

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**210 923 B**

(21) A bejelentés ügyszám: 4640/90  
(22) A bejelentés napja: 1990. 07. 26.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
48246 A/89 1989. 07. 27. IT

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 07 H 15/00**  
C 07 H 15/10  
A 61 K 31/70

(40) A közzététel napja: 1991. 01. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1995. 09. 28.

(72) Feltalálók:

Romeo, Aurelio, Róma (IT)  
Della-Valle, Francesco, Padova (IT)

(73) Szabadalmas:

FIDIA S.p.A., Abano Terme (IT)

(74) Képviselő:

ADVOPATENT Szabadalmi Iroda, Budapest

### (54) **Eljárás félszintetikus gangliozid analógok és az ilyen hatóanyagot tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás félszintetikus, helyettesítetlen, 1–11 szénatomos alkán-karbonsavakból származó acilcsoportokat tartalmazó N-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok, valamint helyettesítetlen, 1–24 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportokat tartalmazó N'-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok és a fenti gangliozidok szialinsav-karboxilcsoportjain képezett 1–7 szénatomos alkil- vagy fenil-(1–4 szénatomos alkil)-észterei, adott esetben 1–7 szénatomos alkil-, di-(1–4 szénatomos alkil)-, 1–7 szénatomos hidroxil-alkil-, fenil-(1–4 szénatomos-alkil)- vagy di(1–7 szénatomos alkil)-amino-(1–7 szénatomos-alkil)-csoporttal helyettesített amidjai és/vagy belső észterei és/vagy 1–7 szénatomos alkanoilcsoportú hidroxil-peracilátjai, fémsói, szerves

bázis-sói és savaddíciós sói előállítására, azzal a megszorítással, hogy az olyan diacil-származékokban, amelyekben az N'-acilcsoport helyén acetilcsoport áll, az N-acilcsoport csak 1–11 szénatomos alkánsavból származó acilcsoport lehet és az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítása, nem tartozik a találmány körébe, és sói, valamint e vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására.

A vegyületek hatásosnak bizonyultak az idegrendszeri megbetegedések kezelésében, mivel gátló hatást fejtenek ki a proteinkináz-C aktivitására.

A találmány szerinti vegyületek alkalmazhatók ischemia, epilepszia, Parkinson-kór és mentális rendellenességek gyógyítására, mérséklésére is.

A találmány új félszintetikus GM<sub>1</sub>-gangliozid-származékok és ezeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. Közelebbről meghatározva, a találmány eljárás helyettesítetlen, 1–11 szénatomos alifás karbonsavakból származó acilcsoportot tartalmazó N-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok és helyettesítetlen, 1–24 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportokat tartalmazó N'-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok, valamint alább részletesen meghatározott észterek, amidjaik, belső észterek és peracilezett származékaik előállítására, azal a megszorítással, hogy az N'-acilcsoport helyén acetilcsoportot tartalmazó N,N'-diacil-származékokban az N-acilcsoport csak 1–11 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoport lehet, és az N,N'-diacetil-N,N'-di-lizo- és N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítása nem tartozik a találmány körébe. A találmány kiterjed az új GM<sub>1</sub>-gangliozidok gyógyászati szempontból elfogadható sóinak az előállítására is.

A gangliozidok az (I) általános képlettel ábrázolható különböző egységes vegyületek elegyei, amelyek egy oligoszacharid részt tartalmaznak, amely általában mindegyik gangliozidban kémiaiilag jól meghatározott vegyületet jelent, továbbá egy szialinsavas részt tartalmaznak, amely egy vagy több szialinsavat jelent és végül egy ceramid rész tartozik alkotóelemeihez oly módon, hogy különböző szialinsavak és különböző ceramidok elegyei vesznek részt a gangliozidok felépítésében.

A szialinsavak a (II) általános képletű neuraminsav acilezett származékai, ahol az aminocsoport ecetsavval vagy glikolsavval acilezett alakban van jelen és a hidroxilcsoportok is ezekkel a savakkal észterifikálhatók.

A ceramid csoport valamely (III) vagy (IV) általános képletű N-acil-szfingozin-csoportot jelent, ahol n jelentése 6 és 18 közötti egész szám és az acilcsoport egy telített vagy telítetlen 16–22 szénatomos zsírsavból vagy az ezeknek megfelelő hidroxisavból levezethető csoport.

A gangliozidokban lévő szialinsav- és ceramid-maradékok tehát a korábbiakban megadott képletű csoportok elegyei és ez vonatkozik a szakirodalomban ismertetett tisztított gangliozidokra is.

A gangliozidokban jelenlévő szialinsavak száma 1 és 5 között változik. A szialinsav-maradékok egy ke-tonkötéssel kapcsolódnak az oligoszacharidokhoz, amely kötés a 2-es helyzetben lévő hidroxilcsoportból és az oligoszacharid hidroxilcsoportjából alakul ki.

Több szialinsav egymáshoz való kapcsolódása esetén a molekulák úgy kapcsolódnak egymáshoz, hogy a ketonkötés két szialinsav között a 2-es és a 8-as helyzetű hidroxilcsoport között jön létre. A gangliozidok szialinsavjai, beleértve a fent említett tisztított gangliozidokat is, különböző kémiaiilag egységes savak elegyei, ilyenek például az N-acetil-neuramin- és N-glikoil-neuramin-savak, amelyekben az előző van túlsúlyban, továbbá ezek egy vagy több O-acil-származéka is részt vehet az elegyben, mint például a 8-O-acil-származékok. Az oligoszacharidok legfeljebb 5 monoszacharidból vagy ezek acil-amino-csoportot tartalmazó származékaiból tevődnek össze, különösen előnyösek a hexozok és ezek előbb említett származékai. Az oligoszacharidban legalább egy glükóz- vagy galaktóz-molekula mindig jelen van; az előbb említett cukrok acil-amino-származékai közül a leggyakrabban előforduló maradék az N-acetil-glükóz-amin és az N-acetil-galaktóz-amin.

A „lizo-gangliozid” kifejezés a szakirodalomban olyan vegyületeket jelent, amelyek a természetes előfordulású gangliozidokból állíthatók elő oly módon, hogy a sphingozin-nitrogénhez kapcsolódó acilcsoportot elimináljuk. Az eliminálást enzimatikusan hajtjuk végre, például gliko-szfingolipid-ceramid-deaciláz enzimmel történő hasítás útján. Az ilyen típusú hidrolízis során a neuraminsav acil-amino- és acil-hidroxil-csoportjai érintetlenül maradnak. Ha ezeket a csoportokat is deacilezni kívánjuk, hogy így két szabad aminocsoportot tartalmazó gangliozid-származékot kapjunk, vagyis a szfingozin-nitrogénen és neuraminsavas nitrogénen is szabad csoportok legyenek, akkor kémiai hidrolízisre, például híg kálium-hidroxid-oldattal történő hidrolízisre van szükség. A neuraminsavas nitrogénen lévő acilcsoport lehasítása útján nyert gangliozid-származékokat a szakirodalomban általában „de-N-acetil-gangliozidoknak” nevezik, mivel az acilcsoport általában acetilcsoportot képvisel. A két nitrogénatomot a szfingozin és a neuraminsav maradékban N, illetve N' jelöléssel látjuk el, így az „N'-lizo-gangliozid” elnevezést az előbbi de-N-acetil-gangliozidok elnevezésére használhatjuk ugyanúgy, mint ahogy a lizo-gangliozid elnevezést használjuk a szfingozid-részben szabad aminocsoportot tartalmazó származékoknál és amelyeket pontosabban „N-lizo-gangliozidoknak” kellene nevezni. Másrészt az „N,N'-di-lizo-gangliozidok” elnevezés két szabad aminocsoportot tartalmazó vegyületeket jelent. Találmányunk ismertetése során ezt az elnevezést fogjuk használni.

A találmány szerint előállítható vegyületek közé tartoznak azok a GM<sub>1</sub>-gangliozid-származékok, amelyek a neuraminsavas nitrogénen egy acetilcsoportot és a szfingozin nitrogénen 1–11 szénatomos acilcsoportot tartalmaznak. Találmányunk oltalmi körébe tartozik az olyan N-acil-lizo-GM<sub>1</sub>-gangliozidok előállítása is, amelyek enzimatikusan hasítás útján kapott lizo-gangliozidok származékai és így ennek megfelelően a természetben előforduló gangliozidokhoz hasonlóan a szialinsavakban acil-amino-csoportokat tartalmaznak, amelyek az ecetsavból és kisebb mértékben glikolsavból levezethető acilcsoportok és a hidroxilcsoportokat észterező más acilcsoportok elegyei. Az „N-lizo-gangliozidok” vagy „N-acil-lizo-gangliozidok” kifejezést ennek értelmében a szabadalmi leírásunkban azoknak a származékoknak az elnevezésére használjuk, amelyek „természetes eredetű” vegyületek, mint például a természetes N-lizo-GM<sub>1</sub> és azoknak az elnevezésére is, amely vegyületek a neuraminsavas nitrogénen egységes acetilcsoportot tartalmaznak, de az elnevezéskor ezt nem tüntetjük fel vagy pedig az N,N'-di-lizo-gangliozidok származékaként jelöljük, például N,N'-di-acetil-N,N'-

di-lizo-GM<sub>1</sub> elnevezést használjuk. Az „acil-di-lizo-gangliozidok” elnevezést a találmányunk szerinti valamennyi új vegyület megjelölésére fogjuk használni. Ahogy látni fogjuk, lehetséges a gangliozidok szelektív dezacilezése a nitrogénen és a neuraminos hidroxilcsoportokon, például híg alkális hidroxid-oldatokkal történő lehasítás útján. Ezekben a vegyületekben a neuraminos részen lévő aminocsoportnak acetil- vagy glikolil-csoporttól eltérő acilcsoporttal történő acilezése olyan N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat eredményez, amelyek természetes eredetű gangliozid-részt tartalmaznak, magasabb szénatomos alifás savakból származó acilcsoportok vannak jelen. Ezek az előnyös csoportot képező találmányunk szerinti új származékok N'-acil-N'-lizo-gangliozidok elnevezéssel fognak a későbbiekben szerepelni, mint például az N'-propionil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>, N'-pivaloil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>, N'-sztearoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> és hasonlók. Az N-acil-, illetve N'-acil-di-lizo-gangliozidok körébe így beletartoznak azok az ilyen vegyületek is, amelyekben az N-acil-, illetve N'-acil-csoport azonos a természetes származékban előforduló N-acil- vagy N'-acil-csoporttal.

A találmány szerint előállítható új vegyületek olyan szemiszintetikus gangliozid-analógok, amelyek eltérnek az ismert gangliozidoktól az egységes és jól meghatározott acilcsoportok tekintetében a szfingozin és/vagy neuraminos nitrogénatomon (kivételet képeznek a természetes eredetű N-acil-N-lizo-gangliozidok és az N'-acil-N'-lizo-gangliozidok) és a természetes eredetű termékekből eltérő kombinációjú acilcsoportokat tartalmaznak. A találmány szerinti N-acil-N-lizo-gangliozidokban az acilcsoportok a természetes eredetű termékekben lévő zsírsavaknál rövidebb szénláncú telített zsírsavakból vezethetők le, azaz legfeljebb 11 szénatomosak, továbbá elágazó láncúak is lehetnek. Ezekben a származékokban, ha a neuraminos nitrogénatomon lévő acilcsoport az acetyl-csoporttól eltérő, akkor a szfingozin nitrogénatomon lévő acilcsoportok a fenti típusúak lehetnek vagy pedig hosszabb szénláncú savakból származó acilcsoportok lehetnek, amelyek jellemzőek a természetes előfordulású gangliozidokra és olyan homológok is lehetnek, amelyek nagyobb molekulatömegűek és legfeljebb 24 szénatomosak. A szialinsavas részben szabad aminocsoportokat tartalmazó származékokban a szfingozin nitrogénatomon „természetes” acilcsoportok rövidebb homológjai is előfordulnak.

A találmány fenti meghatározásának körébe tartozó di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok kettőnek a kivételével új vegyületek; az említett két már ismert vegyület a következő:

N,N'-diacetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> [Medical Biology, 52., 229–257 (1974)] és

N'-acetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> [J. Lipid Res., 26., (2), 248–257 (1985)];

e két GM<sub>1</sub> gangliozid előállítása nem tartozik a jelen találmány körébe.

A találmány szerinti eljárással előállítható új GM<sub>1</sub> gangliozidok, valamint észter-, belső észter-, amid- és peracilezett származékaik hasonló jellegű előnyös far-

makológiai tulajdonságokat mutatnak, mint amilyenek az említett ismert analóg vegyületeknél voltak tapasztalhatóak. Találmányunk ezért az új GM<sub>1</sub> gangliozid vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására is irányul.

5 Találmányunk kiterjed az új GM<sub>1</sub> gangliozidok szialinos karboxilcsoportjain képezett funkcionális származékaira, mégpedig az 1–7 szénatomos alkil- és fenil-(1–4 szénatomos alkil)-észterek az adott esetben 1–7 szénatomos alkil-, di-(1–4 szénatomos alkil), 1–7 szénatomos hidroxil-alkil- vagy fenil-(1–4 szénatomos alkil)- vagy di-(1–7 szénatomos alkil)-amino-(1–7 szénatomos alkil)-amidok, valamint a peracilezett származékok (ez utóbbiakon a gangliozid-molekula szabad hidroxilcsoportjain is acilezett származékokat értjük) előállítására, továbbá a fenti meghatározásnak megfelelő új GM<sub>1</sub>-gangliozidok fém- és ammóniumsóinak, szerves bázisokkal képezett sóinak és savaddíciós sóinak az előállítására is.

20 Találmányunk tárgya tehát szemiszintetikus gangliozidok előállítására irányul, ilyen vegyületek az alábbiak:

N-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidok, amelyben az acilcsoport 1–11 szénatomos telített alifás, helyettesítetlen savakból vezethető le,

25 N'-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidok, amelyekben az acilcsoport 1–24 szénatomos helyettesítetlen, telített alifás savakból vezethető le, azonban olyan diacil-származékok esetében, ahol az N'-acilcsoport acetyl-csoportot képvisel, a szénatomok száma csak 1–11 lehet, továbbá ezen vegyületeknek a szialinsav-részben kialakított észterei és/vagy amidjai és/vagy belső észterei és/vagy peracilezett származékai és szerves bázisokkal alkotott fém-sói vagy savakkal alkotott savaddíciós sói, továbbá ezen vegyületek elegyei, kivételet képeznek az N,N'-diacetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N'-acetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>.

30 A találmány szerinti új N-acil-származékok előállításához kiindulási anyagul szolgáló lizo-gangliozidok elsősorban azok, amelyek a természetben előforduló anyagokból, elsősorban a gerincesek központi és perifériális idegrendszerének szöveteiből, mellékveseivelőlől, erithrocitákból, lépből és más szervekből kiextrahálható gangliozidok deacilezésével állíthatók elő. Ezek lehetnek az irodalomban meghatározott tiszta gangliozidok, például azok, amelyek a szacharid-részben egységes szerkezetűek vagy gangliozidok elegyei is.

50 E gangliozidok között említjük meg például azokat, amelyekben az oligoszacharidot legfeljebb 4-hexózmaradék alkotja és amelyikben a szacharid-glukozamin és N-acetyl-galaktóz-amin csoportjából választható ki (A gangliozid-csoport). Az ebből a csoportból származó gangliozidok a gerincvelőlől extrahálhatók ki; ilyenek a Lloyd A. Witting Ed., American Oil Chemists Society, Champaign, III, 187–214 (1976), „Gangliosides of the Nervous System” (Glycolipid Methodology) közleményben ismertetett, GM<sub>1</sub> gangliozidok.

60 Az (I) általános képlet szerinti GM<sub>1</sub> gangliozidok

szerkezetét az (V) általános képlet szemlélteti, különösen jól mutatja a szacharid-részek, a szialinsavak és a ceramid közötti kötések és a tiszta GM<sub>1</sub> gangliozid teljes szerkezeti képletét, amely csak egyetlen szialinsavat tartalmaz, vagyis N-acetil-neuramin- vagy N-glikolil-neuraminsavat.

Lényegében ugyanez a képlet érvényes a találmány szerinti GM<sub>1</sub> gangliozid-származékokra is, azzal az eltéréssel, hogy a ceramid-részt a megfelelő „mesterséges” ceramiddal helyettesítjük, ahol az N-acil-csoport a fent említett és/vagy a későbbiekben felsorolt alifás savakból vezethető le és amelyben az acilcsoportot a neuraminos nitrogénatomon az új vegyületek „Witting-féle” meghatározás szerinti valamelyik savmaradékával helyettesítjük.

Találmányunk oltalmi körébe tartozik az olyan új N-acil-lizo-gangliozid-elegyek előállítására is, amelyek a különböző állati szövetek extraktumaiban, így a teljes extraktumban vagy a különböző frakciókban lévő gangliozid-elegyekből vezethetők le. Ezekben az új elegyekben a gangliozid-elegyek N-acil-része egy vagy több fent említett acilcsoporttal helyettesítve van, s ezeket a termékeket úgy kapjuk meg, hogy a találmány szerinti eljárással ezeket a gangliozid-elegyeket dezacilezzük, majd ezt követően reacilezzük, kívánt esetben a gangliozidok szialin-részeinek más dezacilezett csoportjait reacilezzük.

Ismeretes, hogy a gangliozidok fontos szerepet játszanak az idegrendszerben és az utóbbi időben azt is bebizonyították, hogy a perifériális és a központi idegrendszer megbetegedéseinek gyógyítására is alkalmazhatók. [Acta Psychiat. Scand., 55., 102 (1977); Eur. Medicophys., 13., 1 (1977); Ric. Sci. Educ. Perm. Suppl. 9., 115 (1978); Adv. Exp. Med. Biol. 71., 275 (1976); Electromyogr. Clin. Neurophysiol., 19., 353 (1979); Minerva Medica, 69., 3277 (1978); Minerva Stomat., 27., 177 (1978); Med. de. Lavoro, 68., 296 (1977); Brain. Res. 197., 236 (1980).] A gangliozidok terápiás hatása úgy tűnik, főleg abban áll, hogy stimulálják az idegsejtekben a sarjadzást és az ideg-vezetésben résztvevő membrán-enzimeket, például a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)ATPáz enzimeket aktiválják [Brain Res., 197., 236 (1981); J. of Neurochem. 37., 350 (1981)]. A gangliozidok által stimulált idegi sarjadzás elősegíti a sérült idegsejtek funkcionális regenerálódását. További vizsgálatokat végeztünk abból a célból, hogy olyan vegyületeket találjunk, amelyek az idegrendszer patológiás elváltozásának gyógyításában hatékonyabbnak bizonyul, mint a gangliozidok. Ezek a vizsgálatok vezettek ahhoz a felismeréshez, hogy a gangliozidok belső észterei, amelyekben a szacharid-rész egy vagy több hidroxilcsoportját egy vagy szialilsavas karboxilcsoporttal észtereztük, azaz intramolekuláris reakciót hajtottunk végre, s ezáltal ugyanilyen számú lakton-gyűrű keletkezett, hatásosabbak, mint a gangliozidok saját maguk, tekintettel arra, hogy fokozzák az idegsejtek sarjadzását és az idegpályák ingervezetésében résztvevő enzimek membránjait aktiválják, ilyen enzimek a (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)ATPáz enzimek; vö. 4 476 119 számú (1984. október 9.), 4 593 091 számú (1986. június 3.) és 4 716 223

számú (1987. december 29.) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. A „külső” gangliozid-észterek is nagyobb aktivitást mutatnak az idegi sarjadzás és az idegpályák ingervezetése terén, vagyis az olyan észterek, amelyek a szialinsav karboxilcsoportjának különböző alifás, aralifás, aliciklikus és heterociklikus alkoholokkal történő reakciója útján keletkeznek. Hasonló tulajdonságúak a gangliozid-aminok is és az amidok, észterek és szabad gangliozidok peracilezett származékai is. Mindezen származékokat, amelyeket a 4 713 374 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás (1987. december 15.) ismertet, a találmány szerinti új vegyületek kiindulási anyagaiként használhatjuk. A találmány lényege az a felismerés, hogy az új szemiszintetikus gangliozid-származékok és ezek korábbiakban ismertetett funkcionális származékai vagy sói lényegében ugyanolyan farmakológiai hatással rendelkeznek, mint a természetes eredetű gangliozidok vagy ezek analóg funkcionális származékai, hatásukat különböző paraméterek jellemzik, például a „támadás” sebessége, az idegsejtek sarjadzásának időtartama és intenzitása, amely az acilcsoport erősebb vagy gyengébb liofil vagy hidrofil tulajdonságától függhet vagy a mellékhatás típusától és jellegétől, ami a kezelendő problémának megfelelően negatív vagy pozitív lehet, mint például a protein kináz C gátló hatása.

Sok esetben ki lehet használni az új vegyületeknek azon tulajdonságát, hogy a savak acilcsoportjainak tulajdonítható különleges hatását aknázzuk ki és eltekin-tünk a gangliozid-rész speciális hatásától, amely ilyen esetekben elsősorban vívőanyagként szolgál.

A találmány szerinti szemiszintetikus új és a fentiekben leírt ismert gangliozid-analógok a természetes termékek vagy ezek más ismert szemiszintetikus származékai helyett használhatók értékes helyettesítőként olyan betegek esetében, akik nem kedvelik a konzervatív termékekkel történő kezelési módszereket vagy olyan esetekben, amikor különösen érzékeny vagy allergiára hajlamos betegről van szó. Ahogy említettük, ezek a vegyületek használhatók vívőanyagként is a savakban lévő acilcsoport speciális farmakológiai hatása miatt. Az új gangliozid-analógok gátló hatást fejtenek ki a protein kináz C aktivitására, amely nemkívánt és negatív hatású lehet az ingervezetési funkció normális mechanizmusának bizonyos kiegyensúlyozatlan körülményei között. Ez az aktivitás serkentő hatású aminosavak, így glutamin- és/vagy aszparaginsav növekvő koncentrációja következtében lép fel; ezek a savak az előbb említett abnormális körülmények között közvetlen toxikus hatást fejtenek ki az idegsejtekre.

A találmány szerinti termékek legfőbb előnye, amely megkülönbözteti más protein kináz C gátló vegyületektől, mint maguk a gangliozidok vagy a sphingosin, abban áll, hogy képesek megelőzni és gátolni az előbb említett neurotoxikus hatást. Hangsúlyozzuk, hogy a találmány szerinti termékek a kalcium-antagonistákkal és a glutamát-receptorokkal szemben, különös tekintettel az NMDA-ra, csak abnormális körülmények között fejtenek ki hatásukat, csökkentve a lokális neurotoxicitást és fenntartva az idegi plaszticitást, ilyen

módon lehetővé teszik a károsodott fiziológiai funkciók gyorsabb helyreállítását.

Az új szemiszintetikus gangliozid-analógok fenti farmakológiai tulajdonságait mutatja az a vizsgálat, amelyet az N-pivaloil-N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyülettel végeztünk összehasonlítva a gangliozid GM<sub>1</sub> vegyülettel a tekintetben, hogy hogyan védi ki a glutamát által indukált neurotoxicitást a kisagyi sejtekben (ahol esetleg citotoxikus hatás is fellép), a neuroblasztomás sejtekben a neuritogenic hatást és in vivo körülmények között az ischemia okozta károsodást. A serkentő aminosavak receptorainak stimulációja a kisagyi sejtek primer kultúrájában a citoszol membrán és protein kináz aktiválásának transzlokációját idézheti elő. Ezt a jelenséget a glutamát által indukált Ca<sup>2+</sup> beáramlás megnövekedése okozhatja. Ismeretes, hogy glutamát adagolása ezekhez a sejtekhez sejt-károsodást okoz feltehetően azért, mert a Ca<sup>2+</sup> sejten belüli koncentrációja megnövekedik. A kisagyi sejtekben a gangliozidok gátolják a protein kináz glutamát okozta transzlokációját és aktivitását.

Továbbá, akut kisagyi ischémia után folyamatos és egyre növekvő mennyiségű serkentő aminosav keletkezik. A receptorok folyamatos és megnyújtott hatása az ischémiás területen lavinászerű jelenséghez vezet, ami további degenerációt és az idegsejtek elhalását okozza. Az atipikus eseményeket lehetetlen megállítani, de korlátozni lehet a jelenséget, amikor is a károsodott terület növekszik és az idegsejtek elhalása fokozódik.

#### Anyagok és módszerek: In vitro kísérletek

##### 1.a. Sejtkultúra

8 napos Sprague-Dawley törzszű patkányok kisagyi sejteinek primer kultúráját használtuk a 11. napon. A kultúrák >90% granulasejteket, 5% GABA neuronokat és <5% neuroglia-sejteket tartalmaznak.

##### 1.b. Neurotoxicitás indukálása glutamáttal

Sejtkultúrához glutamátot (50 μM e 100 μM/-Mg<sup>2+</sup> Locke-féle oldatban) adunk és 15 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk a kultúrát. A kontroll nem tartalmaz glutamátot. A kultúrákat ezután Locke-oldattal háromszor mossuk, majd az oldószert eltávolítjuk és a kultúrákat visszatesszük az eredeti táptalajba.

##### 1.c. A vegyület szolubilizálása, inkubálás és analitikai módszer

N-pivaloil-N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et Locke-oldatban különböző koncentrációkban (0,3 μM-50 μM) és különböző időkben szolubilizálunk:

- előkezelés: inkubálás 15 percig, majd háromszor mossuk, szérumot tartalmazó közeggel és utána Mg<sup>2+</sup>-t nem tartalmazó Locke-oldattal a neurotoxicitás indukálása előtt;
- kezelés: inkubálás 15 percig, 50 μM glutamátot adunk hozzá.

24 óra elteltével az élő sejteket megszámláljuk az alábbi módszerekkel:

- élő sejt számlálás kolorimetriás MTT-módszerrel, azaz 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-mal;
- élő sejt számlálás fluorimetriás módszerrel, amely szerint a sejt-kultúrát 3 percig 22 °C-on 36 μM fluoreszcens diacetáttal (FDA) és 7 μM propidium-jodiddal (PJ) megfestjük. A megfestett sejteket standard fluoreszcens epi-illuminációs mikroszkóppal megvizsgáljuk. Az idegsejtek károsodása esetén a diacetátos festés hiányos és így a propidium-jodid (poláros vegyület) áthatolása könnyebbé válik, a DNS-sel reakcióba lépve a komplexet pirosra festi és fluoreszcenssé válik. Az élő sejtek százalékos meghatározását az acetát/propidium-jodid fluoreszcencia mérésével végezzük el.

##### 2.a. Sejtkultúrák

N2A neuroblastoma sejtekkel beoltunk DMEM-ből és 10% foetalis borjúszérumból készült 24 adag táptalajt oly módon, hogy ezek mindegyike 10 000 sejtet tartalmazzon. A beoltás után 24 órával a táptalajt 350 μl friss táptalajjal cseréljük le.

##### 2.b. Ligade 4 szolubilizációja és inkubálása, analitikai módszer

N-pivaloil-N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és kontrollként szolgáló GM<sub>1</sub> vegyületeket kloroform és metanol 2:1 arányú elegyében eloszlatunk, majd N<sub>2</sub> áramban megszártunk, újra szuszpendáljuk a táptalajban és 50 μM vagy 100 μM-re hígítjuk. 24 óra elteltével a kultúrákat fixáljuk és a neuritikus növekedést morfológiai úton meghatározzuk.

A következőkben bemutatjuk néhány, a fent leírt módszerekkel végzett farmakológiai kísérlet eredményeit.

Az alábbi 1. és 2. táblázatban összefoglalt kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az N-pivaloil-N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozid (PADL) in vitro eredményesen véd a glutamáttal kiváltott neurotoxikus hatás ellen (1. táblázat), és neuritogenezist képes előidézni (2. táblázat). A kísérleteket a fentebb „In vitro kísérletek” cím alatt megadott feltételek között folytattuk le.

##### 1. táblázat

Az N-pivaloil-N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozid (PADL) védőhatása glutamát által kiváltott neurotoxikus hatás ellen (GM<sub>1</sub> ganglioziddal összehasonlítva, agyi granuláris sejtek primer kultúrájában)

Hatóanyag	Sejt-túlélés (%)
- (kontroll)	100
Glutamát (50 μM)	22,7
Glutamát+GM <sub>1</sub> (10 <sup>-4</sup> M)**	100,7*
Glutamát+PADL (5·10 <sup>-6</sup> M)***	86,4

\* p<0,01 glutamáttal szemben (Dunnet-teszt)

\*\* 2 órai, illetőleg

\*\*\* 15 perces előkezelés a fentebb, „In vitro kísérletek” cím alatt megadott feltételek között.

2. táblázat

*N*-Pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> gangliozid (PADL) hatása (*GM*<sub>1</sub> hatásával összehasonlítva) a neurit-képzésre neuroblasztóma (*N*<sub>2</sub>A) sejteken

Hatóanyag	Neuritiszes sejtek
– (kontroll)	1
<i>GM</i> <sub>1</sub> (10 <sup>-4</sup> M)	32*
PADL (10 <sup>-4</sup> M)	sejtleválás
PADL (5·10 <sup>-5</sup> M)**	67*

\*  $p < 0,01$  a kontrollal szemben (Dunnet-teszt)

\*\* A neuritek igen hosszúak és elágazók

Az alábbi 3. táblázatban a találmány szerinti és analóg új di-lizo-*GM*<sub>1</sub> gangliozidoknak az ideg-regeneráció serkentésére irányuló hatását szemléltető in vitro kísérletek eredményeit mutatjuk be. Megjegyezzük, hogy az e kísérletekben alkalmazott vegyületek, az *N*-lauroil-*N'*-acetyl-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> és *N*-mirisztoil-*N'*-acetyl-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> gangliozidok az *N'*-nitrogénatomon acetilcsoporttal és az *N*-nitrogénatomon 12-, illetőleg 14-szénláncos acilcsoporttal vannak acilezve, így nem tartoznak 1. igénypontunk tárgyi körébe (ugyanis ezek egy másik szabadalmi bejelentésünkben szerepeltek), de minthogy ezek a 11-nél több szénatomot tartalmazó *N*-acilcsoportok ugyanilyen irányban befolyásolják az *N'*-nitrogénatomon propionil- vagy más acilcsoportot hordozó, találmányunk körébe tartozó *GM*<sub>1</sub>-gangliozidok hatását, referencia példaként itt is közöljük ezeket a farmakológiai kísérleti eredményeket.

A kísérletekhez *N*<sub>2</sub>A sejteket alkalmaztunk, ezeket egy 10 t% magzati borjú-szérumot is tartalmazó DMEM-tápközegbe oltottuk. 24 óra múlva a kultúrákőzeget ugyanolyan térfogatú friss, de a vizsgálandó vegyületet is tartalmazó tápközegre cseréltük ki.

Mindegyik vizsgálandó vegyületet először kloroform és metanol elegyében oldottuk, majd az oldószert elpárologtattuk és a maradékként kapott vegyületet újból feloldottuk a tápközegben.

Összehasonlításul *GM*<sub>1</sub> ganglioziddal folytattuk le ugyanezt a kísérletet. 24 óra után mindegyik kultúrában megvizsgáltuk a neurit-képződést.

3. táblázat

*Az N,N'*-diacil-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> gangliozidok és a *GM*<sub>1</sub> gangliozid képessége az ideg-regeneráció serkentésére a sarjadzási aktivitás mérése alapján – neuritok képzése *N*<sub>2</sub>A neuroblasztóma sejteken

Vegyület	ED <sub>50</sub> (μM)
<i>GM</i> <sub>1</sub> gangliozid	53
<i>N</i> -lauroil- <i>N'</i> -acetyl- <i>N,N'</i> -di-lizo- <i>GM</i> <sub>1</sub>	18
<i>N</i> -mirisztoil- <i>N'</i> -acetyl- <i>N,N'</i> -di-lizo- <i>GM</i> <sub>1</sub>	15

*In vivo* kísérletek

Újszülött patkányokon a bal carotid artéria folyamatos lekötésével a 7. életnapjukon ischémiát idéztünk elő. Az állatokat ezután hagytuk 2 óra hosszat az anyjuktól szopni, hogy regenerálódjanak. Ezután hipoxiás kamrába (8% O<sub>2</sub>) helyeztük őket 2 óra hosszat. Ily módon az elzárás oldalán kortikoid zavart tapasztaltunk, ami az ingerlő aminosavakra jellemző. Az agy tömege is csökkent, pontosabban az agyféltekének azon az oldalán, ahol a zavar volt.

*N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> szolubilizálása, kezelés és paraméterek vizsgálata

*N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub>-et NaCl-oldatban szolubilizálunk, majd 10 mg/kg adaggal kezeljük az állatokat a beavatkozás előtt egy órával, majd rögtön a beavatkozás után. Paraméterként az agy tömegét mértük és kontrollként az ellenkező félteke szolgáltat. Az eredmények azt mutatták, hogy az *N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> (kezelés 15 perc) a glutamát által indukált neurotoxicitást in vitro körülmények között 1 μM koncentrációnál kivédi, 100%-os védelmet nyújt 3–10 μM koncentrációnál és 0,3 μM koncentráció alkalmazásakor nem bizonyult hatásosnak.

Az aktivitás 50 μM koncentrációig állandó marad és csupán 100 μM koncentrációnál nagyobb értéknél mutat toxicitást. Az *N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> kivédi (<100%) a glutamát által in vitro indukálta sejtelhalást még abban az esetben is, ha ezeket együttesen inkubáljuk (15 perces együttes kezelés). Az *N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> nagyobb mértékben aktív a neuroblastoma sejtek neuritogenezisének indukálásában, mint a *GM*<sub>1</sub> (4. táblázat).

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az *N*-pivaloil-*N'*-acetyl-*N,N'*-di-lizo-*GM*<sub>1</sub> gangliozid-származék képes a glutamát-indukálta neurotoxicitás kivédésére in vitro körülmények között, továbbá mérsékli in vivo körülmények között az agy ischémiá következtében beálló károsodását. Az új származék tehát a glutamát okozta károsodásokat, például az agyi ischémiát, traumát, epilepsziát, Huntington-kórt, Parkinson-kórt, időskori zavarokat, elmebaj, agyi rendellenességeket, hypoglykémiát és hypoxiát kivédi, mérsékli.

Megjegyzendő azonban, hogy bizonyos agykárosodási mechanizmusok is jelen vannak, például a neurokardiovaszkuláris károsodások.

4. táblázat

Vegyület	Neuritikus sejt%
Kontroll	3±2%
<i>GM</i> <sub>1</sub> (100 μM)	77±8%
PADL (100 μM)	sejtleválás
(50 μM)	81±7%

A fenti szemisztetikus gangliozid-analógok farmakológiai tulajdonságaik miatt hatóanyagként az alábbi kóresetekben használhatók:

agyi ischémiá, metabolitikus encephalopathiák, például a hypoglykémia és hypoxia, toxikus eredetű

encephalopathiák, trauma, öregedés, epilepszia, neurodegeneratív megbetegedések, például Parkinson-kór és Huntington-kór és szellemi fogyatékoságok.

A találmány szerinti N-acil-lizo-gangliozidok és N,N'-diacil-di-lizo-gangliozidok acilcsoportjai 1–11 szénatomos telített, egyenes- vagy elágazóláncú savakból vezethetők le, ilyenek a hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav és valeriánsav, így normál valeriánsav vagy izovaleriánsav, trimetil-ecetsav (pivalinsav), kapronsav, izokapronsav, enantiosav, kaprilsav, pelargon-sav, kaprinsav és undecilsav, di-terc-butil-ecetsav és 2-propil-valeriánsav.

A hosszabb szénláncú savak, így egészen 24 szénatomos savak közül említésre méltók az egyenesláncú, előnyösen 12–16 szénatomos savak, például a laurilsav, mirisztinsav és palmitinsav és az ennél is hosszabb szénláncú savak, például az elaidinsav, sztearinsav és eikozakarbonsav.

Az elágazó szénláncú acilcsoportokban, így a rövidebb szénláncú, 1–11 szénatomos és a hosszabb láncú, 12–24 szénatomos acilcsoportokban az oldalláncok előnyösen rövid szénláncú alkilcsoportok lehetnek legfeljebb 4 szénatommal, így például metilcsoportok.

Az új acil-lizo-gangliozidok közül különösen fontosak az N,N'-diacil-di-lizo-gangliozidok, elsősorban azok, amelyek a fent felsorolt bázikus gangliozidokból és a külön megemlített savakból vezethetők le. Ezek közül példaként az alábbiakat említjük meg:

N,N'-di-formil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-butiril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-pivaloil-N,N'-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-valeril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-oktanoil-N,N'-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-lauroil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-2-propil-pentanoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-hexanoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-izovaleril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-önantil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-pelargonil-N,N'-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-terc-butil-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-palmitoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-lauroil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N,N'-di-sztearil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>.

Néhány, mindössze egy N- vagy N'-acilcsoportot tartalmazó származék:

N-formil és N'-formil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-acetil és N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-propionil- és N'-propionil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-butiril és N'-butiril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-pivaloil és N'-pivaloil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-valeril és N'-valeril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-lauroil és N'-lauroil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-2-propilpentanoil és N'-2-propilpentanoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-hexanoil és N'-hexanoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-izovaleril és N'-izovaleril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N-terc-butil-acetil és N'-terc-butil-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N'-palmitoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,  
 N'-sztearil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>.

A találmány szerinti szemisztetikus gangliozid analógok ismert úton állíthatók elő oly módon, hogy di-lizo-gangliozidokat vagy ezeknek N-acil- vagy N'-acil-származékait acilezzük vagy az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat a szfingozin vagy neuraminos nitrogénatomon szelektíven dezacilezzük.

Olyan diacil-származékok esetében, amelyekben az acil-amino-csoportok ugyanabból a savból vezethetők le, az egyszerűség kedvéért előnyösen a di-lizo-gangliozidokat ismert módszerek szerint egy lépésben acilezzük. Di-lizo-gangliozidokat állíthatunk elő gangliozidokból vagy N-lizo-gangliozidokból alkálikus hidrolízis útján, így például tetraalkil-ammónium-hidroxiddal, kálium-hidroxiddal vagy más alkálikus vegyületekkel végzett hidrolízissel.

A találmány szerinti, különböző savakból származó alkil-amino-csoportot tartalmazó vegyületek előállításához kiindulási vegyületekként előnyösen a di-lizo-gangliozidok N- vagy N'-monoacil-származékait használjuk. Az N-monoacil-származékokat úgy állítjuk elő, hogy a di-lizo-gangliozidokat szelektíven acilezzük, tekintettel arra, hogy a szfingozin aminocsoport lényegesen reakcióképesebb, mint a neuraminos aminocsoport. A di-lizo-gangliozidok ismert módszerek szerinti enyhe körülmények között történő acilezése, például a peptid-kémiában szokásos acilezése során a szfingozin nitrogénatomon monoacilezett fenti származékokat állíthatjuk elő. Ezeket azután a neuraminos nitrogénatomon a szokásos módon acilezzük. A találmány szerinti vegyületek előállítására alkalmazott acilezési eljárás ebben az esetben egy kétlépéses acilezési reakciót jelent.

A neuraminos nitrogénatomon monoacilezett vegyületek előállítására több módszert lehet alkalmazni. Így például kiindulhatunk di-lizo-gangliozidokból, majd a szfingozin nitrogénatomon egy közbülső védőcsoportot alakítunk ki például foszfatidil-kloriddal végzett hidrofób reakció útján vagy egy alkalmas védőcsoporttal történő acilezés útján, amit a neuraminos nitrogénatomon egy alkalmas sav-származékkal végzett acilezés követ, majd ezután a szfingozin nitrogénatomon elvégezzük a dezacilezést. Végül a di-lizo-gangliozidok acilezését a két aminocsoporton elvégezhetjük ugyanazzal a savval és a diacil-származékot enzim úton szelektíven dezacilezzük, amikor is a szfingozin nitrogénatomon lévő acil-amino-csoportot szelektíven lehasítjuk; ilyen enzim például a glikoszifingolipid-ceramid-deaciláz enzim. Az N-monoacil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat előállíthatjuk úgy is, hogy az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat a neuraminos nitrogénatomon kémiai úton szelektíven, például 0,1 mólos alkoholos kálium-hidroxid-oldattal hidrolizáljuk.

Az így kapott acil-di-lizo-gangliozidokat kívánt esetben átalakíthatjuk oly módon, hogy a szialinsavak karboxilcsoportjait vagy ezeknek a savaknak a hidroxilcsoportjait átalakítjuk például észterekké vagy amidjaikká vagy pedig az észterifikált csoportok hidroxilcsoportjait savakkal peracilezzük.

Az N-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat – ahol az

acilcsoport 1–11 szénatomos helyettesítetlen alifás savakból vezethető le – az N'-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat és az N,N'-diacil-di-lizo-gangliozidokat – ahol az acilcsoport 1–24 szénatomos helyettesítetlen alifás savakból vezethető le, illetőleg azokban a diacil-származékokban, ahol az N'-acil-csoport jelentése acetyl-csoport, ott a szénatomok száma 1–11 lehet (kivételet képeznek az N,N'-diacetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N'-acetyl-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>), úgy állítjuk elő, hogy valamely N,N'-di-lizo-gangliozidot acilezünk a fentiekben felsorolt vegyületeknek megfelelő savakkal vagy N-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat vagy N'-acil-di-lizo-gangliozidokat acilezünk, vagy a megfelelő N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat a sphingoizin vagy neuraminos nitrogénatomon szelektíven dezacilezzük. A vegyületeket észterekké, amidjaikká vagy belső észterekké alakíthatjuk át vagy a kapott vegyületeket hidroxiperacilátokká alakíthatjuk, továbbá kívánt esetben a kapott vegyületeket sókká alakíthatjuk.

A fenti eljárás szerint az N-acilezést szokásos módon folytathatjuk le, például úgy, hogy a kiindulási anyagot egy acilezőszerrel, előnyösen a sav egy alkalmas funkcionális származékával reagáltatjuk. Így használhatunk halogenideket vagy savanhidrideket és az acilezést előnyösen egy tercier bázis, például piridin vagy kollidin jelenlétében végezzük el. A reakciót szobahőmérsékleten, vízmentes körülmények között hajthatjuk végre vagy pedig a Schotten–Baumann módszer szerint is eljárhatunk, amikor is vizes közegben dolgozunk egy szerves bázis jelenlétében. Néhány esetben a savak reaktív funkcionális származékaiként észtereket is alkalmazhatunk. Acilezéshez aktivált karboxi-származékokat is alkalmazhatunk, ilyenek például a peptid-kémiában használatos eljárások, ahol vegyes anhidrideket vagy karbodiimid-származékokból kapott vegyületeket vagy izoxazol-sókat alkalmaznak. Valamennyi eljárás közül az alábbiak a legelőnyösebbek:

1. lizogangliozid-származék reakciója sav-aziddal;

2. lizogangliozid-származék reakciója sav-acil-imidazollal, amelyet a savnak N,N'-karbonil-diimidazollal történő reakciója útján állítunk elő;

5 3. lizogangliozid-származék reakciója a sav és trifluor-ecetsav reakciójával előállított vegyes savanhidriddel;

4. lizogangliozid-származék reakciója sav-kloriddal;

10 5. lizogangliozid-származék reakciója a savval karbodiimid, például diciklohexil-karbodiimid és kívánt esetben 1-hidroxi-benzotriazol jelenlétében;

6. lizogangliozid-származék reakciója a savval forralás közben;

15 7. lizogangliozid-származék reakciója a sav metilészterével magas hőmérsékleten;

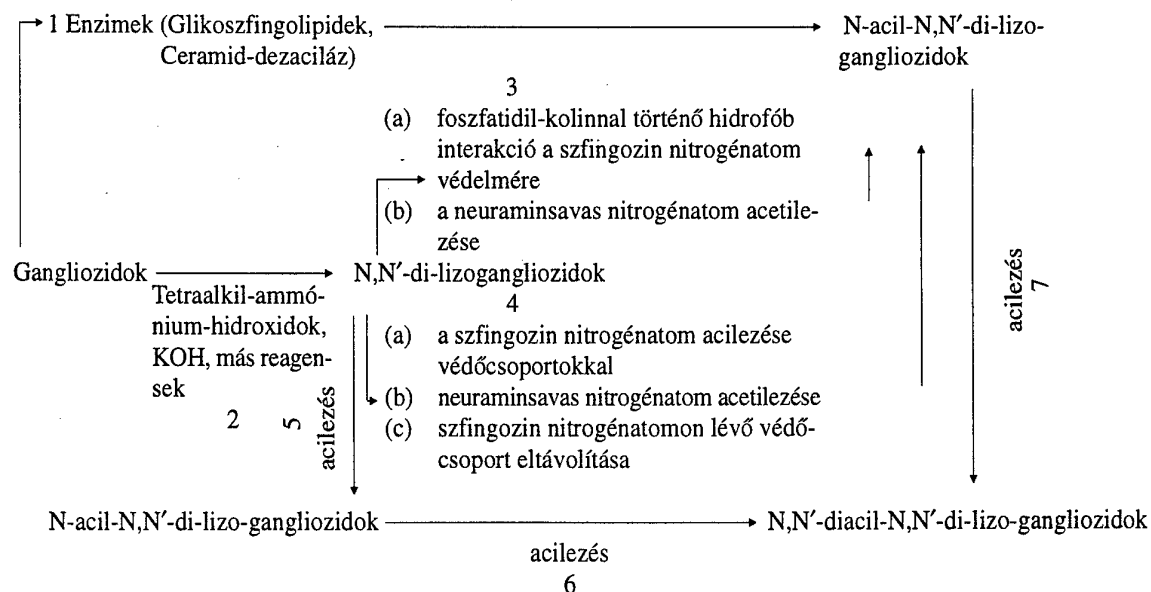
8. lizogangliozid-származék reakciója a sav fenolészterével, például para-nitro-fenol valamely észterével;

20 9. lizogangliozid-származék reakciója a sav sójának és az 1-metil-2-klór-piridinium-jodid reakciójával előállított észterrel.

A korábbiakban ismertettük már, hogy milyen módon lehet a sphingoizin nitrogénatomon és a neuraminos nitrogénatomon szelektíven acilezett származékokhoz jutni. Az (1) reakcióábra ezeket az eljárásokat szemlélteti. Az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidoknak a sphingoizin nitrogénatomon történő szelektív enzimes dezacilezését ugyanolyan körülmények között lehet folytatni, mint ahogyan a gangliozidok részleges dezacilezését végezzük; vö.: J. Biochem., 1., 103 (1988).

30 Az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidok N,N'-di-lizo-gangliozidokká történő kettős dezacilezését ugyanolyan módon folytathatjuk le, mint ahogyan a de-N-acetyl-lizo-gangliozidok előállítását végezzük; vö.: Biochemistry 24., 525 (1985); J. Biol. Chem. 255., 7657 (1980); Biol. Chem. Hoppe Seyler 367., 241 (1986); Carbohydr. Research 179., 393 (1988); Bioch. Bioph. Res. Comm. 147., 127 (1987).

### (1) Reakcióvázlat



A fenti Carbohydr. Research 179 közlemény ismerteti a gangliozid-GM<sub>3</sub>-nak 0,1 mol kálium-hidroxid 90%-os normál butanolos oldatával történő reakciója útján kapott vegyület neuraminos nitrogénatomjának szelektív dezacilezését. Ezt a dezacilezési módszert lehet alkalmazni az N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-gangliozidok reakciójához, amikor is N-acil-N,N'-di-lizo-gangliozidokat akarunk előállítani. Természetesen valamennyi kémiaileg ekvivalens előállítási eljárás, amelyek a szakember számára nyilvánvalóak, a találmányunk oltalmi körébe tartoznak.

A fenti módszer szerint előállított új acil-lizo-gangliozidok karboxil- vagy hidroxil-származékai ismert módszerek szerint előállíthatók, kivéve azokat a módszereket, amelyek a gangliozid-szerkezetet módosítják, például amelyek drasztikus alkális vagy savas körülmények között játszódnak le vagy azok a módszerek, amelyek a szacharid-rész hidroxilcsoportjainak nemkívánatos alkilezéséhez vezetnek. Az N-acil-gangliozidok karboxilcsoportjainak észterifikálását vagy ezek átalakítását amidokká például a 4 713 374 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás alapján folytathatjuk le. Az új származékok belső észtereit ugyanúgy állíthatjuk elő, mint a gangliozidok belső észtereit, például ilyen eljárásokat ismertet a 4 593 091 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás vagy a 0 072 722 számú európai szabadalmi leírás. Ezek a belső észterek nemcsak a szialinsav karboxilcsoportjainak a szacharidos hidroxilcsoportokkal képezett lakton-kötésének létrejöttével keletkezett új vegyületeket foglalják magukban, hanem például azokat a vegyületeket is, amelyekben a lakton-gyűrű a szialinos karboxilcsoportok és a szialinos hidroxilcsoportok között jönnek létre, mivel ez utóbbiak maguk is a szacharid-részhez kötődnek és ezeken túlmenően más lakton-szerkezetek is szóba jöhetnek. A belső észterek előállítására szolgáló fenti eljárások során a gangliozidot nem vizes szerves oldószerben vízmentes körülmények között valamilyen laktonizáló szerrel reagáltatjuk. Alkalmasszervek oldószerben a dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, szulfolán, tetrahydrofurán, dimetoxietán, piridin vagy ezeknek az oldószernek az elegyei. Alkalmasszervek a szerves oldószerben oldódó karbodiimidok, például a dicitlohexilkarbo-diimid, benzil-izopropilkarbo-diimid, benzil-etilkarbo-diimid, a 2-klór-1-metil-piridin sói, etoxiacetilén és Woodward'-féle reagens, vagyis N-etil-5-fenil-izoxazol-3'-szulfonát. Régebbi módszerek szerint az előállítást a gangliozid és ecetsav vagy triklórecetsav közötti reakció vagy egy vízben vagy vizes közegben oldódó karbodiimiddal történő reakció útján folytathatjuk le. Mindezek a módszerek a találmány szerinti új N-acil-lizo-gangliozidok belső észtereinek előállítására is alkalmazhatók.

A karboxilcsoportok „külső” észterezése, vagyis a fent említett alkoholokkal történő észterifikálása oly módon történhet, hogy az N-acil-lizo-gangliozidokat a kívánt alkohollal reagáltatjuk egy ioncserélő, például Dowex-50 típusú gyanta jelenlétében, amikor is a ho-

zamat korlátozza a belső észterek egyidejű keletkezése és a hosszú reakcióidő. Másik észterifikálási módszer szerint az alkoholt egy Dowex-50W×8 (100-200 méret, hidrogén-forma) gyantán nyomjuk át és a kapott eluátumot ugyanabban az alkoholban hígítva a megfelelő diazoalkánnal reagáltatjuk.

Az észterek előállítására szolgáló másik eljárás szerint a lizo-gangliozid-származék fémsóját valamilyen éterezőszerrel reagáltatjuk. Erre a célra alkáli- és földalkálifémek sóit használhatjuk, de bármilyen más só is megfelel. Éterezőszerként az irodalomban ajánlott szereket használhatjuk, előnyösen a különböző szeretlen savak vagy szerves szulfonsavak észterei, például hidrogén-savak, halogénezett szénhidrogének, így metil- vagy etil-jodid, vagy semleges szulfátok vagy szénhidrogén-savak, szulfitok, karbonátok, szilikátok, foszfitok vagy szulfonátok, például benzol-szulfonát vagy metil-p-toluol-szulfonát. A reakciót alkalmas oldószerben, például alkoholban, előnyösen a bevezetni kívánt alkilcsoportnak megfelelő alkoholban vagy apoláris oldószerben, például ketonokban, éterekben, így dioxánban vagy dimetil-szulfoxidban folytathatjuk le.

Különösen előnyös észterifikálási módszer szerint a lizo-gangliozid-származék belső észterét a kívánt alkohol és az ennek megfelelő alkoholát elegyével reagáltatjuk. A reakciót az alkohol forráspontjának hőmérsékletén folytathatjuk le, de alacsonyabb hőmérsékleteket is alkalmazhatunk, ebben az esetben hosszabb lesz a reakcióidő.

A lizo-gangliozid-származékok amidjait ismert módszerekkel állíthatjuk elő, például az alábbi eljárások szerint:

a) az N-acil-lizo-gangliozid-származék valamely belső észterét ammóniával vagy valamilyen aminnal reagáltatjuk;

b) az N-acil-lizo-gangliozid-származék karboxil-észterét ammóniával vagy valamilyen aminnal reagáltatjuk;

c) az N-acil-lizo-gangliozid-származék aktivált karboxilcsoportját ammóniával vagy valamilyen aminnal reagáltatjuk.

Az a) reakciót oldószerben vagy anélkül folytathatjuk le oly módon, hogy a gangliozid belső észterét ammóniával vagy azzal az aminnal reagáltatjuk, amelynek megfelelő amidot kívánunk előállítani. A reakciót meglehetősen alacsony hőmérsékleten is végrehajthatjuk, így -5 és +10 °C közötti hőmérsékleten, de előnyösen magasabb hőmérsékletet, így 30 és 120 °C közötti hőmérsékletet alkalmazunk. Oldószerként ketonokat, aromás szénhidrogéneket, dimetil-formamidot, dimetil-szulfoxidot, dioxánt vagy tetrahydrofuránt alkalmazhatunk.

A b) reakciót előnyösen az a) módszer szerinti reakciókörülmények között folytathatjuk le. Alkalmazhatunk azokon az észtereken kívül, amelyeket a találmány ismertetésekor leírtunk, más észtereket is, például fenollokkal képezett észtereket. A karboxilcsoport aktiválására a c) eljárás szerinti reakcióhoz a peptid-kémiaiban ismert módszereket alkalmazhatunk, s ezál-

tal elkerülhetjük az erőteljesen savas vagy bázikus körülményeket, amelyek a gangliozid molekula széteséséhez vezetnének. Ha a kiindulási anyagok nátrium-sók alakjában vannak jelen, akkor ajánlatos a sóit először valamilyen Dowex-típusú ioncserélő gyantával vagy más ioncserélővel kezelni. Például kondenzációs reakciót hajthatunk végre karbodiimidek, például d-ciklohexil-karbodiimid, benzil-izopropil-karbodiimid vagy benzil-etil-karbodiimid jelenlétében vagy 1-hidroxibenzo-triazol vagy N,N'-karbonil-diimidazol jelenlétében.

A szacharid, a szialinsavas vagy esetleg a ceramid-rész hidroxilcsoportjainak acilezését ugyancsak ismert módon hajthatjuk végre, például az acilezésre szolgáló sav halogénidjével vagy anhidridjével, előnyösen egy tercier bázis, például piridin vagy kollidin jelenlétében. A fent ismertetett peracilezett származékokat kapjuk meg ilyen módon. A találmány szerinti eljárásnak megfelelően az is lehetséges, hogy a de-N-acetil-lizo-gangliozidot acilezzük, az acilezés után a neuraminsavas rész acetil-amino-csoportját újból felszabadítjuk. Ezt az acetilezést ismert módon hajthatjuk végre. Ebben az esetben viszonylag enyhe N-acilezési reakciót választottunk, amelynek során a neuramin-savas hidroxilcsoport érintetlen marad. Ennek a csoportnak az acetilezését, amelyet a szfingozin nitrogénatomon végrehajtott acilezési reakció után folytatunk le, drasztikusabb körülmények között is végrehajthatjuk, különösen ecetsavanhidrid alkalmazása esetén. Végül, az előbb ismertetett valamennyi eljárással kapott vegyületek, amelyek sókká alakítható csoportokat tartalmaznak, ismert módon sókká alakíthatók és így a vegyületek kívánt sóit állíthatjuk elő.

A találmány az új származékok előállítására szolgáló eljárások olyan módosításaira is kiterjed, amelynek során a kiindulási anyagokat a helyszínen állítjuk elő.

Találmányunk oltalmi köre kiterjed olyan gyógyszerkészítmények előállítására is, amelyek hatóanyagként egy vagy több találmány szerinti új acil-lizo-gangliozid-származékot tartalmaznak.

A gyógyszerkészítmények orális, rektális, parenterális, lokális vagy transzdermális kezelésre alkalmas formában állíthatók elő. Ennek megfelelően szilárd vagy félszilárd készítmények, így tabletták, pirulák, zselés kapszulák, kapszulák, végbélkúpok vagy lágy zselatin kapszulák lehetnek. Parenterális alkalmazásra használhatunk intramuszkuláris, szubkután vagy transzdermális kezelésre alkalmas készítményeket, vagy alkalmazhatunk infúziókat vagy intravénás injekciókat, szolúciókat, fagyasztva-szártított porokat egy vagy több gyógyszerészeti elfogadható segédanyagokkal összekeverve vagy olyan hígítószerrel, amelyek alkalmasak a fent említett célokra és ozmolaritásuk a fiziológiai folyadékoknak megfelel. Lokális kezelésre használatos készítményeket spray, például nazális spray, topikális kezelésre krémek vagy kenőcsök formájában készíthetjük, továbbá transzdermális kezelésre megfelelő tapaszokat készíthetünk.

A találmány szerinti gyógyászati készítményeket humán és állatgyógyászati célra is alkalmazhatjuk. A

készítmények előnyösen 0,01–10 tömeg% hatóanyagot tartalmaznak szolúciók, sprayek, kenőcsök és krémek esetében és 1–100 tömeg%, előnyösen 5–50 tömeg% hatóanyagot tartalmaznak szilárd készítmények esetében. Az alkalmazott adag függ az indikációtól, a kívánt hatástól és a kezelés módjától. A napi adag injekciós (szubkután vagy intramuszkuláris) kezelés során vagy transzdermális vagy orális kezelés során 0,05–5 mg között változik testtömeg kg-ként.

Találmányunkat az acil-lizo-gangliozidok előállítására, továbbá hatóanyagként ezeket a vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására vonatkozó példákkal szemléltetjük, anélkül azonban, hogy találmányunkat ezekre a példákra korlátoznánk.

#### 1. példa

##### N,N'-Di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása

10 g GM<sub>1</sub> vegyületet 200 ml 3 n kálium-hidroxid-oldatban feloldunk, majd 90 °C-on 72 óra hosszat hidrolizáljuk.

Az oldatot ezt követően lehűtjük és pH-ját sósavval 6,5-re állítjuk be. Az így kapott elegyet 18 óra hosszat 4 °C-on állni hagyjuk, majd a kicsapódott zsírsavakat leszűrjük. Vízzel szemben dializálunk, majd az elegyet 500 ml-re besűrítjük és 5 l acetonban kicsapjuk.

A kapott terméket megszáritjuk és szilikagélen kromatografáljuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és ammónia (5 n) 55:45:10 arányú elegyét használjuk. Az N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et tartalmazó frakciót szárítjuk, majd vízben újra feloldjuk. Az elegyet 0,01 n nátrium-hidroxid-oldattal pH = 10-re állítjuk be, majd 100 mg/ml-re besűrítjük és 5-szörös mennyiségű acetonnal kicsapjuk. Termékként 5,7 g N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyületet kapunk. Hozam: 70%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás után, amikor is eluálószerként kloroform, metanol és ammónia (5 n) 55:45:10 arányú elegyét használjuk, termékként egy egységes vegyületet kapunk; R<sub>f</sub> = 0,05 (GM<sub>1</sub> = 0,35).

#### 2. példa

##### N,N'-Di-formil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyületet 2,5 ml dimetil-formamidban elegyítünk, majd szobahőmérsékleten 0,88 ml (6,35 mmol) trietil-amin, 190 µl (3,17 mmol) hangyasav és 0,4 g (1,58 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamid-dal készített elegyét adjuk hozzá.

A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat hagyjuk reagálni, majd 100 ml acetonban kicsapjuk, a kapott csapadékot szűrjük és szárítjuk. A terméket ezután szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:25:4 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re besűrítjük és 50 ml acetonnal kicsapjuk. Termékként 412 mg N,N'-diformil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyületet kapunk. Hozam: 90%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás

útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét használjuk. Termékként egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,27.

### 3. példa

#### *N,N'-Dipropionil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében oldunk, majd a kapott oldathoz 0 °C-on 220 µl (1,6 mmol) trietil-amin és 204 µl (1,6 mmol) propionsavanhidridet adunk, majd a kapott elegyet szobahőmérsékleten 168 óra hosszat állni hagyjuk. 20 térfogat etil-acetátból történő kicsapás után a kapott terméket szűrjük és szárítjuk, majd ezt követően szilikagélen kromatografáljuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:25:4 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re bepároljuk és ezt követően 50 ml acetonban kicsapjuk.

Termékként 466 mg N,N'-di-propionil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyületet kapunk. Hozam: 82%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján, amikor is oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid elegyét használjuk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,44.

### 4. példa

#### *N,N'-Dipivaloil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében oldunk, majd ehhez az oldathoz 0 °C-on 1,1 ml (7,92 mmol) trietil-amin és 0,80 ml (3,96 mmol) pivalinsavanhidrid elegyét adjuk, majd a kapott elegyet szobahőmérsékleten 168 óra hosszat állni hagyjuk. 20 térfogat etil-acetáttal történő kicsapás után a kapott csapadékot szűrjük és szárítjuk.

A kapott terméket ezután szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:25:4 arányú elegyét használjuk, tisztítjuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re bepároljuk és 50 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 436 mg N,N'-dipivaloil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> vegyületet kapunk. Hozam: 77%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfias tisztítás útján, amikor is oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét használjuk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,57.

### 5. példa

#### *N,N'-Di-terc-butyl-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban elosztatunk, majd a kapott elegyhez szobahőmérsékleten 0,33 ml (2,37 mmol) trietil-amin, 165 µl (1,18 mmol) terc-butyl-ecetsav és 0,2 g

(0,79 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamiddal készített elegyét adjuk.

A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk. A kapott csapadékot szűrjük és szárítjuk, majd szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:25:4 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re bepároljuk és 50 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 289 mg N,N'-diterc-butyl-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 50%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldatot használunk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,30.

### 6. példa

#### *N,N'-Di-(2-propil-pentanoil)-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban elosztatunk, majd az így kapott elegyhez szobahőmérsékleten 0,33 ml (2,37 mmol) trietil-amin, 186 µl (1,18 mmol) 2-propil-pentánsav és 0,2 g (0,79 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamiddal készített oldatát adjuk.

A kapott reakcióelegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk. A kapott csapadékot szűrjük és szárítjuk, majd szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján a terméket tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:25:4 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re bepároljuk és 50 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 570 mg N,N'-di-(2-propil-pentanoil)-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 95%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján a kapott terméket tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét használjuk. Termékként egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,32.

### 7. példa

#### *N-Acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et (0,39 mmol) 5 ml dimetil-formamidban elosztatunk. A kapott oldathoz lassan 145 mg (0,43 mmol) 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil-N-hidroxi-szukcinimidet adunk és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat állni hagyjuk.

A reakció befejeződése után 100 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk, majd szűrjük és a kapott terméket szárítjuk. Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfias úton a terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét használjuk.

Az N-(9-fluorenil-metil-oxi-karbonil)-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> köztiterméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, szárítjuk, majd 2,5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében újra oldjuk, ezt követően az így kapott oldathoz 0 °C-on 1,1 ml (7,92 mmol) trietil-amint és 0,40 ml (3,96 mmol) metil-trifluor-acetátot adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 3 napig állni hagyjuk.

Ezt követően 1 ml piperidint adunk az elegyhez, hogy a fluorenil-csoportot eltávolítsuk. A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml acetont és víz 9:1 arányú elegyének hozzáadásával kivált csapadékot szűrjük és szárítjuk.

A köztiterméket 30 ml kloroform, metanol és víz 1:1:0,1 arányú elegyében oldjuk, majd a kapott oldathoz 250 µl (1,80 mmol) trietil-amint és 100 µl (0,90 mmol) ecetsavanhidridet adunk. A kapott reakcióelegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat állni hagyjuk, majd szárítjuk, utána 5 ml vízben újra feloldjuk és 0,01 n nátrium-hidroxid-oldattal a pH-ját 9-re állítjuk be. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten állni hagyjuk, így a trifluor-acetil-csoport lehasad. Dialízis után az elegyet 3 ml-re bepároljuk, majd 15 ml acetonnal kicsapjuk.

A nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, majd bepároljuk, utána 2,0 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében újra feloldjuk.

Termékként 243,8 mg N-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 48%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiai tisztítás után – miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 50:42:11 arányú elegyét használjuk – egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,12 és a ninhidrines festés pozitív.

#### 8. példa

##### *N-Acetil-N'-butiril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 5 ml dimetil-formamidban eloszlatunk, majd a kapott oldathoz lassan 145 mg (0,43 mmol) 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil-N-hidroxi-szukcinimidet adunk és az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat hagyjuk állni.

Ha a reakció befejeződött, 100 ml acetont hozzáadásával csapadékot képezünk, amelyet szűrünk, majd szárítunk. A terméket ezután szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét használjuk.

Az N-(9-fluorenil-metil-oxi-karbonil)-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> köztiterméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, szárítjuk, majd 2,5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében újra feloldjuk, a kapott oldathoz 0 °C-on 1,1 ml (7,92 mmol) trietil-amint és 626 mg (3,96 mmol) vajsavanhidridet adunk.

A reakcióelegyhez ezután 1 ml piperidint adunk, hogy a fluorenil-csoportot eltávolítsuk. Az elegyet ez-

után szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml acetont és víz 9:1 arányú elegyét adjuk hozzá és a kivált csapadékot szűrjük és szárítjuk.

A köztiterméket 30 ml kloroform, metanol és víz 1:1:0,1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a kapott elegyhez 1,1 ml (7,92 ml) trietil-amint és 373 µl (3,96 mmol) ecetsavanhidridet adunk. A kapott elegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat állni hagyjuk, szárítjuk, majd 5 ml 1 mólos nátrium-karbonát-oldattal újra oldjuk és a kapott elegyet 1 óra hosszat 60 °C-on tartjuk. Dialízis után az elegyet 5 ml-re besűrítjük, majd 5 térfogat acetont hozzáadásával csapadék válik ki.

A nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk és 2,0 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében újra oldjuk, majd 10 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 278 mg N-acetil-N'-butiril-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 52%.

Szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid elegyét használjuk, így egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,32.

#### 9. példa

##### *N-Acetil-N'-lauroil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása*

500 mg N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et (0,39 mmol) 5 ml dimetil-formamidban oldunk. A kapott oldathoz lassan 145 mg (0,43 mmol) 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil-N-szukcinimidet adunk, majd a kapott elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat állni hagyjuk.

A reakció befejeződése után 100 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk, szűrjük és szárítjuk. A terméket ezután szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét használjuk.

Az N-(9-fluorenil-metil-oxi-karbonil)-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> köztiterméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, szárítjuk és 2,5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében újra feloldjuk, majd a kapott elegyhez 0 °C-on 1,1 ml (7,92 mmol) trietil-amin és 1,51 g (3,96 mmol) laurinsavanhidridet adunk, majd a kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk.

Ehhez a reakcióelegyhez ezután a fluorenil-csoport eltávolítása céljából 1 ml piperidint adunk, majd az elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, ezt követően a 100 ml acetont és víz 1:1 arányú elegyének hozzáadása útján kapott csapadékot szűrjük és szárítjuk.

A köztiterméket 30 ml kloroform, metanol és víz 1:1:0,1 arányú elegyében oldjuk, majd a kapott oldathoz 1,1 ml (7,92 mmol) trietil-amint és 373 µl (3,96 mmol) ecetsavanhidridet adunk. A kapott elegyet szobahőmérsékleten 2 óra hosszat állni hagyjuk, szárítjuk, majd 5 ml 1 mólos nátrium-karbonát-oldatban újra feloldjuk és a kapott oldatot 60 °C-on 1 óra hosszat állni hagyjuk. Dialízis után az elegyet 5 ml-re bepároljuk, majd 5 térfogatnyi acetonnal a csapadékot kicsapjuk.

A kapott nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét használjuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 2,0 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében újra feloldjuk, majd 10 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 295 mg N-acetil-N'-lauroil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 51%.

Szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 50:42:11 arányú elegyét használjuk. A kapott termék egységes vegyület. Rf = 0,55.

#### 10. példa (referencia példa)

##### N'-Acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás

10 g (6,37 mmol) GM<sub>1</sub>-et 200 ml 3 n kálium-hidroxid-oldatban feloldunk, majd 90 °C-on 72 óra hosszat hidrolizáljuk.

Az oldatot ezután lehűtjük és a pH-ját sósavval 6,5-re állítjuk be. Az elegyet 4 °C-on 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd a kivált zsírsavakat leszűrjük. Vízzel történő dialízis után az elegyet 500 ml-re besűrítjük, majd 5 liter acetonnal kicsapjuk.

A kapott terméket vákuumban szárítjuk, majd 100 ml dimetil-formamidban újra eloszlatjuk.

A kapott elegyhez lassan 2,15 g (6,37 mmol) 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil-N-hidroxi-szukcinimid 20 ml tetrahidrofuranál készített elegyét adjuk, majd szobahőmérsékleten 1 óra hosszat állni hagyjuk. Ezt követően 3 ml (31,85 mmol) ecetsavanhidridet és 0,09 ml (6,37 mmol) trietil-amint adunk hozzá.

30 perccel később 12,5 ml piperidint adunk az elegyhez, hogy a védőcsoportot eltávolítsuk. Az elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk és utána 2 liter aceton hozzáadása útján a csapadékot kicsapjuk. Az így kapott anyagot 1 mólos nátrium-karbonát-oldatban eloszlatjuk, majd az elegyet 1 óra hosszat 60 °C-on tartjuk. Dializálás után az elegyet 100 mg/ml-re besűrítjük és 5-szörös mennyiségű acetonnal kicsapjuk.

A terméket S-Sepharose töltetű oszlopon (H<sup>+</sup>-ionos) átengedjük és metanollal kiegyenlítjük. Metanollal történő eluálás után N'-acetil-N,N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk, majd 10 mmólos metanolos ammónium-klorid-oldattal eluálunk. A terméket tartalmazó frakciókat szárítjuk, majd vízben eloszlatjuk, 0,01 n nátrium-hidroxid-oldattal pH-ját 10-re állítjuk be, utána dializálunk, ezt követően 100 mg/ml-re besűrítjük az oldatot és végül 5-szörös mennyiségű acetonnal kicsapjuk. Termékként 5 g N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 60%.

Szilikagélen kromatografálunk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és ammónia (5 n) 55:45:10 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,11.

#### 11. példa

##### N'-Propionil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás

500 mg N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et (0,39 mmol) 5 ml dimetil-formamidban eloszlatunk; ehhez az oldathoz las-

san 145 mg (0,43 mmol) 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil-N-hidroxi-szukcinimid 2 ml tetrahidrofuranál készített oldatát adjuk, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat állni hagyjuk. Ezután 253,7 mg (1,95 mmol) n-propionsav-anhidridet és 54,5 µl (0,39 mmol) trietil-amint adunk hozzá.

A védőcsoport eltávolítása céljából 30 perccel később 2 ml piperidint adunk az elegyhez, szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk, majd szűrjük és szárítjuk. Az így kapott terméket 10 ml 1 mólos nátrium-karbonát-oldatban eloszlatjuk és a kapott elegyet 1 óra hosszat 60 °C-on tartjuk. Dializálás után az elegyet 5 ml-re bepároljuk és 5-szörös mennyiségű acetonnal kicsapjuk.

15 A nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és ammónia (2,5 n) 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A nyers terméket tartalmazó frakciókat szárítjuk, majd 5 ml vízben eloszlatjuk. A kapott elegy pH-ját 0,01 n nátrium-hidroxid-oldattal 10-re állítjuk be, majd dializálás után az elegyet 5 ml-re bepároljuk és 5 ml acetonnal kicsapjuk. Ilyen módon 310 mg N'-propionil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 60,4%.

25 Vékonyréteg-kromatográfiai tisztítás után, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 50:42:11 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,27 és a ninhidrines festés pozitív.

30

#### 12. példa

##### N-Formil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban eloszlatunk, majd szobahőmérsékleten 1056 µl (7,6 mmol) trietil-amint, 237 µl (3,8 mmol) hangyasavat és 194,2 mg (0,76 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamid-dal készített oldatát adjuk hozzá.

40 A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszat állni hagyjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával a csapadékot kicsapjuk, szűrjük és szárítjuk. A kapott terméket szilikagélen történő kromatografálással tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

45 A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, majd 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, ezt követően 5 ml-re besűrítjük és 50 ml acetonnal kicsapjuk.

50 Termékként 391 mg N-formil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 75%.

55 Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiai úton tisztítjuk a terméket, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A kapott termék egységes. Rf = 0,27.

#### 13. példa

##### N-Propionil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás

60 500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében

oldunk, majd 0 °C-on 422 µl (3,04 mmol) trietil-amint és 196 µl (1,52 mmol) propionsavanhidridet adunk hozzá, majd a kapott elegyet szobahőmérsékleten 72 óra hosszat állni hagyjuk. Ezt követően 20 térfogat etil-acetátban kicsapjuk, majd szűrjük és szárítjuk.

A terméket ezután szilikagélen kromatografálva tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, majd 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk és 5 ml-re besűrítjük, ezután 50 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 522 mg N-propionil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 70,0%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiás tisztítás útján – eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk – egységes terméket kapunk. Rf = 0,31.

#### 14. példa

##### *N-Butiril-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében oldunk, majd az így kapott oldathoz 0 °C-on 422 µl (3,04 mmol) trietil-amint és 249 µl (1,52 mmol) vajsavanhidridet adunk, a kapott elegyet szobahőmérsékleten 72 óra hosszat állni hagyjuk. 20 térfogat etil-acetáttal kicsapjuk, szűrjük és szárítjuk.

A kapott terméket ezután szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re besűrítjük és utána 50 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 527 mg N-butiril-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 68,0%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás után, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,32.

#### 15. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 5 ml dimetil-formamid és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatunk, majd az így kapott elegyhez 0 °C-on 528 µl (3,8 mmol) trietil-amint és 780 µl (3,8 mmol) pivalin-savanhidridet adunk, ezután a kapott elegyet 72 óra hosszat szobahőmérsékleten állni hagyjuk. 20 térfogat etil-acetátot adunk hozzá, majd a keletkezett csapadékot szűrjük és szárítjuk.

A terméket szilikagélen kromatográfiásan tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re besűrítjük, ezt követően 50 ml acetont adunk hozzá és így csapadék válik ki.

Termékként 490 mg N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 94,0%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiás tisztítás után, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,2%-os kalcium-klorid 50:42:11 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes terméket kapunk. Rf = 0,34.

#### 16. példa

##### *N-Hexanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban elosztatunk, majd az így kapott elegyhez szobahőmérsékleten 316 µl (2,28 mmol) trietil-amint, 143 µl (1,14 mmol) hexánsavat és 194,2 mg (0,76 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamiddal készített oldatát adjuk.

A kapott elegyet 18 óra hosszat szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk. A keletkezett csapadékot szűrjük és szárítjuk, majd szilikagélen történő kromatografálással tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, majd desztillált vízzel dializáljuk, végül 5 ml-re besűrítjük és 50 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk.

Termékként 392 mg N-hexanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 73%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján tisztítjuk a kapott terméket, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Termékként egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,33.

#### 17. példa

##### *N-(2-Propil-pentanoil)-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban elosztatunk, majd a kapott elegyhez szobahőmérsékleten 1056 µl (7,6 mmol) trietilamin, 595 µl (3,8 mmol) 2-propil-pentánsavat és 194,2 mg (0,76 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamiddal készített elegyét adjuk hozzá.

A kapott elegyet 18 óra hosszat szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk. Az így kivált csapadékot szűrjük és szárítjuk. A kapott terméket szilikagélen kromatografáljuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re besűrítjük, utána 51 ml acetont adunk hozzá, így csapadék válik ki.

Termékként 428 mg N-(2-propil-pentanoil)-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 75%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,35.

## 18. példa

*N-Oktanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,38 mmol) N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 2,5 ml dimetil-formamidban eloszlatunk, majd a kapott elegyhez szobahőmérsékleten 316 µl (2,28 mmol) trietil-amint, 181 µl (1,14 mmol) oktánsavat és 194,2 mg (0,76 mmol) klór-metil-piridinium-jodid 2,5 ml dimetil-formamiddal készített elegyét adjuk.

A kapott elegyet szobahőmérsékleten 18 óra hosszát állni hagyjuk, majd 100 ml acetont adunk hozzá és az így kivált csapadékot szűrjük és szárítjuk. A kapott terméket ezután szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, desztillált vízzel dializáljuk, majd 5 ml-re besűrítjük és ezt követően 50 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk.

Termékként 427 mg N-oktanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 78%.

Szilikagélen történő kromatográfias tisztítás útján, miközben eluálószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,34.

## 19. példa

*N-Dekanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,39 mmol) N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 5 ml dimetil-formamidban eloszlatunk, majd az így kapott elegyhez 1 ml Triton X 100-at és 104 µl (0,75 mmol) trietil-amint adunk. A kapott elegyet addig keverjük, amíg tiszta oldatot nem kapunk. Ezután az oldathoz 25 ml tetrahydrofuránt adunk, amely 380 mg (1,5 mmol) dekánsav-N-szukcinimidil-származékot tartalmaz. Ez utóbbi vegyületet úgy állítjuk elő, hogy 500 mg (2,9 mmol) dekánsavat 15 ml vízmentes tetrahydrofuránban eloszlatunk, majd 742 mg (2,9 mmol) N-szukcinimidil-karbonát és 550 µl (43,9 mmol) trietil-amin 40 ml acetonnal készített elegyét adjuk hozzá és az így kapott elegyet 18 óra hosszát szobahőmérsékleten reagáltatjuk.

A reakciót 24 óra hosszát szobahőmérsékleten folytatjuk le, majd az oldatot 5 ml-re besűrítjük és 100 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 2 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében újra eloszlatjuk, majd az így kapott elegyhez 73,5 µl (0,78 mmol) ecetsavanhidridet és 108 µl (0,78 mmol) trietil-amint adunk. Az elegyet szobahőmérsékleten 24 óra hosszát állni hagyjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk.

A terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk hozzá, majd desztillált vízzel

dializáljuk, 5 ml-re besűrítjük és 100 ml acetont adunk hozzá, így csapadék válik ki.

Termékként 184 mg N-dekanoil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 32%.

5 Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,34.

## 20. példa

*Természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,31 mmol) GM<sub>1</sub>-et 50 ml 1 n nátrium-hidroxioldatban eloszlatunk, majd a kapott elegyet 18 óra hosszát 90 °C-on tartjuk. A kapott oldatot dializáljuk 2,5 ml-re besűrítjük és 100 ml acetonnal kicsapjuk.

A nyers terméket szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:30:6 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 2,5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, utána 100 ml acetonnal kicsapjuk.

25 Termékként 350 mg természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 72%.

Szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,20.

30 A sphingozin-nitrogénatomhoz amid-kötéssel kapcsolódó zsírsav-tartalom az alábbi: 95% sztearinsav, 4% oleinsav, 0,5% palmitinsav, 0,5% más zsírsavak. A meghatározás a természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub> vegyület hidrolízise során kapott termék észterezése útján keletkezett zsírsav-metil-észterek gázkromatografálása révén történik.

## 21. példa

*Természetes N'-mirisztoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatunk, majd az így kapott oldathoz 0,5 ml pH = 5,7 acetát-puffert (80 mmol) és 750 mg (1,7 mmol) mirisztin-savanhidridet adunk.

45 A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszát végezzük állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a terméket szárítjuk, majd 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eloszlatjuk és 100 ml acetonnal kicsapjuk.

50 Az így kapott nyers terméket preparatív szilikagéles kromatográfias módszerrel tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

55 A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk és 100 ml aceton hozzáadásával a csapadékot kicsapjuk.

Termékként 500 mg természetes N'-mirisztoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 87,8%.

60 Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás útján tisztítjuk a terméket, miközben eluálószerként

kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,53.

#### 22. példa

##### *Természetes N'-palmitoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatunk, majd ehhez az oldathoz 0,5 ml pH = 5,7 acetát-puffert, 80 mmol és 900 mg (1,82 mmol) palmitinsavanhidridet adunk. A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra

hosszat folytatjuk le állandó keverés közben. A reakció befejeződése után a terméket szárítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk, majd 100 ml acetont adunk hozzá, amikor csapadék válik ki.

Az így kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfálás útján tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd 100 ml acetont hozzáadásával kicsapjuk a csapadékot. Termékként 520 mg természetes N'-palmitoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 89,9%.

Szilikagélen történő kromatográfálással tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,55.

#### 23. példa

##### *Természetes N'-sztearoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében feloldunk és a kapott oldathoz 0,5 ml pH = 5,7 acetát-puffert adunk (80 mmol) és 100 mg (1,81 mmol) sztearinsavanhidridet 20 ml tetrahidrofuránban elegyítve.

A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszát végezzük állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a terméket szárítjuk, majd 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, utána pedig 100 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk.

A kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfias módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk. 525 mg természetes N'-sztearoil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 83,4%.

Szilikagélen történő kromatográfias módszerrel tisztítjuk a nyers terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat elegyét alkalmazzuk, így egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,57.

#### 24. példa

##### *Természetes N'-pivaloil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében fel-

oldunk, majd a kapott oldathoz 0,75 ml (0,54 mmol) trietil-amin és 0,75 ml (6,75 mmol) privalinsavanhidridet adunk.

A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszát folytatjuk le állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a terméket szárítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elegyítjük és 100 ml acetont hozzáadásával a csapadékot kicsapjuk. A nyers terméket szilikagélen történő kromatográfálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform és metanol 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk, majd 100 ml acetont hozzáadásával kicsapjuk.

440 mg természetes N'-pivaloil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk termékként. Hozam: 83,3%.

Szilikagélen történő kromatográfálás útján a kapott nyers terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A kapott termék Rf értéke 0,52.

#### 25. példa

##### *Természetes N'-propionil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatunk, majd a kapott oldathoz 0,5 ml 5,7 pH-jú acetát-puffert (50 mmol), továbbá 0,25 ml (1,95 mmol) propionsavanhidridet adunk hozzá.

A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszát folytatjuk állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a terméket tisztítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk.

A kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfias módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 430 mg természetes N'-propionil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 82,8%.

Szilikagélen történő kromatográfálás útján a kapott terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,45.

#### 26. példa

##### *Természetes N'-butiril-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítás*

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében feloldunk, majd az így kapott oldathoz 0,5 ml 5,7 pH-jú acetát-puffert adunk (50 mmol), továbbá 0,25 ml (1,53 mmol) n-vajsavanhidridet adunk hozzá.

A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszát folytatjuk le állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a kapott terméket szárítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk, majd 100 ml acetont adunk hozzá.

Az így kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd 100 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 450 mg természetes N'-butiril-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 85,9%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel a kapott terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,51.

#### 27. példa

##### Természetes N'-izobutiril-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében feloldunk, majd a kapott oldathoz 0,5 ml 5,7 pH-jú acetát-puffer-oldatot (50 mmol), és 0,25 ml (1,51 mmol) izovajsavanhidridet adunk.

A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszat folytatjuk le állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a terméket szárítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk és 100 ml acetonnal kicsapjuk.

A kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk.

Termékként 450 mg N'-izobutiril-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 85,9%. Szilikagélen történő kromatografálás útján a kapott terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,49.

#### 28. példa

##### Természetes N'-lauroil-N'-lizo-GM<sub>1</sub> előállítása

500 mg (0,33 mmol) természetes N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatunk, majd az így kapott oldathoz 0,5 ml 5,7 pH-jú acetát-puffert (50 mmol) adunk és 600 mg (1057 mmol) laurilsavanhidridet. A kondenzációs reakciót 25 °C-on 18 óra hosszat folytatjuk le állandó keverés közben.

A reakció befejeződése után a kapott terméket szárítjuk, 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével elosztatjuk és 100 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk.

Az így kapott nyers terméket szilikagélen történő preparatív kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 60:20:3 arányú elegyét alkalmazzuk.

A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 5 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében újra elosztatjuk, majd a terméket 100 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk.

Termékként 495 mg természetes N'-lauroil-N'-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 88,4%. Szilikagélen történő vékony-rétegkromatográfiás módszerrel tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Rf = 0,51.

#### 29. példa

##### N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterének előállítása

5 g (3,1 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml N-metil-pirrolidonban elosztatunk, majd a kapott elegyhez 0,95 g (3,72 mmol) 2-klór-1-metil-piridinium-jodidot és 0,52 ml (3,72 mmol) trietil-amint adunk állandó keverés közben.

A reakciót 4 °C-on 18 óra hosszat folytatjuk le, majd az elegyet szűrjük és 500 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk.

4,7 g nyers terméket kapunk, amelyet 25 ml kloroform és izopropanol 1:1 arányú elegyével elosztatunk, majd szűrünk és a csapadékot 125 ml aceton hozzáadásával kicsapjuk, majd vákuumban szárítjuk.

Termékként 4,5 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét kapjuk. Hozam: 91,2%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiás tisztítás útján egységes terméket kapunk; a kromatografáláshoz oldószerként kloroform, metanol és ecetsav 30:40:20 arányú elegyét alkalmazzuk. Termékként egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,42. A termékhez 0,1 n nátrium-hidroxid-oldatot adunk és 1 óra hosszat 60 °C-on reagáltatjuk a vegyületet, így hidrolizáljuk az észter-kötést és az eredeti gangliozidot kapjuk meg.

Az N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterének IR-spektruma, amelyet kálium-bromiddal készítettünk, 1750 cm<sup>-1</sup>-nél tipikus abszorpciót mutat az észter-kötés helyén.

#### 30. példa

##### N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterének előállítása

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 200 ml vízmentes metilén-klorid és etanol 2:1 arányú elegyében elosztatjuk. Az így kapott oldathoz 184 mg (3,18 mmol) nátrium-etilát 50 ml vízmentes etanollal készített elegyét adjuk, majd az elegyet 2 óra hosszat visszafolytatás közben forraljuk.

A reakció befejeződése után az elegyet vízmentes Dowex AG 50×8, H<sup>+</sup>-ionos gyantával semlegesítjük, majd a gyantát leszűrjük, utána etanol és metilén-klorid 1:1 arányú elegyével mossuk és a kapott oldatot megszáritjuk. A maradékot 50 ml metilén-klorid és etanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk és a terméket 250 ml aceton hozzáadása útján kicsapjuk.

Az így kapott 4,9 g nyers terméket Merck szilikagélen történő preparatív kromatografálás útján tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol, izopropanol és 2%-os ammónium-karbonát-oldat 1140:620:180:140 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, szárazra pároljuk, majd 15 ml

kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,3 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterét kapjuk. Hozam: 83,7%.

Szilikagélen kromatografálva a terméket tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A kapott termék egységes vegyület. R<sub>f</sub> = 0,49. Ezután 0,1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk az elegyhez és 1 óra hosszat 60 °C-on melegítjük, így az észterkötés elhidrolizál és az eredeti gangliozidot kapjuk vissza.

Az N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterének kálium-bromidos IR-spektruma 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző abszorpciót mutat.

### 31. példa

*N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> izopropil-észterének előállítása*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 200 ml metilén-klorid és izopropanol 2:1 arányú vízmentes elegyében eloszlatjuk. Ehhez az oldathoz 261 mg (3,18 mmol) nátrium-izopropilát 50 ml vízmentes izopropanollal készített elegyét adjuk, majd a kapott elegyet 2 óra hosszat visszafolyatás mellett forraljuk.

Miután a reakcióelegyet vízmentes Dowex AG 50×8 H<sup>+</sup>-ionos gyantával semlegesítjük, a gyantát leszűrjük és utána izopropanol és metilén-klorid 1:1 arányú elegyével mossuk, majd az oldatot szárítjuk. A maradékot 50 ml metilén-klorid és izopropanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, majd a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 4,9 g nyers terméket Merck szilikagélen történő középnyomású (12 atm) preparatív kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben eluálószerként kloroform, metanol, izopropanol és 2%-os ammónium-karbonát-oldat 1140:620:180:140 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,2 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> izopropil-észterét kapjuk. Hozam: 81,0%.

Szilikagélen történő kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. R<sub>f</sub> = 0,52. Ezután 0,1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk a kapott vegyülethez, majd 1 óra hosszat 60 °C-on melegítjük a kapott elegyet, így az észterkötés hidrolizálódik és az eredeti gangliozidot kapjuk. Az N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> izopropil-észterének kálium-bromid segítségével készített IR-spektruma 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző abszorpciót mutat.

### 32. példa

*N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> terc-butil-észterének előállítása*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 200 ml vízmentes metilén-klorid és terc-butanol ele-

gyében oldunk. A kapott oldathoz 305 mg (3,18 mmol) nátrium-terc-butilát 50 ml vízmentes terc-butanollal készített elegyét adjuk, majd a kapott elegyet 2 óra hosszat visszafolyatás mellett forraljuk.

5 A reakcióelegyet ezután vízmentes Dowex AG 50×8 H<sup>+</sup>-ionos gyantával semlegesítjük, majd a gyantát leszűrjük és terc-butanol és metilén-klorid 1:1 arányú elegyével mossuk, ezután az oldatot szárítjuk. A maradékot 50 ml metilén-klorid és terc-butanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük és a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

10 Az így kapott 4,9 g nyers terméket középnyomású (12 atm) preparatív Merck szilikagélen történő kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol, izopropanol és 2%-os ammónium-karbonát-oldat 1140:620:180:140 arányú elegyét használjuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, szárazra bepároljuk és 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

20 Termékként 4,1 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et kapunk. Hozam: 78,4%.

25 Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. R<sub>f</sub> = 0,52. Az így kapott termékhez 0,1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd az elegyet 1 óra hosszat 60 °C-on tartjuk, így az észterkötés hidrolizálódik és az eredeti gangliozidot kapjuk.

30 Az N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> terc-butil-észterének kálium-bromiddal kapott IR-spektruma 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellegzetes abszorpciót mutat.

### 33. példa

35 *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> benzil-észterének előállítása*

40 5 g (3,14 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>-et 50 ml dimetil-szulfoxidban oldunk, majd a kapott oldathoz 1,58 g (12,5 mmol) benzil-kloridot és 2,08 g (12,5 mmol) kálium-jodidot adunk. A kapott elegyet 24 óra hosszat 25 °C-on nitrogén-áramban reagálni hagyjuk.

45 A reakció befejeződése után az oldatot n-butanol és víz 2:1 arányú elegyében megoszlatjuk, hogy ilyen módon a dimetil-szulfoxidot és sóit eltávolítsuk. A butanol-oldatot bepároljuk, a maradékot 50 ml kloroform és benzil-alkohol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk és a reakció terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

50 A kapott 5,3 g nyers terméket preparatív, szilikagélen történő kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 65:32:7 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk és 15 ml kloroform és izopropanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

55 Termékként 4,8 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> benzil-észterét kapjuk. Hozam: 91,0%.

60 Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, termékként egységes vegyületet

kapunk.  $R_f = 0,65$ . Ezután a termékhez 0,1 n nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd az elegyet 1 óra hosszat  $60\text{ }^\circ\text{C}$ -on melegítjük, így az észter-kötés elhidrolizál és az eredeti gangliozidot kapjuk.

A kapott N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> benzil-észterének kálium-bromiddal készített IR-spektrumában  $1750\text{ cm}^{-1}$ -nél jellemző adszorpció található és az UV-spektroszkópos felvétel, amelynek során vízmentes etil-alkoholt alkalmazunk, 250, 255 és  $261\text{ nm}$ -nél maximumokat mutat.

#### 34. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 100 ml vízmentes izopropil-alkoholban szuszpendáljuk. A kapott szuszpenziót alacsony hőmérsékleten, például  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on keverjük és száraz ammóniát buborékolatunk át rajta vízmentes körülmények között 3 órán keresztül. A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk, a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük és a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 4,8 g nyers termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk és a kapott elegyet 30 percig  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk, így az észtercsoport hidrolizál, majd vízben történő dialízis után a terméket vákuumban szárítjuk, ezt követően pedig szilikagélen történő preparatív kromatografálással tisztítjuk, miközben első oldószerként kloroform, metanol és víz 60:40:9 arányú elegyét, második oldószerként kloroform, metanol és víz 55:45:10 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd a tiszta terméket 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk és az amidot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,6 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> amidját kapjuk. Hozam: 91,1%.

Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat elegyét alkalmazzuk, termékként egységes vegyületet kapunk.  $R_f = 0,20$ .

Az IR-spektrum  $1750\text{ cm}^{-1}$ -nél már nem mutatja a jellemző észterkötést.

#### 35. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 100 ml vízmentes izopropil-alkoholban szuszpendáljuk. A szuszpenziót alacsony hőmérsékleten, például  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on keverjük és száraz etil-amint buborékolatunk át rajta 24 óra hosszat  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on vízmentes körülmények között.

A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, majd a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 4,9 g termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd a kapott elegyet  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 percig állni hagyjuk, így az észterkötés

elhidrolizál, majd utána vízzel történő dialízis után vákuumban szárítjuk és Sephadex DEAE A25 acetátformán történő preparatív kromatográfias módszerrel tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 25 n ammónia 60:40:8 arányú elegyét alkalmazzuk. a tiszta frakciókat eluálás után egyesítjük, bepároljuk, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

10 Termékként 4,7 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-amidját kapjuk. Hozam: 91,5%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatográfias módszerrel, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Egységes terméket kapunk.  $R_f = 0,46$ . Az IR-spektrum  $1750\text{ cm}^{-1}$ -nél már nem tartalmazza a jellemző észterkötést.

#### 36. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> izopropil-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 25 ml vízmentes izopropil-aminban eloszlatunk és a kapott elegyet vízmentes körülmények között 24 óra hosszat  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk.

A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eldörzsöljük, majd 250 ml acetonnal a csapadékot kicsapjuk.

30 A kapott 4,8 g termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk és  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 percig hidrolizáljuk az észtercsoportokat. Vízben történő dialízis után a terméket vákuumban szárítjuk, majd szilikagélen történő kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és 25 n ammónia 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk, a terméket tisztítjuk. A tiszta frakciókat összegyűjtjük, bepároljuk, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk és a csapadékot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

35 Termékként 4,2 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> izopropil-amidját kapjuk. Hozam: 81,1%.

Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk.  $R_f = 0,66$ . Az IR-spektrum már nem tartalmazza  $1750\text{ cm}^{-1}$ -nél a jellemző észterkötést.

#### 37. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> 2-butil-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 25 ml vízmentes piridinben eloszlatjuk és a kapott oldathoz 12,5 ml 2-butil-amint adunk, majd az elegyet vízmentes körülmények között 24 óra hosszat  $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on keverjük.

55 A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, majd a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 5,2 g nyers termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd a kapott elegyet 30 percig 25 °C-on tartjuk, így az észtercsoport hidrolizál. Ezt követően vízzel dializálunk, vákuumban szárítjuk a kapott terméket és utána szilikagélen preparatív kromatografálással tisztítjuk, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 110:40:6 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat eluálás után egyesítjük, bepároljuk, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk és az amidot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,7 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> 2-butil-amidját kapjuk. Hozam: 88,1%.

Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, termékként egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,50. Az IR-spektrum már nem tartalmazza az 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző észtertkötést.

### 38. példa

#### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> dimetil-amino-etil-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 50 ml vízmentes kloroform és izopropanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk. Ezt követően 599 mg (6,36 mmol) dietil-amino-etil-amint adunk a kapott elegyhez. Az oldatot 25 °C-on 24 óra hosszat keverjük, majd a reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük. A terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 5,2 g nyers termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd 30 percig 25 °C-on állni hagyjuk az elegyet, hogy az észtercsoport hidrolizálódjék. Vízben történő dialízis után a terméket vákuumban szárítjuk, majd kromatografálással tisztítjuk, miközben első oldószerként kloroform, metanol és 2,5 n ammónia 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk, majd második oldószerként kloroform, metanol és víz 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta eluált frakciókat egyesítjük, bepároljuk, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd a terméket 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,9 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> dimetil-amino-etil-amidját kapjuk. Hozam: 92,9%.

Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,14.

Az IR-spektrum már nem mutatja az 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző észtertkötést.

### 39. példa

#### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> dietil-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 25 ml dietil-aminban elosztatjuk. A kapott elegyet vízmentes körülmények között alacsony hőmérsékleten, például -5 °C-on, 24 óra hosszat kever-

jük. A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, majd a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

5 Az így kapott 5,1 g nyers termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk és a kapott elegyet 25 °C-on 30 percig állni hagyjuk, miközben az észtertkötés hidrolizál, ezt követően vízzel dializálunk, a terméket vákuumban szárítjuk, majd szilikagélen kromatografáljuk, miközben első oldószerként kloroform, metanol és 2,5 n ammónia 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk, második oldószerként kloroform, metanol és víz 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta, eluált frakciókat egyesítjük, majd 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk és a kapott amidot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,7 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> dietil-amidját kapjuk. Hozam: 90,0%.

5 Szilikagélen történő kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,50. Az IR-spektrum már nem mutatja az 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző észtertkötést.

### 40. példa

#### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> 2-etanol-amidjának előállítás*

5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> belső észterét 50 ml vízmentes kloroform és izopropanol 1:1 arányú elegyében elosztatjuk, majd a kapott oldathoz 388 mg (6,36 mmol) 2-etanol-amint adunk és a kapott elegyet vízmentes körülmények között 25 °C-on folyamatosan keverjük.

35 A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk és a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük, majd a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

40 Az így kapott 5,1 g nyers termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd a kapott elegyet 25 °C-on 30 percig állni hagyjuk, így az észtertkötés hidrolizál. Ezt követően vízzel dializálunk, majd vákuumban szárítjuk a terméket és utána tisztítjuk, miközben első oldószerként kloroform, metanol és 2,5 n ammónia 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk, második oldószerként pedig kloroform, metanol és víz 60:40:9 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta, eluált frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyét alkalmazzuk és az amidot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

45 Termékként 4,8 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> 2-etanol-amidját kapjuk. Hozam: 82,5%.

50 Szilikagélen történő kromatografálás útján, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. Rf = 0,49. Az IR-spektrum már nem mutatja az 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző észtertkötést.

### 41. példa

#### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> benzil-amidjának előállítás*

60 5 g (3,18 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub>

belső észterét 20 ml vízmentes piridinben oldjuk és a kapott oldathoz 374 mg (3,50 mmol) benzil-amint adunk, majd a kapott oldatot vízmentes körülmények között 25 °C-on 24 óra hozat keverjük. A reakció befejeződése után az oldószert elpárologtatjuk, a maradékot 50 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyével eldörzsöljük és a terméket 250 ml acetonnal kicsapjuk.

Az így kapott 5,1 g termékhez 100 ml 1%-os nátrium-karbonát-oldatot adunk, majd az elegyet 25 °C-on 30 percig állni hagyjuk, így az észtercsoport hidrolizál. Ezután vízzel dializálunk, a terméket vákuumban szárítjuk, majd Sephadex DEAE A25 acetát-formájának segítségével történő kromatografálás útján tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és víz 30:60:8 arányú elegyét alkalmazzuk. Az egyesített semleges frakciókat bepároljuk, 15 ml kloroform és metanol 1:1 arányú elegyében eloszlatjuk, majd az amidot 75 ml acetonnal kicsapjuk.

Termékként 4,6 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> benzil-amidját kapjuk. Hozam: 78,8%.

Szilikagélen történő kromatografálás útján tisztítjuk a terméket, miközben oldószerként kloroform, metanol és 0,3%-os kalcium-klorid-oldat 60:35:8 arányú elegyét alkalmazzuk. A kapott termék egységes vegyület. R<sub>f</sub> = 0,69. Az IR-spektrum már nem mutatja az 1750 cm<sup>-1</sup>-nél jellemző észterkötést.

#### 42. példa

##### *N-Pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterének peracetátja*

5 g (3,09 mmol) N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterét 50 ml vízmentes piridinben feloldjuk, majd a kapott oldathoz 25 °C-on 25 ml frissen desztillált ecetsavanhidridet adunk, az oldatot állandó keverés közben 72 óra hosszat szobahőmérsékleten tartjuk. A reakció befejeződése után az oldatot vákuumban szárítjuk és a maradékot 100 ml jeges víz és 200 ml etil-acetát között megoszlatjuk. Az etil-acetátot ezután hideg 0,1 mólos sósav-oldattal, majd utána 0,1 mólos nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal mossuk. A szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítjuk, utána vákuumban szárítjuk és a maradékot preparatív kromatográfias módszerrel szilikagélen tisztítjuk, miközben oldószerként diklór-metán, etil-acetát és izopropanol 70:30:45 arányú elegyét alkalmazzuk. A tiszta frakciókat egyesítjük, bepároljuk, majd 20 ml etil-éterben eloszlatjuk, utána 100 ml di-normál-hexánnal kicsapjuk.

Termékként 4,5 g N-pivaloil-N'-acetil-di-lizo-GM<sub>1</sub> etil-észterének peracetátját kapjuk. Hozam: 63,2%.

Szilikagélen történő vékonyréteg-kromatografálás után, miközben oldószerként kloroform, etil-acetát és izopropanol 95:5 arányú elegyét alkalmazzuk, egységes vegyületet kapunk. R<sub>f</sub> = 0,49, illetőleg 0,28.

#### 43. példa

##### *Injektálható oldatok készítése gyógyszerészeti célra*

1. számú gyógyszerkészítmény – 2 ml oldat tartalma:

– hatóanyag	5 mg
– nátrium-klorid	16 mg
– pH = 6 citrát-puffer desztillált vízben	2 ml-ig.

A hatóanyag a 3., 12. vagy 13. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.

2. számú gyógyszerkészítmény – 2 ml oldat tartalma:

5	– hatóanyag	50 mg
	– nátrium-klorid	16 mg
	– pH = 6 citrát-puffer desztillált vízben	2 ml-ig.

A hatóanyag a 8., 15., 20., 25., 26. és 27. példa szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.

3. számú gyógyszerkészítmény – 4 ml-es flakon tartalma:

10	– hatóanyag	100 mg
	– nátrium-klorid	32 mg
15	– pH = 6 citrát-puffer desztillált vízben	4 ml-ig.

A hatóanyag a 4., 5., 14. és 24. példa szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.

Az 1., 2. és 3. számú gyógyszerkészítményeket emberek és állatok kezelésére lehet alkalmazni bármelyik ismertetett kezelési mód szerint. Ezek a készítmények a fenti hatóanyagon kívül más hatóanyagot is tartalmazhatnak.

#### 44. példa

##### *Gyógyászati készítmények kettős flakonokban*

A jelen példa szerinti készítményeket kettős flakonokban készítjük el. Az első flakon tartalmazza a hatóanyagot fagyasztva szárított por alakjában 10 és 90 tömeg% közötti mennyiségben gyógyászati algalmas segédanyagokkal, glicinnel vagy mannittal összekeverve. A második flakon az oldószert tartalmazza nátrium-klorid és citrát-puffer oldatként.

A kezelést közvetlenül megelőzően a két flakon tartalmát összekeverjük és a fagyasztva szárított poralakú hatóanyag gyorsan feloldódik, így injektálható oldat keletkezik. A fagyasztva szárított hatóanyagot tartalmazó flakonos gyógyászati készítmény találmányunk előnyös kivitelezési módját jelenti.

##### 1. számú rendszer

40 a) egy 2 ml-es fagyasztva szárított port tartalmazó flakon az alábbi összetételű:

– hatóanyag	5 mg
– glicin	30 mg

45 b) egy 2 ml-es oldatot tartalmazó ampulla az alábbi összetevőket tartalmazza:

– nátrium-klorid	16 mg
– citrát-puffer desztillált vízben	2 ml-ig.

A hatóanyag a 29. és 30. példa szerint előállított gangliozid-származékok bármelyike lehet.

##### 50 2. számú rendszer

a) egy 3 ml-es, fagyasztva szárított porból készült folyadékot tartalmazó ampulla az alábbi összetételű:

– hatóanyag	5 mg
– mannit	40 mg

55 b) egy 2 ml-es ampullában lévő oldat az alábbi összetevőket tartalmazza:

– nátrium-klorid	16 mg
– citrát-puffer desztillált vízben	2 ml-ig

60 A hatóanyag a 29. és 30. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.

3. számú rendszer  
 a) egy 3 ml-es, fagyasztva szárított porból készült oldatot tartalmazó ampulla az alábbi összetételű:  
 – hatóanyag 50 mg  
 – glicin 25 mg 5  
 b) egy 3 ml-es ampullában lévő oldat az alábbi összetevőket tartalmazza:  
 – nátrium-klorid 24 mg  
 – citrát-puffer desztillált vízzel 3 ml-ig 10  
 A hatóanyag a 31. és 33. példa szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
4. számú rendszer  
 a) egy 3 ml-es, fagyasztva szárított porból készült folyadékot tartalmazó ampulla az alábbi összetételű:  
 – hatóanyag 50 mg 15  
 – mannit 20 mg  
 b) egy 3 ml-es ampullában lévő oldat az alábbi összetevőket tartalmazza:  
 – nátrium-klorid 24 mg  
 – citrát-puffer desztillált vízben 3 ml-ig 20  
 A hatóanyag a 31. és 33. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
5. számú rendszer:  
 a) egy 5 ml-es fagyasztva szárított port tartalmazó flakon az alábbi összetételű:  
 – hatóanyag 150 mg 25  
 – glicin 50 mg  
 b) egy 4 ml-es ampulla az alábbi összetételű folyadékot tartalmazza:  
 – nátrium-klorid 32 mg 30  
 – citrát-puffer desztillált vízben 4 ml-ig  
 A hatóanyag a 41. és 42. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
6. számú rendszer  
 a) egy 5 ml-es, fagyasztva szárított port tartalmazó flakon az alábbi összetételű:  
 – hatóanyag 100 mg  
 – mannit 40 mg  
 b) egy 4 ml-es ampullában lévő folyadék az alábbi összetételű:  
 – nátrium-klorid 32 mg 40  
 – citrát-puffer desztillált vízben 4 ml-ig  
 A hatóanyag a 41. és 42. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
7. számú rendszer  
 a) egy 3 ml-es flakon az alábbi összetevőket tartalmazza:  
 – streril, mikronizált hatóanyag 40 mg  
 b) egy 3 ml-es ampulla az alábbi összetételű folyadékot tartalmazza:  
 – Tween 80 10 mg  
 – nátrium-klorid 24 mg  
 – foszfát-puffer desztillált vízben 3 ml-ig 50  
 A hatóanyag a 34. és 35. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
8. számú rendszer  
 a) egy 5 ml-es flakon tartalma az alábbi összetételű:  
 – steril, mikronizált hatóanyag 100 mg  
 b) egy 4 ml-es ampullában lévő folyadék összetétele az alábbi:  
 – Tween 80 5 mg  
 – szójabab lecitin 5 mg  
 – nátrium-klorid 36 mg  
 – citrát-puffer desztillált vízzel 4 ml-ig  
 A hatóanyag a 37. és 39. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
45. példa  
*Transzdermális kezelésre alkalmas gyógyászati készítmények előállítása*  
 1. számú készítmény – egy tapasz összetétele az alábbi:  
 – hatóanyag 100 mg  
 – glicerin 1,6 g  
 – polivinil-alkohol 200 mg  
 – polivinil-pirrolidon 100 mg  
 – transzdermális áthatoláshoz szükséges segédanyag 20 mg  
 – víz 1,5 g  
 A hatóanyag a 29., 30. és 31. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
2. számú készítmény – 100 g kenőcs az alábbi összetevőket tartalmazza:  
 – hatóanyag (5 g vegyes foszfolipid liposzóma) 4,0 g  
 – polietilén-glikol monosztearát 1,5 g  
 – glicerin 1,5 g  
 – p-hidroxi-benzoészter 125 mg  
 – víz 72,9 g  
 A hatóanyag a 29., 30. és 31. példák szerint előállított gangliozid-származékok bármelyike lehet.
46. példa  
*Orális kezelésre alkalmas gyógyászati készítmények előállítása*  
 1. számú készítmény – egy tablettá tartalma:  
 – hatóanyag 20 mg  
 – mikrokristályos cellulóz 150 mg  
 – laktóz 20 mg  
 – amid 10 mg  
 – magnézium-sztearát 5 mg  
 A hatóanyag az 1., 2., 7. és 10. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
2. számú készítmény – egy tablettá tartalma:  
 – hatóanyag 30 mg  
 – karboxi-metil-cellulóz 150 mg  
 – amid 15 mg  
 – sellak 10 mg  
 – szukróz 35 mg  
 – színezőanyag 0,5 mg  
 A hatóanyag a 12. és 20. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
3. számú készítmény – egy zselatin-kapszula tartalma:  
 – hatóanyag 40 mg  
 – laktóz 100 mg  
 – gasztrerezisztens bevonat 5 mg  
 A hatóanyag a 32., 38. és 42. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.
4. számú készítmény – egy lágy zselatin-kapszula tartalma:  
 60

– hatóanyag	50 mg
– növényi olaj	200 mg
– méhviasz	20 mg
– zselatin	150 mg
– glicerin	50 mg
– színezék	3 mg

A hatóanyag a 32., 38. és 42. példák szerint előállított bármelyik gangliozid-származék lehet.

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás félszintetikus, helyettesítetlen, 1–11 szénatomos alkán-karbonsavakból származó acilcsoportokat tartalmazó N-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok, valamint helyettesítetlen, 1–24 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportokat tartalmazó N'-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok és a fenti gangliozidok szialinsav-karboxilcsoportjain képezett 1–7 szénatomos alkil- vagy fenil-(1–4 szénatomos alkil)-észterei, adott esetben 1–7 szénatomos alkil-, di-(1–4 szénatomos alkil)-, 1–7 szénatomos hidroxil-alkil, fenil-(1–4 szénatomos)-alkil- vagy di(1–7 szénatomos alkil)-amino-(1–7 szénatomos-alkil)-csoporttal helyettesített amidjai és/vagy belső észterei és/vagy a hidroxicsoportokon 1–7 szénatomos alkanoilcsoporttal peracilezett észterei, gyógyászatiilag megfelelő fémsói, ammónium sója, szerves bázis-sói és savaddíciós sói előállítására, azzal a megszorítással, hogy az olyan diacil-származékokban, amelyekben az N'-acilcsoport helyén acetilcsoport áll, az N-acilcsoport csak 1–11 szénatomos alkánsavból származó acilcsoport lehet és az N,N'-diacetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N'-acetil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítása nem tartozik a találmány körébe, *azzal jellemezve*, hogy valamely N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidot vagy valamely N-acil-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidot vagy valamely N'-acil-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidot a kívánt terméknek megfelelő savval vagy annak reakcióképes származékával acilezünk, vagy valamely N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidot a szfingozin nitrogénatomon vagy neuraminsav nitrogénatomon szelektíven dezacilezünk, és kívánt esetben a kapott vegyületet a fenti meghatározásnak megfelelő észterre, amiddá, belső észterre vagy a hidroxicsoportokon peracilezett észterre alakítjuk, vagy gyógyászati szempontból elfogadható sóvá alakítjuk át.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az acilezést valamely lizo-GM<sub>1</sub> gangliozid-származéknak a sav valamilyen reaktív funkcionális származékával történő reagáltatása útján folytatjuk le.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a lizo-gangliozid-származékot a megfelelő sav alábbi származékainak valamelyikével reagáltatjuk:

1. savazid
2. sav-acil-imidazol
3. a sav és trifluor-ecetsav vegyes anhidridje
4. savklorid

5. maga a sav karbo-diimid és kívánt esetben 1-hidroxil-benzotriazol jelenlétében

6. a sav maga melegítés közben

7. a sav metil-észtere melegítés közben

8. a sav fenol-észtere melegítés közben

9. a sav valamilyen sójának 1-metil-2-klór-piridinium-jodiddal történt reakciója útján kapott észter.

5. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként valamely N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozid alkalmazása esetén enyhe acilezési reakciókörülmények között, előnyösen szobahőmérsékleten 1–18 óra alatt folytatjuk le a reakciót.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, az 1. igénypontban meghatározott N-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, amelyek 1–11 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportként egyenesláncú acilcsoportokat tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, az 1. igénypontban meghatározott N-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, amelyek 1–11 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportként hangyasavból, propionsavból, vajsavból, valeriansavból, kapronsavból, izokapronsavból, önantsavból, kaprilsavból, pelarconsavból, kaprinsavból, undekánsavból, terc-butil-ecetsavból és 2-propil-valeriansavból vezethetők le, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, az 1. igénypontban meghatározott N'-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> és N,N'-diacil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, amelyek 1–24 szénatomos alkánsavakból származó acilcsoportként egyenesláncú acilcsoportot tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás egyenesláncú acilcsoportként 12–16 szénatomos alkánsavból származó alkanoilcsoportot tartalmazó N'-acil- és N,N'-di-acil-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás laurinsavból, mirisztinsavból, palmitinsavból vagy sztearinsavból származó acilcsoportot tartalmazó N'-acil- vagy N,N'-di-acil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan, az 1. igénypontban meghatározott N-acil-, N'-acil- vagy N,N'-diacil-di-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok előállítására, amelyek 3–11 szénatomos, illetőleg 3–24 szénatomos elágazó láncú és oldalláncban legfeljebb 4 szénatomos alkilcsoportot tartalmazó alkánsavból származó acilcsoportot tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok 1–7 szénatomos alifás alkoholokból vagy fenil-(1–4 szénatomos alkil)-alkoholokból levezethető észtercsoportú szialinsavas karboxil-észterei- nek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok 1. igénypontban meghatározott amidjainak az előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a kapott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozid belső észterét alkalmas oldószerben ammóniával, illetőleg a megfelelő aminnal reagáltatjuk, majd az észterkötést hidrolizáljuk.

13. Az 1. vagy 12. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok adott esetben 1–7 szénatomos alkilcsoporttal N-helyettesített szialinsav-amidjának előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelően helyettesített kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

14. Az 1. vagy 12. igénypont szerinti eljárás, az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok hidroxil-csoporttal, fenilcsoporttal vagy adott esetben 1–4 szénatomos alkilcsoporttal szubsztituált aminocsoporttal helyettesített (1–7 szénatomos alkil)-amidjainak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

15. Az 1. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok belső észtereinek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a szialinos karboxilcsoportot a molekulán belül egy szacharidos hidroxilcsoporttal, laktonizációs reakcióba visszük.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok szialinos karboxilcsoportok és szialinos hidroxilcsoportok közötti laktongyűrűket is tartalmazó belső észtereinek az előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szialinos karboxilcsoportokat laktonizációs reakcióba visszük szialinos hidroxilcsoportokkal.

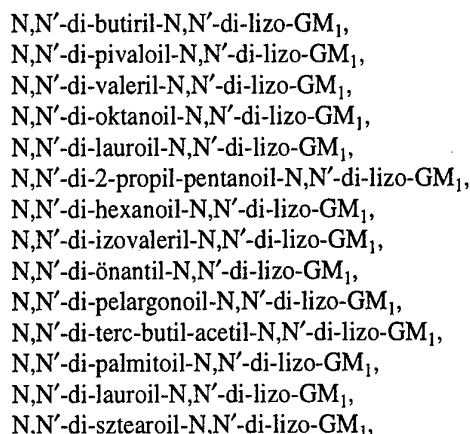
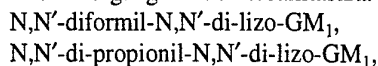
17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok 15. vagy 16. igénypont szerinti belső észtereinek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a laktonképző reagenst, előnyösen diciklohexil-karbo-diimidet vagy 2-klór-1-metil-piridin valamely sóját nem-vizes szeres oldószerben reagáltatjuk az acilezett lizo-GM<sub>1</sub> ganglioziddal.

18. A 15. vagy 16. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok 15. vagy 16. igénypont szerinti belső észtereinek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az acilezett lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidot vizes közegben ecetsavval vagy triklór-ecetsavval kezeljük.

19. Az 1. igénypont szerinti eljárás az 1. igénypontban meghatározott diacil-lizo-GM<sub>1</sub> gangliozidok 1–7 szénatomos alkanoilcsoporttal peracilezett származékainak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelően helyettesített kiindulási vegyületeket alkalmazunk.

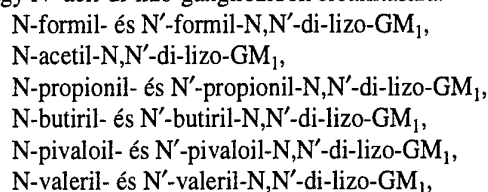
20. A 19. igénypont szerinti eljárás acetilcsoporttal peracilezett 1. igénypont szerinti GM<sub>1</sub>-gangliozid származékok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás az alábbi N,N'-diacil-di-lizo-gangliozidok előállítására:

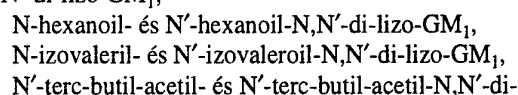


15 *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

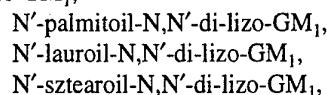
22. Az 1. igénypont szerinti eljárás az alábbi N-acil- vagy N'-acil-di-lizo-gangliozidok előállítására:



25 N-2-propil-pentanoil- és N'-2-propil-pentanoil-N,N'-di-lizo-GM<sub>1</sub>,



30 lizo-GM<sub>1</sub>,



35 *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás az ott meghatározott vegyületek szialinos karboxilcsoportjainak helyettesített észtereinek – amelyek etil-, propil-, izopropil-, n-butil-izobutil-, terc-butyl- vagy benzil-alkoholokból vezethetők le – előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

24. A 22. igénypont szerinti eljárás az ott meghatározott vegyületek szialinos karboxilcsoporton képezett amidjainak – amelyek metil-aminból, etil-aminból, propil-aminból, dimetil-aminból vagy dietil-aminból vezethetők le – előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

25. A 22. igénypont szerinti eljárás az ott meghatározott vegyületek peracetilátjainak, perpropionilátjainak vagy perbutirilátjainak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

26. Az 1–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás bármelyik, az előzőekben meghatározott acil-lizo-gangliozid vagy ezen vegyületek elegyei, amelyek legalább egy savas funkcióval rendelkeznek, gyógyászati-  
lag elfogadható fém-sóinak és ammónium sójának előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az előző igénypontok bármelyike szerint előállított vegyületeket gyógyászati-  
lag elfogadható fém-sókká vagy ammónium sóvá alakítjuk át.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás az ott meghatározott vegyületek nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium-, magnézium- vagy alumínium-sóinak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

28. Az 1–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás bármelyik, az előzőekben meghatározott acil-lizogangliozid, vagy ezen vegyületek elegyeinek, amelyek legalább egy savas funkcióval rendelkeznek, gyógyászatiilag elfogadható szerves bázisokkal képzett sói előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

29. Az 1–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás az előző igénypontok szerint meghatározott, legalább egy bázikus funkcióval rendelkező acil-di-lizogangliozidok vagy ezek elegyei gyógyászatiilag elfogadható savaddíciós sóinak előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1–28. igénypontok bármelyike szerint előállított vegyületeket a megfelelő, gyógyászatiilag elfogadható savaddíciós sókká alakítjuk át.

30. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására,

*azzal jellemezve*, hogy valamely az 1. igénypont szerinti előállított vegyületet vagy annak gyógyászati szempontból elfogadható sóját gyógyszerészeti célra alkalmas vivőanyaggal és/vagy más gyógyszerészeti segédanyaggal való összekeverés útján gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként a 7–11. igénypontok szerinti vegyületeket alkalmazunk a gyógyászati készítmények előállítási eljárásában.

32. A 30. igénypont szerinti eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként a 20. vagy 21. igénypont szerinti vegyületeket alkalmazunk.

33. A 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az idegrendszer zavarainak kezelésére alkalmas gyógyászati készítményeket állítunk elő.

34. A 30. igénypont szerinti eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként N'-acil-N,N'-di-lizogangliozidot – ahol az acilcsoport 12–24 szénatomos lehet – alkalmazunk.

