése hidroxilcsoport, glikozilezése szelektíven β,β -glikozid-származékot eredményez a glikozil-donor vegyülettel. E reakcióban a β,β -szelektivitás biztosítása érdekében para-metoxi-fenil-szulfoxid távozó csoportként való alkalmazása szükséges.

A találmányt az alábbi példákkal világítjuk meg közelebbről, az oltalmi kör korlátozása nélkül.

A példákban a hőmérsékletet $^{\circ}\text{C}$ -okban, a részeket és százalék értékeket tömeg szerint fejezzük ki. Az alábbiakban ismertetett példákban, amennyiben azt külön nem jelöljük, úgy a reakciókat száraz argon atmoszférában végeztük; "extrakcióval végzett elkülönítés" folyadék-folyadék fázisú extrakciót jelent, amikoris egy vizes fázist tartalmazó keveréket a megadott oldószerrerrel extrahálunk, a szerves fázist elkülönítjük, és nátrium-szulfáton szárítjuk, majd szűrjük, végül az oldószert vákuumban lepároljuk; a példákban kromatográfiás módszerként középnyomású oszlop-kromatográfiát végeztünk a szakirodalomban [W. C. Still és mun-

katársai, Journal of Organic Chem., 43: 2923 (1978)] leírtak szerint.

1. példa

A lépés: Perbenzilezett 3 α -etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- - α,α -glükózil-kólsav-metil-észter

Egy teflon keverővel ellátott 100 ml térfogatú gömblombikot lánggal megszárítunk, majd aceton-szárazjég fürdővel argon atmoszférában -78 °C-ra hűtünk. 2,3,4,6-tetra-O-benzil-glükóz-szulfoxidot (2,97 g, 4,57 mmól, 4,0 ekvivalens), C₃-etil-karbonát-kólsavat (0,563 g, 1,14 mmól, 1,0 ekvivalens) és 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridint (0,936 g, 4,57 mmól, 4,0 ekvivalens) külön-külön toluollal (15,0 ml) azeotróposan megszárítunk. Triflik-anhidridet (824 μ l, 4,57 mmól, 4,0 ekvivalens) adunk ezt követően a glikozil-szulfoxid toluollal (5,0 ml) készített oldatához -78 °C hőmérsékleten. Az oldathoz ezután a piridin-bázis toluollal (5,0 ml) készített oldatát adjuk. 5 perc múlva a kólsav-származék metilén-kloriddal (1,0 ml) és toluollal (5,0 ml) készített oldatát adjuk a reakcióelegyhez. A keverést -78 °C hőmérsékleten 30 percen át folytatjuk, majd a szárazjeges fürdőt eltávolítjuk. A reakcióelegyet 10 perc múlva telített nátrium-bikarbonát oldat hozzáadásával megbontjuk, majd a terméket metilén-kloriddal végzett extrakcióval elkülönítjük. A tisztítást flash-kromatográfiával szilikagélen végezzük, és így a cím szerinti vegyületet kapjuk olaj formában, R_f = 0,3 (20 % éter/diklór-metán), hozam: 60 %.

B lépés: 3 α -Etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- α,α -glükozil-kólsav-metil-észter

Az A lépés szerinti vegyület (0,220 g, 0,014 mmól, 1,0 ekvivalens) benzollal (4,0 ml) és metanollal (32,0 ml) készített oldatához szobahőmérsékleten palládium-hidroxidot (0,030 g, 15 tömeg%) adunk. Az elegyet 2586 torr (50 psi) nyomáson 48 órán át hidrogénezzük. A reakcióelegyet Celite-lapon (diatomos szilikagél, Johns-Manville Corp.) nitrogénatmoszférában átszűrjük. Az oldószert lepároljuk, és a kapott olajat flash-kromatográfiával (eluálószer: 10 % metanol/metilén-klorid) tisztítjuk. Az elúciós körülmények között beoldódó szilikagél eltávolítása céljából a terméket egy fordított-fázisú LH-20 típusú oszlopon (eluálószer: metanol) áteresztjük. Az oldószert lepároljuk, és így a cím szerinti vegyületet kapjuk fehér por formájában, hozam: 65 %, $R_F = 0,3$ (15 % MeOH/diklór-metán), NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 5,04 (m, Lh, anomer β -H), 4,82 (m, Lh, anomer β -H).

2. példa

3 α -Benzoil-cisz-5,10-bisz- β,β -glükozil-kólsav-metil-észter

2,3,4,6-tetra-o-benzil-para-metoxi-glükóz-szulfoxid (1,012 g, 1,45 mmól, 4,0 ekvivalens), C₃-O-benzoil-kólsav-metil-észter (0,191 g, 0,364 mmól, 1,0 ekvivalens) és 2,6-di-terc-butyl-4-metil-piridin (0,179 g, 0,874 mmól, 2,4 ekvivalens) elegyét toluollal (20 ml) azeotróposan háromszor szárítjuk. A toluol vákuumban végzett lepárlása után az elegyet frissen desztillált propionitrilben feloldjuk, és argonatmoszférában aceton-

-szárazjég fürdőben -78 °C-ra lehűtjük. Ezután triflic-anhidridet (244 µl, 1,45 mmól, 4,0 ekvivalens) adunk hozzá, és a kapott reakcióelegyet 40 percen át -78 °C hőmérsékleten keverjük. A hűtőfürdőt eltávolítjuk, és a keverést további 10 percen át folytatjuk. A reakcióelegyet telített nátrium-dikarbonát oldatba öntjük, ezáltal azt megbontva, majd a terméket metilén-kloriddal extraháljuk, végül flash-kromatográfiával szilikagélen tisztítjuk. A benzil védőcsoportokat a fent ismertetettek szerint katalitikus hidrogénezéssel eltávolítva a cím szerinti vegyületet kapjuk olaj formájában, hozam: 60 %, $R_F = 0,3$ (15 % MeOH/CH₂Cl₂), NMR (CDCl₃ 500 MHz) δ : 4,36 (d, 1H, J = 7,92 Hz, anomer α -H), 4,37 (d, 1H, J = 7,92 Hz, anomer α -H).

Az 1. és 2. példában ismertetett vegyületekhez hasonlóan előállított vagy előállítható vegyületeket az I. táblázatban foglaltuk össze.

I. táblázat
(I) általános képletű vegyületek

Példa	A	a*	R ^{1*}	R ²	R ^{3**}	R ^{4**}	R ⁵	n
1 ^b	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
2 ^c	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
3 ^d	OH	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
4 ^c	OH	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
5 ^f	OH	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CONH-triptofán	2
6	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
7 ^a	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
8 ^h	OCOPh-OMe	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
9 ⁱ	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
10 ^j	OH	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
11 ^k	OCOPh	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2

Példa	A	a*	R ^{1*}	R ²	R ^{3**}	R ^{4**}	R ⁵	n
12.	OH	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
13'	OH	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
14.	NH ₂	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
15.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
16.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
17.	O	d	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
18.	O	d	H(α)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
19.	O	d	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
20.	O	d	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
21.	O	d	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
22.	O	d	H(α)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
23.	O	d	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
24.	O	d	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2

Példa	A	a*	R ^{1*}	R ²	R ^{3**}	R ^{4**}	R ⁵	n
25.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
26.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
27.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ H	2
28.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ H	2
29.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
30.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
31.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(α)	O-glükóz(α)	CO ₂ Me	2
32.	OCH ₂ Ph	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glükóz(β)	O-glükóz(β)	CO ₂ Me	2
33.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-galaktóz(α)	O-galaktóz(α)	CO ₂ H	2
34.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-galaktóz(β)	O-galaktóz(β)	CO ₂ H	2
35.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-galaktóz(α)	O-galaktóz(α)	CO ₂ H	2
36.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-galaktóz(β)	O-galaktóz(β)	CO ₂ H	2

Példa	A	a*	R ^{1*}	R ²	R ^{3**}	R ^{4**}	R ⁵	n
37.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-galaktóz(α)	O-galaktóz(α)	CO ₂ Me	2
38.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-galaktóz(β)	O-galaktóz(β)	CO ₂ Me	2
39.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-galaktóz(α)	O-galaktóz(α)	CO ₂ Me	2
40.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-galaktóz(β)	O-galaktóz(β)	CO ₂ Me	2
41.	OCOPh	s(α)	H(α)	CH ₃	O-ribóz(α)	O-ribóz(α)	CO ₂ H	2
42.	OCOPh	s(α)	H(α)	CH ₃	O-ribóz(β)	O-ribóz(β)	CO ₂ H	2
43.	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-ribóz(α)	O-ribóz(α)	CO ₂ H	2
44.	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-ribóz(β)	O-ribóz(β)	CO ₂ H	2
45.	OCOPh	s(α)	H(α)	CH ₃	O-ribóz(α)	O-ribóz(α)	CO ₂ Me	2
46.	OCOPh	s(α)	H(α)	CH ₃	O-ribóz(β)	O-ribóz(β)	CO ₂ Me	2
47.	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-ribóz(α)	O-ribóz(α)	CO ₂ Me	2
48.	OCOPh	s(α)	H(β)	CH ₃	O-ribóz(β)	O-ribóz(β)	CO ₂ Me	2

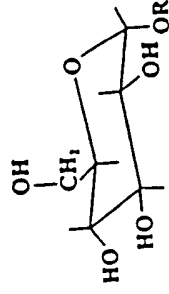
Példa	A	a*	R ^{1*}	R ²	R ^{3**}	R ^{4**}	R ⁵	n
49.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glukóz(α)	O-glukóz(β)	CO ₂ Me	2
50.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(β)	CH ₃	O-glukóz(β)	O-glukóz(α)	CO ₂ Me	2
51.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glukóz(α)	O-glukóz(β)	CO ₂ Me	2
52.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OCOEt} \end{array}$	s(α)	H(α)	CH ₃	O-glukóz(β)	O-glukóz(α)	CO ₂ Me	2

* s = egyszeres kötés

d = kettőskötés

α = gyűrű síkja alatt

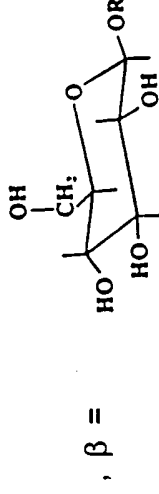
β = gyűrű síkja felett



** $\alpha =$

(1) képletű csoport

egy α -glükózid



, $\beta =$

(2) képletű csoport

egy β -glükózid

Tömegspektrum

c m/e = 851

d m/e = 771

h m/e = 881

i m/e = 851

j m/e = 771

k m/e = 851

l m/e = 771

^1H NMR

b: (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5,04 (m, 1H, anomer β -H), 4,82 (m, 1H, anomer β -H),

e: (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5,04 (m, 1H, anomer β -H), 4,82 (m, 1H, anomer β -H),

f: (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5,056 (m, 1H, anomer β -H), 5,0414 (m, 1H, anomer β -H),

g: (CDCl₃, 500 MHz) δ : 5,0525 (d, J = 3,96 Hz, 1H, anomer β -H), 4,860 (d, J = 3,96 Hz, 1H, anomer β -H),

A fentiekben bemutattuk, hogy a találmány szerinti vegyületek biológiai membránokkal kölcsönhatásba lépnek, azokat permeabilizálják (áteresztőképességüket fokozzák), és antibiotikumok, valamint antifungális ágensek élő sejtekre kifejtett hatását fokozzák. Minthogy megmutattuk azt is, hogy a találmány szerinti vegyületek a membránokat permeabilizálják és a vegyületek önmagukban az alkalmazott koncentrációban a sejt növekedésre nem fejtenek ki hatást, feltételezzük, hogy a fokozott hatékonyság a terápiás szempontból jelentős vegyület sejtekbe való juttatásának fokozódásából ered.

A találmány szerinti vegyületek membrán-permeabilitás fokozására való alkalmazhatóságát Hoyt és munkatársai által ismertett vizsgáló módszerrel [Hoyt, D.W. és munkatársai, Biochemistry, 30. kötet, 10155 (1991)] demonstráltuk. E módszer azon alapszik, hogy egy fluoreszcein-származékot önkialtó koncentrációban vezikulumokba betokozunk; így a vizsgált vegyület hatására bekövetkező fluoreszcencia intenzitás-növekedés arra utal, hogy a fluoreszcein-származék a vezikulumból kijutott, vagyis a membrán átjárhatóvá vált. A találmány szerinti vegyületek igen kis koncentrációban (0,05 - 0,5 mM) gyors és jelentős fluoreszcencia intenzitás-növekedést okoztak, ezzel utalva a foszfolipid membrán permeabilitásának fokozódására (úgynevezett permeabilizálódás).

Ezen túlmenően, kiválasztott glikozilezett szteroid-származékokkal kezelt vezikulumokon (a kezelést olyan koncentrációban végeztük, melynek hatására 100 %-os karboxi-fluoreszcein kijutás következett be) végzett fényszóródási és zavarosodási mérések alapján megállapítható, hogy a

vezikulumok átlagos mérete a kezeletlen vezikulumokétól nem különbözött szignifikánsan. Továbbá, kiválasztott glikozilezett szteroid-származékokkal kezelt vezikulumok elektron mikrográf vizsgálata (a kezelést olyan koncentrációban végeztük, amelynek hatására 100 %-os karboxi-fluoreszcein kiáramlás következett be) nem mutatott szignifikáns morfológiai változást a kezeletlen vezikulumokhoz képest. Következésképpen, a találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékok a membránokat a vezikulumok szétroncsolása vagy számottevő fúzió indukálása nélkül permeabilizálják.

Úgy véljük, oldatban végbemenő aggregáció NMR vizsgálata és krisztallográfiai bizonyítékok alapján, hogy a találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékok önasszociációra képesek és a membránokba asszociált állapotban ékelődnek be, s membrán-permeabilizáló hatásuk e folyamattal van összefüggésben. Jóllehet a vizsgálatban használt, tisztán foszfolipidekből álló vezikulumok nem rendelkeznek a biológiai membránok komplexitásával, megállapítottuk, hogy azok a vegyületek, amelyek e vizsgálatban jó hatást mutatnak, azok terápiásan jelentős vegyületek (például antibakteriális és antifungális ágensek) élő sejtekre kifejtett hatását is fokozzák. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a koncepciót, hogy a glikozilezett szteroid-származékok képessége foszfolipid kettős rétegekkel való kölcsönhatásra, összefügg terápiás hatékonyságot növelő képességükkel. Továbbá az említett megfigyelés arról is tanúskodik, hogy a karboxi-fluoreszcein vizsgálat elfogadható kiindulási modell biológiai membránok permeabilizálására potenciálisan alkalmas jelöltek azonosítására.

A fenti vizsgáló módszer módosított változatát [(V.E. Carmichael és munkatársai, J. Amer. Chem. Soc., III. kötet, 767 (1989)] alkalmazva azt tanulmányoztuk, hogy a vegyületek képesek-e igen alacsony koncentrációban (0,01 mM - 0,005 mM) membránokat protonok számára permeábilissá tenni. A vizsgálathoz a fluoreszcein-származékot vezikulumok belső részébe nem-kioltó koncentrációban egy pufferban (pH = 6,5) betokozzuk. Majd a vezikulumokat egy másik pufferben (pH = 5,5) hígítjuk és egy (I) általános képletű vegyületet adunk hozzá annál kisebb koncentrációban, amelynél a membránok permeábilissá válnak a fluoreszcein-származékokra. Az (I) általános képletű vegyület hozzáadása után a fluoreszcencia intenzitása csökkent, jelezve, hogy a membrán protonokkal szemben permeábilissá vált.

A találmány szerinti glikozilezett szteroid-származékok foszfolipid membránok permeabilizálása tekintetében megmutatókozó hasznossága e származékoknak nagy részben foszfolipidekből és más lipidekből álló sejtmembránok terápiás szempontból jelentős molekulákkal szembeni permeabilitása fokozására való hasznosíthatóságára utal.

E vegyületek ilyen irányú hasznosságát két különböző antifungális ágens *Crithidia fasciculata* elpusztításában kifejtett hatékonyságának vizsgálatával, továbbá eritromicinnek *E. Coli* ATCC 25922 törzset elpusztító hatékonyságának vizsgálatával demonstráltuk.

1. Vizsgálati módszer

Karboxi-fluoreszcein vezikulumokból történő kiáramlásának meghatározása

Egy 25 ml-es gömblombikba 20,5 mg tojássárga (Sigma, átlagos móltömeg: 770,4) kloroform-metanol eleggyel készített oldatát, 5,0 mg foszfatidil-glicerin (Sigma, móltömeg: 772) kloroform-metanol eleggyel készített oldatát és 12,7 mg áttisztított koleszterint (Aldrich, móltömeg: 386,66) mértünk be. A molarány ez esetben tojássárga:foszfatidil-glicerin:koleszterin = 4:1:5 (66 μ mol össz fehérje). Az oldószert rota-bepárlóban lepároltuk. A megszáritott fehérje-keverékhez 3 ml frissen desztillált étert adtunk argonatmoszférában. Miután a lipid újra feloldódott, karboxi-fluoreszcein vízzel készített oldatából 1 ml-t adtunk hozzá (pH-ját 7,4-re beállítva), 180 mM koncentráció biztosításához [a karboxi-fluoreszcein koncentrációját UV spektroszkópiásan határoztuk meg; az extinkciós koeficiens értéke (pH = 7,4; $\lambda_{\max}$ = 492): $5,6 \times 10^4$]. A karboxi-fluoreszceint tartalmazó fehérje-keveréket argonatmoszférában egy szonikáló-fürdő típusú berendezésben 5 és 15 °C közötti hőmérsékleten, 15-30 percen át szonikáltuk. Az elegyet ezután rota-bepárlóba helyeztük és a szerves oldószert lepároltuk. A karboxi-fluoreszceint tartalmazó vezikulumokat a szabad karboxi-fluoreszceintől úgy választottuk el, hogy a vezikulumok vizes keverékét egy 145 mM NaCl/10 mM Hepes eleggyel pH = 7,4 értéken ekvilibrált Sephadex G-25 oszlopra vittük fel. Az anyagot nem tartalmazó, üres frakció utáni első frakció tartalmazza a karboxi-fluoreszceinnel töltött vezikulumokat, míg a vezikulumokba nem zárt, szabad karboxi-fluoreszcein az oszlo-

pon marad. Az így tisztított vezikulumokat 145 mM NaCl/10 mM Hepes pufferral (pH = 7,4) úgy hígítottuk meg, hogy a vezikulum-elegy fluoreszcencia intenzitása mintegy 10-nek adódott.

Mivel a karboxi-fluoreszcencia önkioltó koncentrációban van jelen a vezikulumokban, az idő függvényében bekövetkező fluoreszcencia intenzitás-növekedés azt mutatja, hogy a fluorofor a vezikulumokból a pufferbe ment át. A lehetséges maximális fluoreszcencia növekedés meghatározása céljából a vezikulumos oldatból vett mintához 5 % Triton X100 50 µl metanollal készített oldatát adtuk (a Triton X100 nem-ionos típusú detergens, az alkalmazott magas koncentrációban a vezikulumokat szétbontja a lipidek szolubilizációja révén). Minden egyes, a glikozilezett szteroid hatására bekövetkező karboxi-fluoreszcein kiáramlást úgy határoztuk meg, hogy mértük a glikoszteroid hatására bekövetkező fluoreszcencia intenzitás-növekedést. Mindegyik kísérletben a glikoszteroid metanollal készített oldatából 50 µl-t (kezdeti koncentráció-tartomány: 0,6145-2,458 mM) adtunk a küvettához és a fluoreszcencia-intenzitást 10 percen át mértük. A kontroll-kísérletben 50 µl tiszta metanolt alkalmazva igazoltuk, hogy a metanol önmagában nem okoz szignifikáns fluoreszcencia intenzitás-növekedést. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy néhány glikoszteroid igen alacsony koncentrációban jelentősen permeabilizálta a vezikulum membránokat, ily módon a karboxi-fluoreszcencia pufferba való kiáramlását lehetővé téve. Az eredményeket a II. táblázatban foglaljuk össze.

A hatékonyság mértékeként jelentős (azaz 50 %-nál nagyobb) kiáramlást okozó koncentrációt alapul véve, a vizsgálatban a foszfolipid membránokat permeabilizáló hatás szempontjából a 7., 8. és 11. számú vegyületek bizonyultak a leghatékonyabbaknak. A 7. és 8. példa szerinti vegyületek cisz A/B gyűrűkapcsolattal és a molekulák hidrofil részéhez kapcsolódó két α -kötésű glükóz egységgel rendelkeznek. A 11. példa szerinti vegyület két α -kötésű glükózzal rendelkezik, amelyek a molekula hidrofil részéhez kapcsolódnak. E vizsgálatban a kólsav, dezoxikólsav és chenodezoxikólsav - ismert, hogy e vegyületek más alkalmazásban membránokat permeabilizálnak [Gordon GS és munkatársai, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82: 7419-7423 (1985)] - is permeabilizálják a membránokat, bár sokkal nagyobb koncentrációban, mint számos találmány szerinti vegyület. E megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a glikozilezés megváltoztatja a szteroidok biológiai tulajdonságait, és a membrán-permeabilizáló hatás tekintetében hatékonyságukat az fokozza.

II. táblázat

Példa	Koncentráció (mM) *	Fluoreszcencia nö- vekedés (%)
Kólsav	0,117	0
	2,341	59,1
Metil-kolát	0,117	25,4
Kenodezoxikólsav	0,117	17,7
	1,17	80,9
Triton-X 100	4,04	100
	1,17	46,4
	0,117	18,6
Dezoxikólsav	0,117	0
	1,17	82,7
1	0,117	0
2	0,117	10
3	2,34	0
4	0,117	0
5	0,117	57,3
7	0,117	89,1
8	0,117	89,1
9	0,117	24,5
10	0,117	0
11	0,117	98
13	0,117	0

* Véggkoncentráció hígítás után

2. Vizsgálati módszer

Lipid-membránokon át történő proton transzport tanulmányozása

E módszerben protonok glikoszteroidokkal kezelt vezikulum-membránokon való átjutását vizsgáltuk. Karboxi-fluoreszceint nem-önkioltó koncentrációban tartalmazó vezikulumokat a fentiekben ismertetett módon preparáltunk, attól mindössze abban eltérve, hogy a karboxi-fluoreszceint 1 ml vízben és 1 mM koncentrációban (pH = 6,5) adtuk a lipid keverékhez. Argonatmoszférában végzett szonikálás és a dietil-éter rota-bepárlóban végzett lepárlása után, a karboxi-fluoreszcein tartalmú vezikulumokat a fentiek szerint Sephadex-G25 oszlopon tisztítottuk. E tisztítás után a vezikulum-oldat koncentrációját úgy állítottuk be, hogy 80 mM NaCl/5 mM Hepes pufferrel (pH = 5,5) végzett százszoros hígítás után a fluoreszcencia intenzitása 100 legyen.

A vezikulum törzsoldat százszoros hígítását a pH = 5,5 pufferrel közvetlenül az egyes kísérletek előtt végeztük, és a küvettába 1 ml hígított oldatot mértünk be. A glikoszteroidok protonoknak lipid kettősrétegen át történő transzportját elősegítő hatásának meghatározására, mindegyik vizsgálandó glikoszteroid metanollal készített 0,245 mólos oldatából 50 µl-t adtunk az 1 ml vezikulum oldatot tartalmazó fluoreszcencia mérő-küvettához, és a fluoreszcenciában bekövetkező változást 10 percen át mértük. A fluoreszcenciában megfigyelt jelentős csökkenés azt jelzi, hogy a vizsgált glikoszteroid protonoknak membránon át történő transzportját elősegíti. E módszer azon a tényen alapszik, hogy karboxi-fluoreszcein fluoreszcencia in-

tenzitása pH = 6,5 értéknél lényegesen nagyobb, mint a pH = 5,5 értéken mért intenzitás. Abban az esetben, amikor a pH = 6,5 értéken preparált vezikulumokat pH = 5,5 pufferral hígítottuk, a fluoreszcencia intenzitása az időben csökkent, minthogy a pH gradiens a membránon megszűnt.

Kontrollként 50 µl tiszta metanolt alkalmazva, a fluoreszcencia intenzitás nem változott jelentősen. Következésképpen metanol alacsony koncentrációban nem permeabilizálja a vezikulumokat protonnal szemben.

E kísérlet eredményeit a III. táblázatban összegezzük.

III. táblázat

Kísérlet	Koncentráció (mM) *	Fluoreszcencia csökkenés (%)
Triton-X 100	4,04	100
	0,0116	2,43
Gramicidin	0,00579	87,2
	0,000579	81,6
Kólsav	0,0116	1,0
Metil-kolát	0,0116	5,4
Kenodezoxikólsav	0,0116	8,2
Dezoxikólsav	0,00116	5,39
1.	0,0116	7,6
	0,00579	4,3
2.	0,0116	8,6
	0,00579	1,7
3.	0,0116	35,4

Kísérlet	Koncentráció (mM) *	Fluoreszcencia csökkenés (%)
	0,00579	21,0
4.	0,0116	12,3
	0,00579	7,89
5.	0,0116	26,1
	0,00579	19,4
7.	0,0116	19,8
	0,00579	15,2
8.	0,0116	32,2
	0,00579	20,6
9.	0,0116	43,0
	0,00579	27,4
11.	0,0116	22,0
	0,00585	14,7
13.	0,0116	70,6
	0,00579	35,2
	0,000579	2,8

* Véggkoncentráció hígítás után.

3. Vizsgálati módszer

Eritromicin antibiotikus hatékonyságának tanulmányozása hatékonyságot fokozó szerek jelen- és távollétében

Ismeretes, hogy az eritromicin antibiotikum hatékonyságát sejtmembránokat permeabilizáló vegyületek fokozzák [Kubesch P. és munkatársai, Biochemistry 26: 2139-2149 (1987)]. Az új glikozilezett szteroid-származékok jelenlétében eritromicin hatékonyságát tenyésztő-lemezen vizsgáltuk. Röviden, a kísérletet

az alábbi módon végeztük. DH₂ sejteket (E. coli K-12 mutáns törzs - a "Cold Spring Harbour Laboratories"-ban állították elő) - amelyeket mintegy 0,5-es optikai sűrűség (O.D.) eléréséig tenyésztettünk - 2,5 ml ömlesztett fedő-agarral [ezt 10 g tripton (DIFCO), 5 g élesztő extraktum (DIFCO), 10 g nátrium-klorid, 7 g agar (DIFCO) és 1 ml 1 M nátrium-hidroxid elegyből 1 liter tiszta vízben állítottuk elő, majd 25 percen át autoklávoztuk] kevertünk össze, majd a keveréket agar lemezekre öntöttük (az agar lemezeket 10 g tripton, 5 g élesztő, 10 g nátrium-klorid, 15 g agar és 1 ml 1 M nátrium-hidroxid ágensekkel 1 liter tiszta vízben preparáltuk, majd a preparátumot autoklávoztuk, végül lehűtöttük). 15-30 perc hűtés után, mindegyik lemezen rácsot képeztünk, és 4 µl eritromicint (0,5 mM vagy 1,0 mM koncentrációban) metanolban vagy eritromicint és a vizsgálandó vegyületet (20 mM koncentrációban) metanolban tartalmazó oldatot cseppentettünk fel a rács mindegyik rekeszébe. A lemezeket 16 órán át 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, és ezután a gátlási zónákat (vagyis a rács egyes egységeiben a tiszta területeket, ahol a vizsgálandó oldat a baktérium sejt növekedését gátolta) megállapítottuk, és valamennyi egységet a hatékonyság szempontjából egy relatív skálán értékeltük (idegen szóval: szkóroztuk). Standardként a csak eritromicint (1 mM koncentrációban) tartalmazó rács-területet tekintettük a hatékonyság megállapításához. A többi rács-területet ehhez viszonyítottuk. Az eredményeket a IV. táblázatban összegezzük. Az adatokból kitűnik, hogy e vizsgálatban a 3α-O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz-α,α-7,12-glükózil-kólsav-metil-észter vegyület fejtette ki a legnagyobb hatékonyság-növelő effektust. A vizsgálatban a

nem-glikozilezett, epesav-származékok közül csupán a dezoxikólsav és annak nátrium-sója mutatott csekély hatást; míg a chenodezoxikólsav és kólsav, valamint sóik, eritromicin hatékonyságát kimutatható mértékben nem befolyásolták. Érdekes megjegyezni, hogy a dezoxikólsav-sók a chenodezoxikólsav-sóknál szintén hatékonyabbnak bizonyultak inzulin nazális membránon át történő felvételének növelésében [Gordon GS és munkatársai, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82: 7419-7423 (1985)].

IV. táblázat

Vegyület (20 mM)	Eritromicin (mM)	Hatás
Kólsav	1,0 mM	---
Kólsav	0,5 mM	---
Nátrium-kolát	1,0 mM	---
Nátrium-kolát	0,5 mM	---
Metil-kolát	1,0 mM	---
Metil-kolát	0,5 mM	---
Kenodezoxikólsav	1,0 mM	---
Kenodezoxikólsav	0,5 mM	---
Dezoxikólsav	1,0 mM	+
Dezoxikólsav	0,5 mM	+
Nátrium-dezoxikolát	1,0 mM	+
Nátrium-dezoxikolát	0,5 mM	+
CME	1,0 mM	+++
CME	0,5 mM	+++
3 α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- α,α - -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter [BTME]	1,0 mM	+

Vegyület (20 mM)	Eritromicin (mM)	Hatás
BTME	0,5 mM	+
3 α -OH-cisz-5,10-bisz- α,α -glükózil kólsav K ⁺	1,0 mM	+
3 α -OH-cisz-5,10-bisz- α,α -glükózil kólsav K ⁺	0,5 mM	+

---: eritromicin hatása 1,0 mM koncentrációban (alapérték)

és minden ennél jelentéktelenebb hatás;

+: hatás növekedés az alapértékhez képest;

+++: jelentős hatás növekedés az alapértékhez képest.

E fenti két kísérletet elvégeztük alacsonyabb koncentrációban vett CME-vel is és a bekövetkező hatékonyság növekedést összehasonlítottuk a nem-glikozilezett 3 α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-kólsav-metil-észter (továbbiakban 'CDE') analóggal kapott hatással. Az eredményeket az V. táblázatban ismertetjük. Az adatok azt mutatják, hogy a CME igen alacsony koncentrációban hatékonyságot fokozó szerként viselkedik, viszont a nem-glikozilezett analóg nem fejt ki ilyen hatást. Ez egyúttal azt is demonstrálja, hogy a cukrok jelenlése kritikus a hatás fokozása szempontjából.

V. táblázat

Vegyület (mM)	Eritromicin (mM)	Hatás
1,0 mM CDE	0,1 mM	---
0,1 mM CDE	0,1 mM	---
0,1 mM CME	0,1 mM	+
0,1 mM CME	0,01 mM	+

Vegyület (mM)	Eritromicin (mM)	Hatás
0,01 mM CME	0,01 mM	+
0,001 mM CME	0,01 mM	+
0,001 mM CME	0,001 mM	---

---: nem figyelhető meg kitisztulás (gátlási zóna)

+: kitisztulás megfigyelhető.

4. Vizsgálati módszer

Antifungális szerek protozoonokra kifejtett hatékonysága glikozilezett szteroid-származékok jelen- és távollétében

E kísérletben CME, amely mind a fenti 1., mind a 2. és 3. vizsgálati módszerrel jó hatású membrán-permeabilizáló ágensnek bizonyult, (a karboxil-fluoreszcein módszerben a 8. számú vegyület), két különböző antifungális ágens *Crithidia fasciculata* protozoonra kifejtett hatékonyságát növelő képességét tanulmányoztuk, és a vizsgálatot a megfelelő nem-glikozilezett szteroiddal is elvégeztük. A kísérletet, amelyet Pascal RA és munkatársai [Biochemistry 22: 171-178 (1983)] és Rahman MD és munkatársai [J. Med. Chem. 31: 1656-1659 (1988)] szerint hajtottunk végre, röviden az alábbiakban ismertetjük. 25 ml tápoldatot (1,5 g répacukor, 0,5 g élesztő extraktum, 0,4 g tripton és 0,25 ml trietanol-amin elegyét 100 ml vízben feloldottuk és az oldat pH-ját 10 M sósavval pH = 8-ra állítottuk) autoklávoztunk, majd lehűtöttük. Ezután 100 µl hemint (Sigma) (2 mg hemin/1 ml 0,1 N nátrium-hidroxid koncentrációjú oldatból), 20 mg sztreptomycin-szulfátot (Sigma), az antifungális ágenszt és/vagy egy glikozilezett vagy nem-glikozilezett szteroid-származékot adtunk hozzá, és *C. fasciculata* alikvotjaival inokuláltuk [a hozzáadott

250 μ l tenyészet mintegy 1×10^6 - 1×10^7 sejtet tartalmazott; a tenyészetet a következő módon készítettük: *C. fasciculata* glicerinnel készített szuszpenzióját adtuk a táptalajhoz, rázatással 3 (három) napon át 26 °C hőmérsékleten tenyésztettük, majd 0 és 4 °C között tároltuk]. A tenyészetet ezután rázatással 25 °C-on inkubáltuk és a növekedést az 535 nm-en mért abszorpciónak a nem beoltott közeg abszorpciójához képest mutatott változása alapján követtük.

A vizsgálatban két különböző antifungális ágenszt alkalmaztunk: 10-tiasztearinsavat (10-TSA) [lásd: Rahman MD és munkatársai, J. Med. Chem. 31: 1656-1659], amelynek IC_{50} értéke 10 μ M, és 24-tiakolesztanol (24-TC) [lásd: Rahman MD és Pascal RA., J. Biol. Chem. 265: 4989-4996 (1990)], amelynek IC_{50} értéke 0,32 μ M. Az eredményeket az 1., 2. és 3. ábrán mutatjuk be. Eszerint CME jelenléte igen nagy mértékben fokozza 10-TSA hatékonyságát, lehetővé téve, hogy 10-100-szor alacsonyabb koncentrációban alkalmazzuk annál, amely egyébként szükséges 50 %-os növekedés-gátlás eléréséhez (1. ábra); CME jelenléte 24-TC hatékonyságát is növeli (2. ábra). Ugyanakkor a nem-glikozilezett szteroid analóg (CDE) nem fokozta a hatékonyságot ebben a kísérletben (3. ábra).

5. Vizsgálati módszer

Származék-vegyület-konjugátum hatása Crithidia fasciculata protozoonra

Egy új (I) általános képletű glikozilezett szteroid-származékot egy terápiásan jelentős vegyülethez kapcsolunk sav aminhoz való kapcsolására alkalmas, ismert módszerrel. A származék-vegyület-konjugátum *Crithidia fasciculata* növekedé-

sét gátló képességét Pascal és munkatársai [Biochemistry 22: 171-178 (1983)] és Rahman MD és munkatársai [J. Med. Chem. 31: 1656-1659 (1988)] szerint határoztuk meg. Röviden, az alábbiak szerint jártunk el. 25 ml táptalajt önmagában, 25 ml 24-TC-t, melynek koncentrációja $0,32 \mu\text{M}$ (azaz az IC_{50} értékkel megegyező), illetve táptalajt és $0,32 \mu\text{M}$ koncentrációban származék-vegyület-konjugátumot tartalmazó lombikokat *C. fasciculata* alikvotokkal inokuláltunk ($250 \mu\text{l}$ tenyészetet alkalmaztunk, amely mintegy 1×10^6 - 1×10^7 sejtet tartalmazott). A tenyészeteket rázatással 25°C hőmérsékleten inkubáltuk és a növekedést a nem-beoltott közeghez viszonyítottan, az 535 nm -en mért abszorpció-változással monitoroztuk. A származék-vegyület-konjugátum hatékonyságot fokozó hatása a nem-konjugált terápiásan jelentős vegyülethez viszonyítva alacsonyabb növekedési sebességben (azaz az idő függvényében kisebb abszorbanciában) nyilvánul meg. A származék-vegyület-konjugátum IC_{50} értékét úgy határoztuk meg, hogy a származék-vegyület-konjugátum különböző koncentrációival végeztük el a kísérletet és definiáltuk az önmagában csak *C. fasciculata*-t tartalmazó táptalajhoz viszonyított 50 %-os növekedési-gátlást okozó koncentrációt.

Egy másik kísérletsorozatban származék-vegyület-konjugátumot IC_{50} értékével (amelyet a fentiek szerint határoztunk meg) megegyező koncentrációban tartalmazó lombikhoz egy találmány szerinti glikozilezett szteroidot is adtunk, például CME-t, amelyről ismert, hogy nem-konjugált formában növeli a 24-TC hatékonyságát (e szteroidot a továbbiakban 'fokozó szer'-nek nevezzük). A fokozó szer és a származék-vegyület-

-konjugátum aránya a következő: 0:1; 0,1:1; 1:1; 10:1; 10:1; 100:0; 1000:1 vagy bármilyen ezek közé eső arány lehet. A közeget *C. fasciculata* alikvotjaival a fenti módon inokuláltuk és a növekedést az 535 nm-en mért abszorbanciaváltozás (a nem-beoltott közegre vonatkoztatva) követésével monitoroztuk. A fokozó szer jelenlétében a származék-vegyület-konjugátum hatékonyságának növekedése alacsonyabb növekedési sebességben - a származék-vegyület-konjugátum egyedüli alkalmazásához képest - nyilvánul meg. A fokozó szer:származék-vegyület-konjugátum optimális arányát a legkisebb növekedési sebesség alapján definiáljuk.

Szabadalmi igénypontok

1. (Ia) általános képletű vegyületek, ahol a képletben

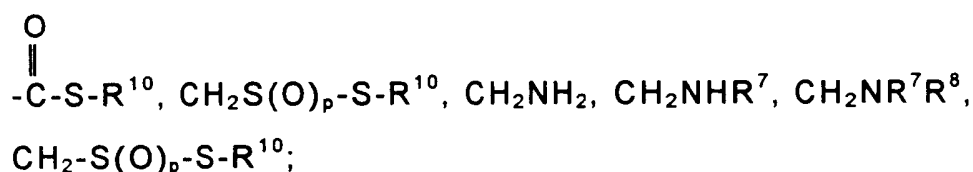
A jelentése O, OH, OR⁶, NR⁷R⁸, N₃, NHCOR⁷, OCOAr,



Ar jelentése fenilcsoport, vagy halogénatommal, C₁-C₁₂ alkilcsoporttal vagy C₁-C₃ alkoxicssoporttal egy-háromszorosan helyettesített fenilcsoport;

a jelentése (α)- vagy (β)-konfigurációjú egyszeres kötés, azzal a megkötéssel, hogy amennyiben A jelentése oxigénatom, úgy a jelentése kettős kötés;

R⁵ jelentése CO₂R¹⁰, CH₂OR⁹, CONH₂, CONHR⁷, CONR⁷R⁸,



R⁶ jelentése egy 1-10 monoszacharidból álló glikozil-rész, amelynek mindegyik monoszacharid egységében az anomer szénatomokon a glikozides kötés konfigurációja egymástól függetlenül (α) vagy (β);

R⁷ és R⁸ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, C₁-C₄ alkilcsoport, C₃-C₇ cikloalkilcsoport, C₄-C₁₀ alkil-cikloalkil-csoport, fenil-, benzilcsoport vagy R⁷ és R⁸ együttesen egy (CH₂)_f képletű csoportot képeznek, ahol f értéke 3 - 6;

R⁹ jelentése hidrogénatom vagy C₁-C₃ alkilcsoport;

R¹⁰ jelentése hidrogénatom, C₁-C₁₀ alkilcsoport, C₁-C₁₀ alkenilcsoport, C₁-C₁₀ alkinilcsoport, fenil- vagy benzilcsoport;

p jelentése 0, 1 vagy 2;

n jelentése 0, 1 vagy 2;

továbbá mindezek gyógyászatilag elfogadható sói, azzal a megkötéssel, hogy a (Ia) általános képlet jelentése 3 α -etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-(2,3,4,6-tetra-O-benzil)-glükózil-kólsav-metil-észtertől eltérő.

2. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, ahol a képletben

A jelentése OH, OR⁶, $\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{O}-\text{C}-\text{OR}^9 \end{array}$, OCOC₆H₅, OCOC₆H₅-pOMe, NH₂;

a jelentése egyszeres kötés;

R⁵ jelentése CO₂R¹⁰, CONR⁷R⁸,

R⁶ jelentése egy adott esetben benzil- vagy pivaloilcsoporttal védett D-glükóz, ahol az anomer szénatomon a glikozid-kötés konfigurációja (α) vagy (β); és

R¹⁰ jelentése hidrogénatom vagy C₁-C₁₀ alkilcsoport.

3. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

4. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav.

5. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

6. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-25-triptofanil-kólsav.

7. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

8. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3 α -O-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

9. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

10. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav.

11. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -O-benzoil-cisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

12. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -hidroxicisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav.

13. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észter.

14. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amely 3α -hidroxitransz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav.

15. Egy származék-vegyület-konjugátum, amelyben egy 1. igénypont szerinti vegyület egy második, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott vegyülethez van hozzákapcsolva.

16. Egy származék-vegyület-konjugátum, amelyben egy 2. igénypont szerinti vegyület egy második, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott vegyülethez van hozzákapcsolva.

17. Egy származék-vegyület-konjugátum, amelyben egy 9. igénypont szerinti vegyület egy második, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott vegyülethez van hozzákapcsolva.

18. Egy származék-vegyület-konjugátum, amelyben egy 10. igénypont szerinti vegyület egy második, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott vegyülethez van hozzákapcsolva.

19. Egy 18. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátum, amelyben a második vegyület egy antifungális ágens.

20. Egy 19. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátum, amely antifungális ágensként 24-tiakolesztanol tartalmaz.

21. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 1. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

22. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 2. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

23. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 9. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

24. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 10. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

25. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 1. igénypont szerinti vegyület és egy hatásos mennyiségben vett, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott második vegyületet, és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

26. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 2. igénypont szerinti vegyület és egy hatásos mennyiségben vett, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott második vegyületet, és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

27. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 9. igénypont szerinti vegyület és egy hatásos mennyiségben vett, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott második vegyületet, és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

28. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 10. igénypont szerinti vegyület és egy hatásos mennyiségben vett, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott második vegyületet, és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

29. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 15. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

30. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 16. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

31. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 17. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

32. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 18. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

33. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 15. igénypont szerinti származék-vegyület-

-konjugátumot, egy 1. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

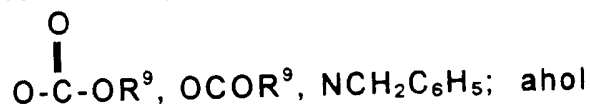
34. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 16. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot, egy 1. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

35. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 17. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot, egy 1. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

36. Gyógyszerkészítmény, amely egy hatásos mennyiségben vett 18. igénypont szerinti származék-vegyület-konjugátumot, egy 1. igénypont szerinti vegyületet és egy gyógyászatilag elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

37. Eljárás biológiai membránok permeabilizálására, azzal jellemezve, hogy a permeabilizálandó membránt egy hatásos mennyiségben vett (Ia) általános képletű vegyülettel, ahol a képletben

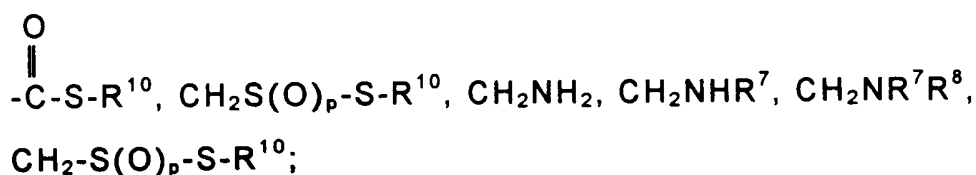
A jelentése O, OH, OR⁶, NR⁷R⁸, N₃, NHCOR⁷, OCOAr,



Ar jelentése fenilcsoport, vagy halogénatommal, C₁-C₁₂ alkilcsoporttal vagy C₁-C₃ alkoxicssoporttal egy-háromszorosan helyettesített fenilcsoport;

a jelentése (α)- vagy (β)-konfigurációjú egyszeres kötés, azzal a megkötéssel, hogy amennyiben A jelentése oxigénatom, úgy a jelentése kettős kötés;

R⁵ jelentése CO₂R¹⁰, CH₂OR⁹, CONH₂, CONHR⁷, CONR⁷R⁸,



R^6 jelentése egy 1-10 monoszacharidból álló glikozil-rész, amelynek mindegyik monoszacharid egységében az anomer szénatomokon a glikozides kötés konfigurációja egymástól függetlenül (α) vagy (β);

R^7 és R^8 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, C_1 - C_4 alkilcsoport, C_3 - C_7 cikloalkilcsoport, C_4 - C_{10} alkil-cikloalkil-csoport, fenil-, benzilcsoport vagy R^7 és R^8 együttesen egy $(\text{CH}_2)_f$ képletű csoportot képeznek, ahol f értéke 3 - 6;

R^9 jelentése hidrogénatom vagy C_1 - C_3 alkilcsoport;

R^{10} jelentése hidrogénatom, C_1 - C_{10} alkilcsoport, C_1 - C_{10} alkenilcsoport, C_1 - C_{10} alkinilcsoport, fenil- vagy benzilcsoport;

p jelentése 0, 1 vagy 2;

n jelentése 0, 1 vagy 2;

vagy valamely gyógyászatilag elfogadható sójával hozzuk kölcsönhatásba.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy A helyén OH, O-CO-OR⁹, OCOC₆H₄, OCOC₆H₄-pOMe vagy NH₂ csoportot tartalmazó vegyületet használunk.

39. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy a jelentésében egyszeres kötést tartalmazó vegyületet használunk.

40. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy R⁵ helyén CO₂R¹⁰

vagy CONR^7R^8 képletű csoportot tartalmazó vegyületet használunk.

41. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy R^6 glikolcsoport helyén egy monomer (α)-glikozidos kötésű monoszacharidot tartalmazó vegyületet használunk.

42. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy R^6 glikolcsoport helyén egy monomer (β)-glikozidos kötésű monoszacharidot tartalmazó vegyületet használunk.

43. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként egy R^{10} helyén hidrogénatomot vagy $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ alkilcsoportot tartalmazó vegyületet használunk.

44. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy monoszacharidként 2,3,4,6-tetra-O-benzil-D-glükózt használunk.

45. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy monoszacharidként 2,3,4,6-tetra- O-benzil-D-glükózt használunk.

46. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy monoszacharidként D-glükózt használunk.

47. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy monoszacharidként D-glükózt használunk.

48. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként

- A helyén OH, OCOC_6H_5 , $\text{OCOC}_6\text{H}_4\text{-pOMe}$, NH_2 csoportot;
- a helyén egyszeres kötést,

- R^5 helyén CO_2R^{10} , $CONR^7R^8$ képletű csoportot;
- R^6 glükózilcsoportként egy adott esetben védett, (α) vagy (β) glikozid-kötésű hexózt; és
- R^{10} helyén hidrogénatomot vagy C_1 - C_{10} alkilcsoportot tartalmazó vegyületet használunk.

49. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

50. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -hidroxi-cisz-5,210-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsavat használunk.

51. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

52. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-25-triptofanil-kólsavat használunk.

53. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -etil-karbonát-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

54. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -O-benzoil-cisz-5,210-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

55. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -O-p-metoxi-benzoil-cisz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

56. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -O-benzoil-cisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

57. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -hidroxi-cisz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsavat használunk.

58. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -O-benzoil-transz-5,10-bisz- α,α -7,12-glükózil-kólsav-metil-észtert használunk.

59. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy (Ia) általános képletű vegyületként 3α -hidroxi-transz-5,10-bisz- β,β -7,12-glükózil-kólsavat használunk.

60. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a permeabilizáló vegyülettel és egy második, diagnosztikusan, profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott vegyülettel hozzuk kölcsönhatásba.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a második vegyülettel, a második vegyületből és a permeabilizáló vegyületből készített keverék formájában hozzuk kölcsönhatásba.

62. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a második vegyülettel, a második vegyületnek a permeabilizáló vegyülethez való konjugálásával hozzuk kölcsönhatásba.

63. A 62. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy permeabilizáló ágens nem-konjugált formában is alkalmazunk.

64. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a permeabilizáló ágenssel mintegy 0,005 mM és mintegy 0,5 mM közötti koncentrációban hozzuk kölcsönhatásba.

65. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a permeabilizáló ágenssel mintegy 0,005 mM és mintegy 0,01 mM közötti koncentrációban hozzuk kölcsönhatásba.

66. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a membránt a permeabilizáló ágenssel mintegy 0,005 mM és mintegy 0,5 mM közötti koncentrációban hozzuk kölcsönhatásba.

67. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben a glikozil-rész egy hexóz, amely lehet D-allóz, D-altróz, D-glükóz, D-mannóz, D-gulóz, D-idóz, D-galaktóz, D-talóz vagy ezeknek egy dezoxi-származéka.

68. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben a glikozil-rész egy furanóz, amely lehet D-ribóz, D-arabinóz, D-xilóz vagy ezeknek egy dezoxi-származéka.

69. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, ahol R^5 egy az anomer szénatomján α -glikozid-kötésű monoszacharidot tartalmaz.

70. Egy 1. igénypont szerinti vegyület, ahol R^5 egy az anomer szénatomján β -glikozid-kötésű monoszacharidot tartalmaz.

71. Eljárás az 1. igénypont szerinti (Ia) általános képletű vegyület előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy védett glikozidot - amelyet a szakember számára jól ismert, egy cukor átalakítására alkalmas, szokásos módszerrel állítunk elő -, ahol a cukor valamennyi pozíciójában, kivéve az anomer pozíciót, az oxigénatomokat azonos vagy különböző védőcsoporttal védjük,

b) egy -S-R egységgel, ahol R jelentése C_1-C_{10} alkilcsoport, piridil-, furil-, tienil-, fenilcsoport vagy halogénatommal, C_1-C_3 alkilcsoporttal, nitrocsoporttal, C_1-C_3 alkoxycsoporttal egy-háromszorosan helyettesített fenilcsoport, szokásos körülmények között reagáltatunk, és a kapott védett tio-glikozidot

c) m-klór-perbenzoesavval reagáltatjuk, majd a kapott megfelelő szulfoxid-származékból

d) egy triflátot tartalmazó vegyülettel, például triflik-anhidriddel, metil-trifláttal vagy trimetil-szilil-trifláttal, egy aktivált glikoziláló intermediert képezünk, amelyet

e) egy szteroiddal - amelyben a nem-glikozilezendő oxigénatomokat előzőleg szokásos módszerekkel védjük -, 2,6-di(terc-butil)-4-metil-piridin jelenlétében, $(\alpha),(\alpha)$ glikozid-kötés létesítésére toluolban, vagy $(\beta),(\beta)$ glikozid-kötés létesítésére propionitrilben reagáltatunk, majd az így kapott vegyületből

(f) a védőcsoportokat szokásos módszerekkel eltávolítjuk.

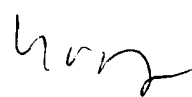
A meghatalmazott:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

Szemző Györgyné

szabadalmi ügyvivő

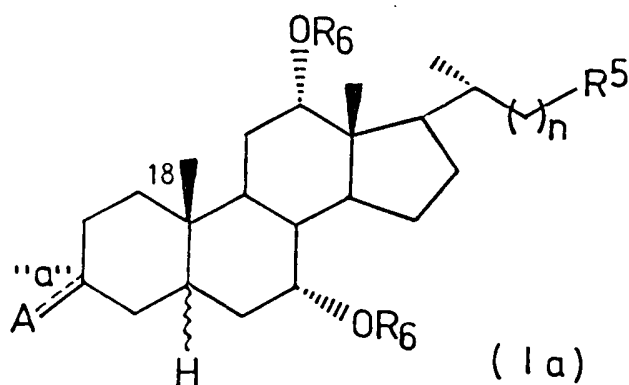
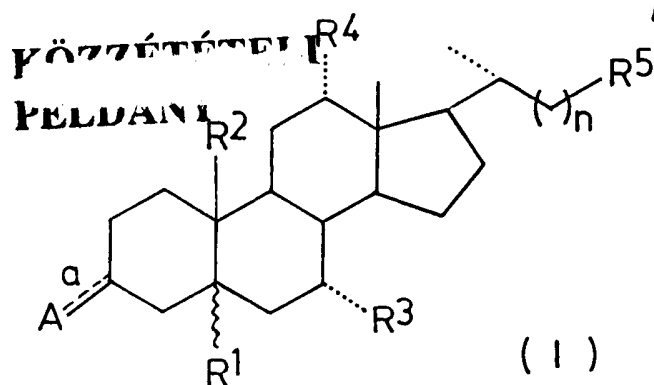



1745/94

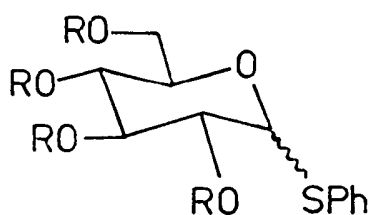
234.1.1

70743

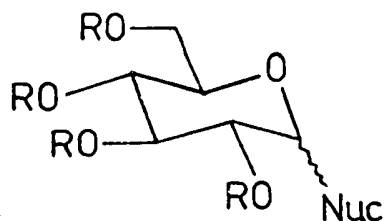
4/1



I. reakcióvázlat

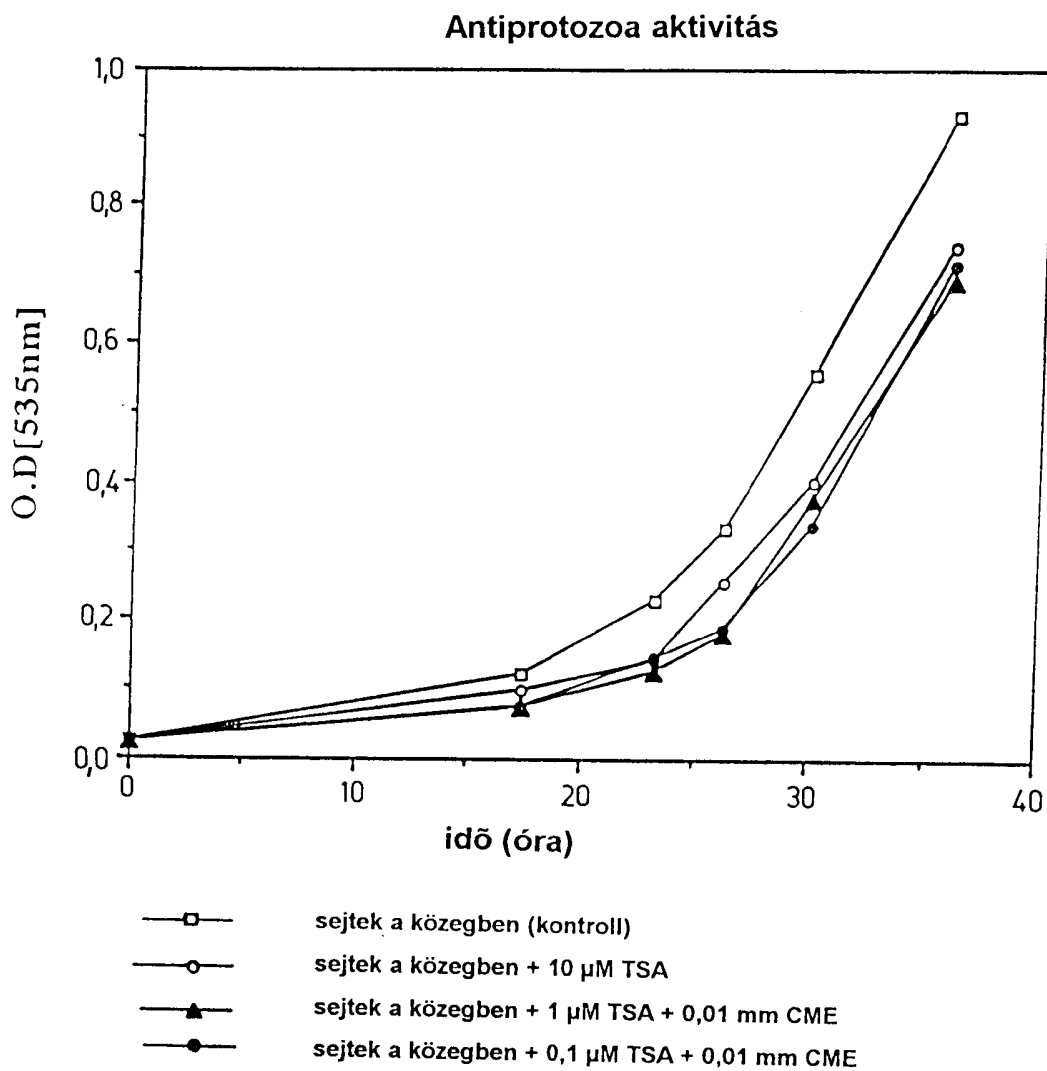


1. m-CPBA
2. Tf₂O, -78 °C
3. nukleofil, bázis



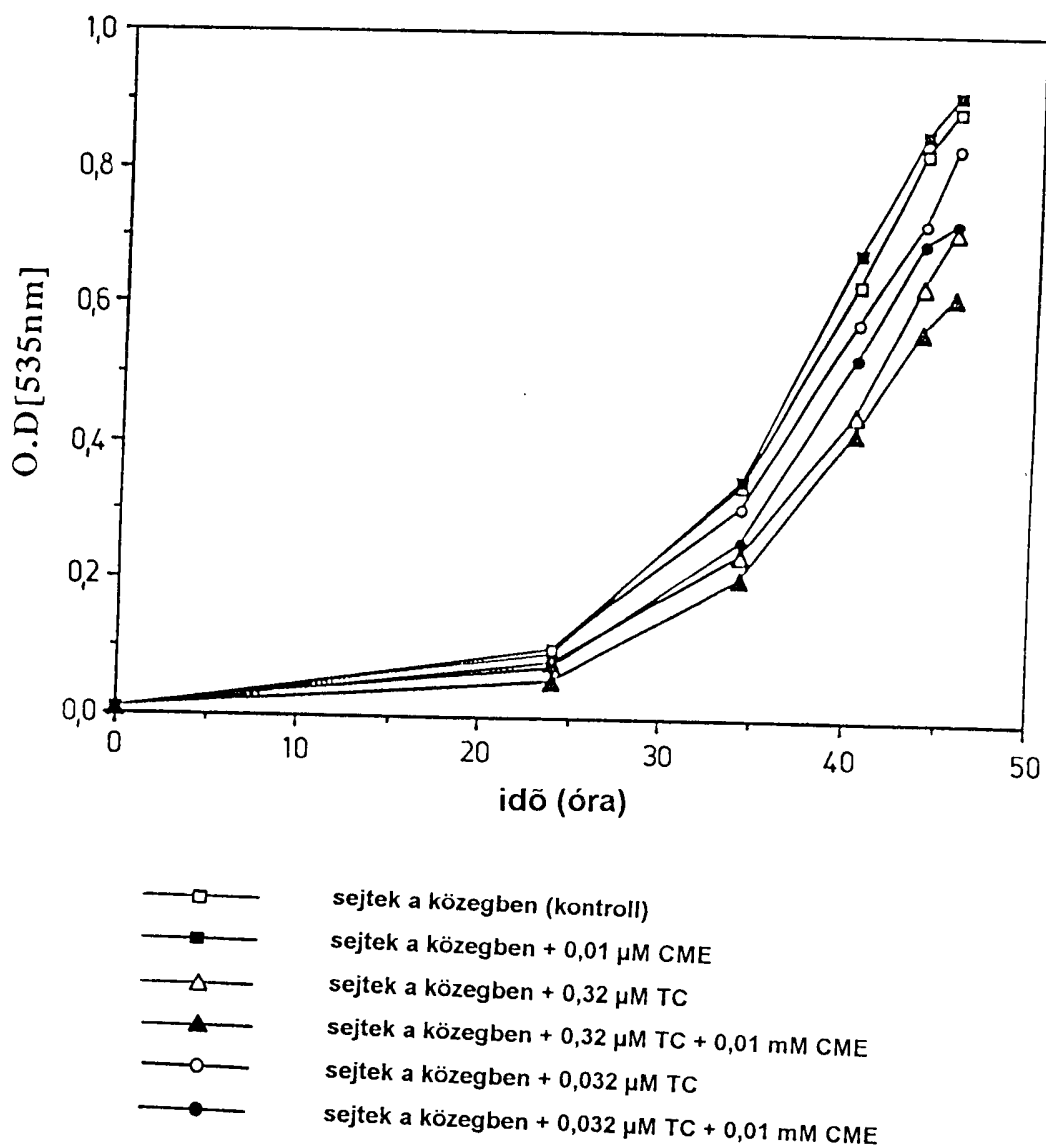
DANUBIA
Gémi és Védjegy Iroda
4. 1994.

Handwritten signature



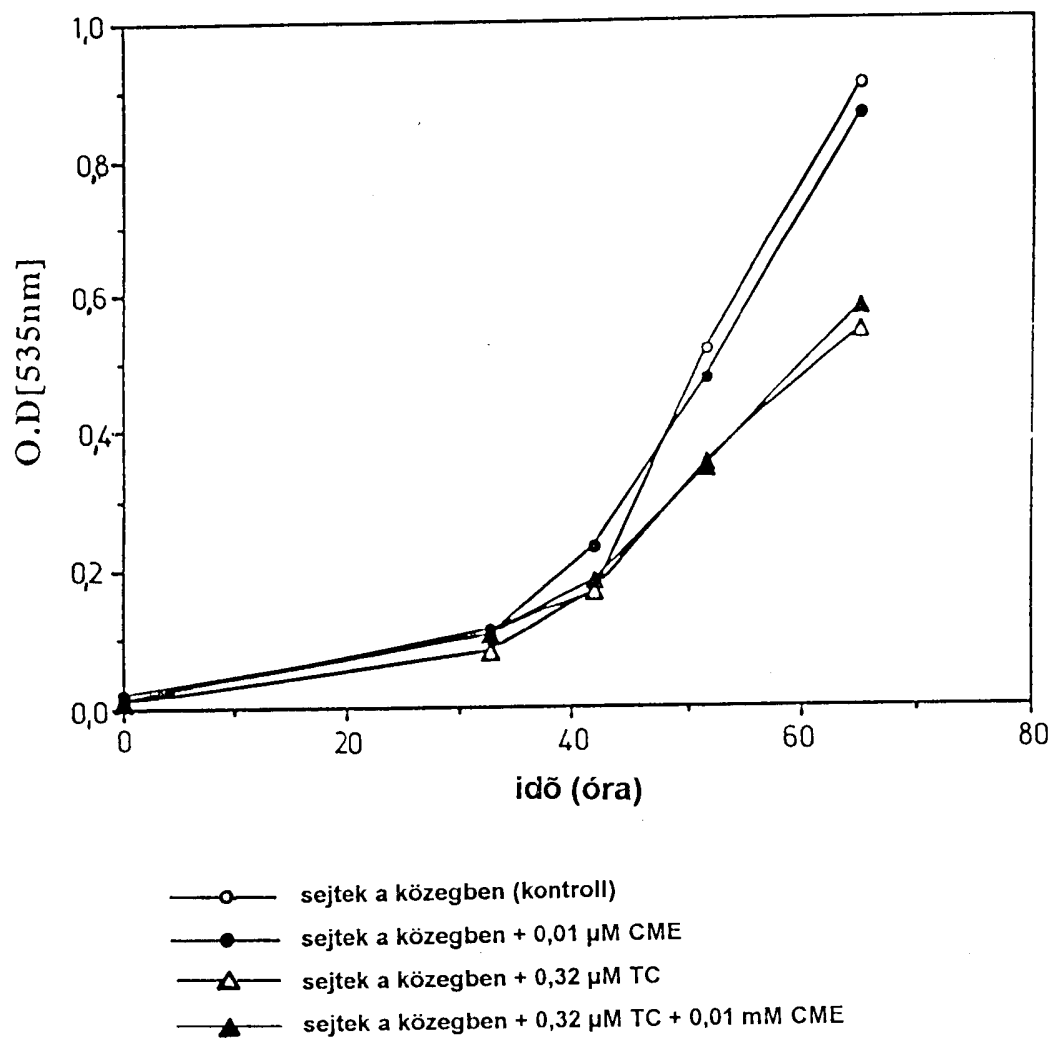
1. ábra

Antiprotozoa aktivitás



2. ábra

Antiprotozoa aktivitás



3. ábra