



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 174775

(13) B

(51) Int Cl⁵ C 07 H 5/06, 15/10, 15/12

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	904921	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	13.11.90	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	13.11.90	(30) Prioritet	14.11.89, IT, 48554/89
(41) Alm. tilgj.	15.05.91		
(44) Utlegningsdato	28.03.94		

(71) Patentsøker	Fidia SpA, Via Ponte della Fabbrica 3/A, I-35031 Abano Terme, IT
(72) Oppfinner	Francesco Della Valle, Padova, IT Aurelio Romeo, Roma, IT
(74) Fullmektig	Onsagers Patentkontor AS, Oslo

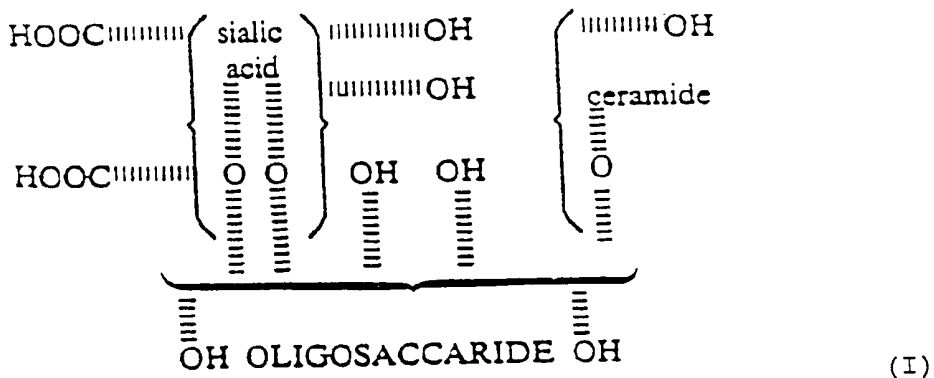
(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte til fremstilling av modifiserte gangliosider og deres funksjonelle derivater**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

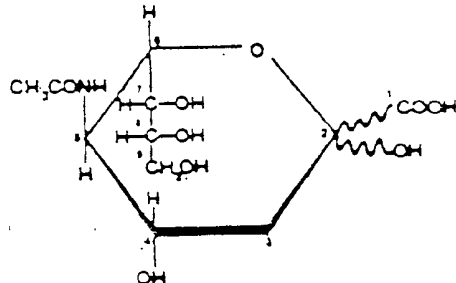
(57) **Sammendrag** N-acyl-N,N'-di-lysogangliosider, N'-acyl-N,N'-di-lysogangliosider og N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider, i hvilke acylgruppene er avledet fra en organisk syre av den alifatiske, aromatiske, aralifatiske, alicykliske eller heterocykliske rekke og i hvilke minst en av de to acylgruppene ikke er alifatiske og deres fremstilling, er beskrevet. I tillegg er også fremstilling av estere, indre estere, amider og hydroksiperacylater av disse forbindelser og saltene derav, beskrevet. Disse forbindelser er nyttige ved behandling av patologiske tilstander i sentralnervesystemet og i det perifere nervesystem.

Den foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av modifiserte gangliosider og deres funksjonelle derivater, nærmere bestemt N-acyl-N,N'-di-lysogangliosider, N'-acyl-N,N'-di-lysogangliosider og N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider, i hvilke acylgruppene er avledet fra en organisk syre av de alifatiske, aromatiske, aralifatiske, alicykliske eller heterocykliske rekker og i hvilke, minst én av de to acylgrupper ikke er alifatiske, deres estere, indre estere, amider og hydroksoy-peracylater og deres salter.

Gangliosidene som ligger til grunn for de nye derivater som fremstilles i henhold til oppfinnelsen, kan være hvilket som helst av gangliosider ekstrahert fra naturlige produkter, og spesielt fra sentralt og perifert nervesystem i vertebrater, fra binyremargen, fra erytrocytter, fra milten eller fra andre organer. De er fortrinnsvis rensede gangliosider, som, skjønt de ikke er enhetlige (unitary) kjemiske forbindelser, kan identifiseres ved en tilnærmet formel som omfatter en oligosakariddel, generelt kjemisk veldefinert for hvert gangliosid, en sialindel (dvs. bestående av en eller flere sialinsyrer) og en ceramid. De to siste deler består generelt av en blanding av forskjellige sialinsyrer og forskjellige N-acyl-sfingosiner, hvis alifatiske kjeder har varierende lengder og forskjellige acyler avledet fra høyere fettsyrer. Den tilnærmede formel til et slikt gangliosid kan være som følger

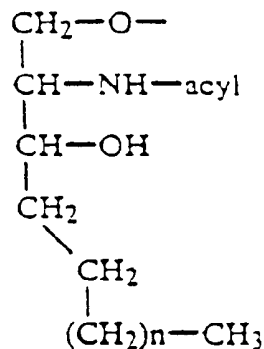
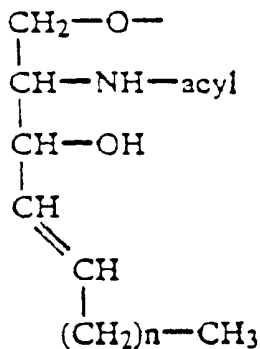


hvor sialinsyrene har den generelle formel



(II)

i hvilken en eller flere av de primære eller sekundære hydroksygruppene kan acyleres, og i hvilke acylgruppene er avledet fra eddiksyre eller glykolsyre og "ceramid"-resten svarer til en av formlene:



i hvilke n er lik 6-18, og acylgruppen er avledet fra en mettet eller umettet fettsyre som har fra 16 til 22 karbonatomer eller fra en tilsvarende hydroksy-syre. De nye derivater fremstilt i henhold til oppfinnelsen varierer med hensyn på dette acyls egenskap. Acyldelen er enhetlig deri, mens i gangliosidene er den en blanding avledet fra forskjellige alifatiske syrer som har fra 16 til 22 karbonatomer. En annen forskjell er at acyl tilhører en rekke av karboksyrer som ikke er naturlig forekommende, i motsetning til gangliosider, dvs. syrer fra aromatiske, alicykliske eller heterocykliske rekker. De er derfor semi-syntetiske gangliosidderivater som inneholder et unaturlig ceramid.

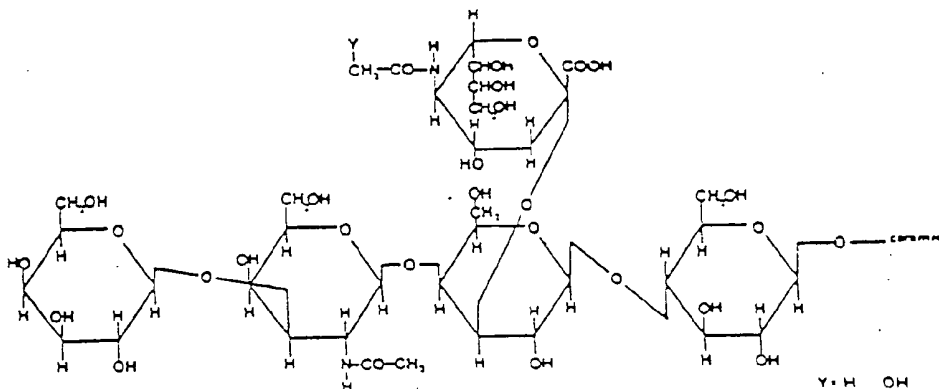
Antall sialinsyrer tilstede i gangliosidene varierer vanligvis fra 1 til 5. Sialinrestene er bundet til oligosakkaridet med en

ketose-type binding dannet av hydroksyl i 2-posisjonen med et hydroksyl fra oligosakkaridet.

Når flere sialinsyrer er bundet sammen, er deres molekyler forent ved ketosebindinger dannet mellom hydroksylgruppene i posisjoner 2 og 8 i to sialinsyremolekyler. Sialinsyrene i gangliosider, innbefattet de som er rensset slik det er beskrevet ovenfor, er blandinger av forskjellige kjemisk enhetlige syrer, f.eks. N-acetylneuraminsyre og N-glykolylnuraminsyre, hvor den førstnevnte er dominerende, og mulig en eller flere av deres O-acylderivater, f.eks., 8-O-acylderivater.

Oligosakkaridet er sammensatt av maksimum 5 monosakkarider eller deres derivater med en acylaminogruppe, spesielt heksoser og deres derivater av ovennevnte type. Minst ett glukose- eller galaktosemolekyl er imidlertid tilstede i oligosakkaridet. Den hyppigste resten som et acylaminoderivat av ovennevnte sukkere er N-acetylglukosamin og N-acetylgalaktosamin.

For å illustrere bedre strukturen til gangliosidene innbefattet i formel (I), som i alt vesentlig er strukturen til oppfinnelsens derivater, og spesielt beskaffenheten av bindingene mellom sakkariddelen, sialinsyrene og ceramidet formelen til et "rent" gangliosid GM₁ herved presentert i sin helhet. Dette inneholder en enkel sialinsyre (representert av N-acetylneuramin- eller N-glykolylnuraminsyre):



Formelen er i alt vesentlig den samme for derivater av gangliosidet "GM₁" fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse, med ceramidrester substituert av et tilsvarende "kunstig" ceramid, hvis N-acylgruppe er avledet fra en av syrene i de aromatiske, alisykliske eller heterosykliske rekker.

Uttrykket "lysogangliosid" anvendes i litteraturen for å beskrive forbindelser som fås fra naturlige gangliosider ved eliminering av den acylgruppe som foreligger i disse på sfingosin-nitrogenet. Elimineringen kan utføres enzymatisk, f.eks. ved at gangliosidene utsettes for virkningen av glykosfingolipid-ceramiddeacylase-enzym. Ved bruk av denne type hydrolyse er det mulig å etterlate intakt acylamino- og acylhydroksoy-gruppene av neuraminsyren. For å deacylere også disse grupper og således oppnå et gangliosidderivat som inneholder to frie aminogrupper både på sfingosin-nitrogenet og på neuramin-nitrogenet, må kjemisk hydrolyse anvendes, f.eks. med fortynnet kaliumhydrat. Gangliosidderivatene som fås ved deacylering på neuramin-nitrogenet som tidligere beskrevet er vanligvis omtalt i litteraturen som "de-N-acetyl-gangliosider", fordi acylgruppen i denne posisjon er acetylgruppen. Ved å kalle de to nitrogenatomer i sfingosin- og neuraminrestene for henholdsvis N og N', kan nomenklaturen "N'-lysogangliosid" anvendes på de ovenfor angitte de-N-acetyl-gangliosider på samme måte som uttrykket lysogangliosider anvendes på derivater med en fri aminogruppe i sfingosinresten, som derfor mer nøyaktig bør identifiseres som "N-lysogangliosider". Uttrykket N,N'-di-lysogangliosider på den annen side, betegner den forbindelse som har begge de frie aminogrupper. Som tidligere nevnt vil denne nomenklatur anvendes i den foreliggende søknad.

Den ovenfor angitte definisjon av derivatene fremstilt i henhold til oppfinnelsen omfatter gruppen av gangliosid-derivater som oppviser en acetylgruppe på neuraminnitrogenet og et aromatisk, aralifatisk, alisyklisk eller heterosyklisk acyl på sfingosinnitrogenet.

Oppfinnelsen omfatter også fremstilling av N-acyl-lysogangliosider av denne type, avledet fra de ovenfor angitte lysogangliosider som oppnås enzymatisk og som derfor i sialinsyrene inneholder acylgrupper som foreligger i naturlige gangliosider, og blandinger av acylaminogruupper avledet i alt vesentlig fra eddiksyre og i mindre grad fra glykolsyre, og muligens acylgrupper som forestrer hydroksygruppene. Uttrykket "N-lyso-gangliosider" eller "N-acyl-lysogangliosider" skal derfor anvendes i den følgende beskrivelse av oppfinnelsen både for disse derivater, som skal kvalifiseres som "naturlige" (f.eks. naturlig N-lyso-GM₁), og for dem med en enhetlig acetylgruppe på neuramin-nitrogenet, som skal navngis uten denne tilføyelse, eller fortrinnsvis som et derivat av N,N'-di-lysogangliosider, f.eks. N,N'-di-acetyl-N,N'-di-lyso-GM₃.

Uttrykket "acyl-di-lysogangliosider" skal imidlertid heretter også anvendes for å betegne alle de nye forbindelser ifølge oppfinnelsen. Som det skal forklares nærmere senere, er det mulig å selektivt deacylere et gangliosid på nitrogen- og neuramin-hydroksygruppene, f.eks. med et fortynnet alkalisk hydroksid. I disse forbindelser gir acylering av neuramin-restens aminogruppe med et acyl som er forskjellig fra acetylet (og glykolet) N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider som bevarer en naturlig del av gangliosidene, dvs. den blandede acylgruppe som fås fra høyere alifatiske syrer på sfingosinnitrogenet. Disse derivater som utgjør en preferensiell gruppe av de nye forbindelser ifølge oppfinnelsen, skal betegnes N'-acyl-N'-lysogangliosider, f.eks. N'-benzoyl-N'-lyso-GM₁.

Det er velkjent at gangliosider spiller en viktig rolle i nervesystemet og det er nylig blitt demonstrert at de er nyttige i terapi for sykdomstilstander i det perifere og sentrale nervesystem [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. del Lavoro, 68, 296 (1977); Brain Res. 197, 236 (1980)]. Den terapeutiske

virkning av gangliosider synes å bestå hovedsakelig av stimuleringen av spiringsfenomener (sprouting phenomena) i nerveceller og i aktivering av membranenzymmer som er involvert i nerveledning såsom enzymet (Na^+, K^+) ATPase [Brain Res., 197, 236 (1980), J. of Neurochem. 37, 350 (1981)]. Gangliosidstimulert nervespiring fremmer funksjonell helbredelse av skadet nervevev.

Ytterligere undersøkelser er blitt utført for å finne forbindelser som kan vise seg mer effektive enn gangliosider til behandling av sykdomstilstander i nervesystemet. Disse undersøkelser førte f.eks. til den oppdagelse at indre estere av gangliosider, hvor ett eller flere hydroksyler i sakkariddelen er forestret med en eller flere karboksygrupper av sialinsyrer (intramolekylær reaksjon), med dannelse av det samme antall laktonringer, er mer aktive enn gangliosidene selv når det gjelder å fremme nervespiring og aktivering av membranenzymene som er involvert i ledning av nervestimuli, såsom enzymet (Na^+, K^+) ATPase (se f.eks. US-PS 4 476 119, 4 593 091 og 4 716 223).

"Ytre" estere av gangliosider oppviser også forbedret aktivitet med hensyn på nervespiring og ledning av nervestimuli, dvs. estere av karboksylfunksjonen av sialinsyrer med forskjellige alkoholer fra de alifatiske, aralifatiske, alicykliske og heterocykliske rekker. Gangliosidamider har også de samme egenskaper, og det har også de peracylerte derivater av amider, estere og enkle gangliosider. Alle disse derivater, som er beskrevet i US-PS 4 713 374, kan også oppfattes som grunnsubstanser for de nye N-acylerte derivater ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Det er således hensiktene med oppfinnelsen å fremstille nye semisyntetiske gangliosidderivater.

Disse hensikter er oppnådd ved foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av kravene.

De nye forbindelser fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse er semisyntetiske gangliosidanaloger og avviker fra tidligere kjente molekyler ved nærvær av N-acylgrupper, både på sfingosinnitrogenet og på neuraminnitrogenet. De er ikke "naturlige" og har derfor minst én acylgruppe avledet fra syrer av aromatiske, aralifatiske, alisykliske eller heterosykliske rekker. De avviker i tillegg fra naturlige gangliosider (med det ovenfor angitte unntak av "naturlig" N-acyl-N-lysogangliosider og N'-acyl-N'-lysogangliosider) pga. det faktum at acylgruppene er enhetlig og veldefinerte. De derivater som inneholder en avvikende acylgruppe fra acetyl på neuramin-nitrogenet kan være acylgrupper av typen som er tilstede i naturlige gangliosider, dvs. blandinger av høyere fettsyrer såsom stearin- og palmitinsyre.

Grunnlaget for den foreliggende oppfinnelse er oppdagelsen at de nye "semisyntetiske" gangliosider i det vesentlige har de samme farmakologiske virkninger som naturlige gangliosider og deres estere, amider, indre estere og peracylerte derivater av alle disse forbindelser. De har et virkningsområde som er modifisert med hensyn på mange parametre, såsom hvor raskt spiringsfenomenet til nervecellene inntreffer, dets varighet og intensitet, og som kan reguleres i henhold til den større eller mindre lipofile eller hydrofile karakter av acylkomponenten, eller typen og omfanget av bivirkninger, som i noen tilfelle kan være av negativ eller positiv art i henhold til det terapeutiske problem som behandles. Et eksempel er den hemmende virkning på protein kinase C, som kan være en uønsket og negativ virkning i visse tilfelle av ubalanse i de normale mekanismer for neurotransmisjonsfunksjoner. Aktivering igangsettes ved en øket konsentrasjon av eksiterende aminosyrer såsom glutaminsyre og/eller asparaginsyre. Disse syrer har, under de ovenfor angitte unormale betingelser, en direkte toksisk virkning på nerveceller. En stor fordel med produktene fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse, som adskiller dem fra andre protein kinase C inhibitorer, såsom gangliosidene selv eller sfingosin, består i deres evne til å hindre og bekjempe den ovenfor angitte neurotoksiske virkning.

Det er viktig å understreke at produktene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, i motsetning til kalsiumantagonister og glutamat-reseptor-antagonister (spesielt NMDA) bare virker under unormale forhold, og begrenser derfor lokalisert neurotoksisitet og opprettholder neuroplastisitet og tillater derved en raskere restitusjon av svekkede fysiologiske funksjoner. I mange tilfelle er det mulig å utnytte derivatene av oppfinnelsen til å ta i bruk virkningen av selve syrene, tilsvarende en gitt acylgruppe, idet den spesielle virkningen av gangliosid delen unngås, som i slike tilfelle fungerer som en vehikkel. Dette er tilfelle, f.eks. med den nye type av gangliosid i hvilke N-acylgruppen er avledet fra en syre som virker på det sentrale eller perifere nervesystem, såsom lyserginsyre og dens analoger, eller nikotin- og isonikotinsyrer. Disse syrene har en viss virkning in vitro, men neppe noen, eller overhodet ingen virkning i in vivo. Når de innføres i molekylet til et gangliosid fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse, synes virkningens fulle omfang å være in vivo.

Gangliosidderivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan derfor benyttes istedenfor naturlige produkter, eller de ovenfor angitte allerede kjente semisyntetiske derivater. De har stor verdi i tilfeller hvor pasientene ikke reagerer tilfredsstillende på konvensjonelle produkter, eller i tilfeller hvor det foreligger individuelle idiosynkrasier eller allergier. De kan videre benyttes som vehikler pga. den spesifikke farmakologiske virkning av syren som svarer til N-acylgruppen.

Lysogangliosidene, som tjener som basis for fremstillingen av de nye acyl-di-lysogangliosider i henhold til den foreliggende oppfinnelse, er fremfor alt de som oppnås ved deacylering av gangliosider funnet i naturlige produkter, og spesielt i vev fra sentralt og perifert nervesystem hos vertebrater, i tillegg til binyremarg, erytrocytter, milt eller i andre organer. De kan være rensede gangliosider som de angitt med denne beteg-

nelse i litteraturen og har en enhetlig struktur i sin sakkariddel, eller de kan være gangliosidblandinger. Blant de viktigste gangliosider som kan anvendes som startgrunnlag for de nye derivater i oppfinnelsen, kan f.eks. nevnes de hvor oligosakkaridet er dannet fra maksimalt 4 heksoserester og hvor denne sakkariddel er kjemisk enhetlig. Heksoser velges fortrinnsvis fra gruppen dannet av N-acetylglukosamin og N-acetylgalaktosamin (gangliosidgruppe A). Gangliosidene i denne gruppe er f.eks. de som er ekstrahert fra virveldyr-hjerner, såsom de beskrevet i artikkelen "Gangliosids of the Nervous system" i "Glycolipid Methodology", Lloyd A. Witting Ed., American Oil Chemists Society, Champaign, III, 187-214 (1976) (se spesielt tabell 1), f.eks. gangliosider GM_4 , GM_3 , GM_2 , $GM_1-ClcNAc$, GD_2 , $GD_{1A}-GalNAc$, GT_{1C} , GQ og GT_1 og, spesielt, de hvor oligosakkaridet inneholder minst én glukoserest eller galaktoserest og enten N-acetylglukosamin eller N-acetylgalaktosamin og fortrinnsvis den følgende (gangliosidgruppe B):

GM_1

Gal(1 → 3)GalNAc(1 → 4)Gal(1 → 4)Glc(1 → 1) Ceramid



NANA

GD_{1a}

Gal(1 → 3)GalNAc(1 → 4)Gal(1 → 4)Glc(1 → 1) Ceramid



NANA



NANA

GD_{1c}

Gal(1 → 3)GalNAc(1 → 4)Gal(1 → 4)Glc(1 → 1) Ceramid



NANA



NANA

GT_{1b}

Gal(1 - 3)GalNAC(1 - 4)Gal(1 - 4)Glc(1 - 1) Ceramid

$$\begin{pmatrix} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{pmatrix}$$

NANA

$$\begin{pmatrix} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{pmatrix}$$

NANA

$$\begin{pmatrix} 3 \\ \uparrow \\ 2 \end{pmatrix}$$

NANA

hvor Glc betegner glukose, GalNAC betegner N-acetyl-galaktosamin, Gal betegner galaktose, og NANA betegner N-acetylneuraminsyre.

Inkludert fremstillingen i henhold til den foreliggende oppfinnelse er også blandinger av de nye N-acyl-lysogangliosider og særlig de som skriver seg fra gangliosidblandinger slik de foreligger i ekstrakter fra forskjellige dyrevev, såsom i "totale" ekstrakter, eller i forskjellige fraksjoner, f.eks. de som er angitt i litteraturen. Eksempler på slik litteratur omfatter de artikler som er angitt ovenfor, eller artiklene: "Extraction and analysis of materials containing lipid bound sialic acid" i den nevnte publikasjon, side 159-186 (1976) og "Gangliosides of the Nervous System" fra samme publikasjon, side 187-214, og tysk patentskrift nr. 25 49 680. I disse nye blandinger er N-acyl-delen av gangliosidblandingene substituert med en av de ovenfor angitte acylgrupper, og de kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse som er angitt nedenunder for deacyleringen av gangliosidblandingene og påfølgende reacylering, eventuelt etter reacyleringen av andre deacylerte grupper i sialindelen av gangliosidene. Blant de viktigste gangliosider som kan anvendes som startprodukter, er gangliosidekstrakter som fås fra nervesystemet, særlig fra hjernen og som inneholder gangliosidene GM₁, GD_{1a}, GD_{1b} og GT_{1b}, som allerede angitt.

Som beskrevet ovenfor er grunnlaget for den foreliggende oppfinnelse den oppdagelse at de nye semisyntetiske gangliosid-analoger, som her er beskrevet og deres ovenfor angitte funksjonelle derivater eller deres salter, har i alt vesentlig de samme farmakologiske virkninger som naturlige gangliosider eller deres analoge funksjonelle derivater, med et virkningsområde som er modifisert med hensyn på mange parametre.

Disse modifiserte gangliosidene har også en inhiberende virkning på protein kinase C aktivering.

De ovenfor angitte farmakologiske egenskaper til de modifiserte gangliosider fremstilt i henhold til oppfinnelsen, kan illustreres ved følgende eksperimenter:

I primære nervecellekulturer vil stimulering av eksitatoriske aminosyre (EAA)-reseptorer forsterke økningen i innstrømning og translokasjon av Ca^{+2} med påfølgende aktivering av protein kinase C (PKC) fra cytosol til membranene. Tilsetning av glutamat til primære kulturer med granulære celler eller at de utsettes for anoksiske forhold foranlediger celledød som fører til nervedød. Akutt cerebral ischæmi ledsages av en forandring i glutamerg translokasjon, tilsvarende in vitro som utløser en kaskade av hendelser som fører til celledød.

Det er kjent at forbehandling av primære nervekulturer med trisialosyl-N-tetraglykosylceramid (GT_{1b}) eller monosialosyl-N-tetraglykosylceramid (GM_1) inhiberer PKC-translokasjon og beskytter mot glutamatforanlediget celledød.

Bindingsundersøkelser har vist at virkningsmekanismen til gangliosidene ikke er knyttet sammen med reseptorantagonisme.

Eksperimentene rapportert her er utført med gangliosid-derivatene N'-3,4,5-trimetoksybenzoyl-N'-lyso- GM_1 (Ligade 5), N-(2-furoyl)-N-lyso- GM_1 (Ligade 34), N-(1-metyl-2-pyrrol-karbonyl)-N-lyso- GM_1 (Ligade 38), N-(2-tiofenacetyl)-N-lyso- GM_1

(Ligade 45), N,N'-difenylacetyl-di-lyso-GM₁ (Ligade 82), N,N'-di-(2-pyridylacetyl)-di-lyso-GM₁ (Ligade 84), og N,N'-di-(5-metyl-2-tiofenkarboksyl)-di-lyso-GM₁ (Ligade 85), som er passende for vurdering av kapasiteten til å antagonisere selektiv nervedød induisert ved glutamat.

MATERIALER OG METODER

Cellekulturer

Primære kulturer av cerebellare granuløse celler fra 8-dagers gamle Sprague-Dawley-rotter, sammensatt av >90% av granuløse celler, tilnærmet 5% av GABAergiske nevroner og <5% av gliaceller, ble anvendt. I disse eksperimenter ble cellene benyttet på kulturens tolvte dag.

Induksjon av nevrotoksisitet med glutamat

Glutamatet (100 μ m i Lockes oppløsning uten Mg⁺²) ble tilsatt cellene som ble etterlatt i 15 minutter ved værelsestemperatur (kontrollene fikk intet glutamat); kulturene ble vasket tre ganger med Lockes oppløsning for å fjerne overskudd av glutamat, og deretter tilbakeført til det originale kulturmedium.

Oppløseliggjøring, inkubering av forbindelsen og analysemetode

Ligade 5, 34, 38, 45, 82, 84 og 85 ble oppløst i kloroform/metanol 2:1, tørket i N₂, resuspendert i Lockes oppløsning pluss Mg⁺² med en endelig konsentrasjon på 5x10⁻⁶ M, og tilsatt kulturene ved 37°C, 15 minutter før induksjon av nevrotoksisitet. GM₁, tilsvarende oppløseliggjort og anvendt ved en endelig konsentrasjon på 1x10⁻⁴ M, ble satt til cellene 120 minutter før de ble utsatt for L-GLU.

Celleoverlevelse ble bedømt 24 h senere ved den kolorimetriske metode (D.O. 570-630) som anvender MTT (3-4,5-dimetyl-tiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium).

RESULTATER

Forsøkene viste at Ligade 5, 34, 38, 45, 82, 84 og 85, med en konsentrasjon på 5×10^{-6} M, og ved bruk av GM₁ med en konsentrasjon på 1×10^{-4} M som kontroll, var effektive til å beskytte mot glutamatindusert nevrotoksisitet ($p < 0,05$) (tabell 1).

Det skal bemerkes at Ligade-derivatene er virkningsfulle ved doser 10 ganger mindre enn de krevet av GM₁ og etter langt kortere preinkubasjonstider.

DISKUSJON

De oppnådde resultater angir klart at de nye gangliosid-derivater, betegnet Ligade 5, 34, 38, 45, 82, 84 og 85 er istand til å antagonisere glutamatindusert nevrotoksisitet i primære kulturer av cerebellare granuløse celler.

Virkningen av de nye derivatene er spesielt interessant siden den er observert ved konsentrasjoner mer enn 10 ganger mindre enn konsentrasjoner av GM₁ på tilsvarende effektivitetsnivåer, og etter kortere preinkubasjonsperioder.

I henhold til denne virkning kan derivatene fremstilt ifølge oppfinnelsen anbefales ved akutte og kroniske patologiske tilstander som er basert på skader av glutamergisk type, såsom cerebral ischemi, traume, epilepsi, chorea, Parkinson's sykdom, aldring og demens, såvel som hjerneskader, hypoglykemi og hypoksi. Noen av de grunnleggende mekanismer som er ved hjerneskade, spesielt med hensyn på nevrotoksisitet, er imidlertid også vanlige ved skader på andre systemer, såsom det nevrokardiovaskulære system.

Tabell 1

Beskyttende virkning av Ligade 5, 34, 38, 45, 82, 84 og 85 og GM₁ i en modell hvor nevrotoksisitet er induisert ved eksogent glutamat i primære kulturer av cerebellare granuløse celler.

Forbindelse	Celleoverlevelse MTT (DO 570-630)
Kontroll, Lockes oppløsning - Mg ⁺²	0,156 ± 0,021
L-glutamat	0,103 ± 0,004
L-glu + Ligade 5	0,147 ± 0,014
34	0,126 ± 0,003
38	0,131 ± 0,003
45	0,138 ± 0,006
82	0,165 ± 0,006
84	0,151 ± 0,007
85	0,126 ± 0,008
+ GM ₁	0,133 ± 0,018

De granuløse celler ble anvendt på kulturens tolvte dag og ble utsatt for 100 µM L-glutamat (L-GLU) i 15 minutter ved værelsestemperatur. Ligade-derivatene, oppløst i Lockes oppløsning med en endelig konsentrasjon på 5×10^{-6} M ble tilsatt cellene 15 minutter før induksjon av nevrotoksisitet, mens GM₁ (1×10^{-4} M) ble preinkubert i 120 minutter. $p < 0,05$ for GM₁ og Ligade-derivatene vs. L-GLU.

I lys av de farmakologiske egenskaper beskrevet ovenfor, kan de ovennevnte semisyntetiske gangliosidanaloger benyttes som medikamenter ved følgende patologiske tilstander: Cerebral ischæmi, metabolske encefalopatier såsom hypoglykemi og hypoksi, encefalopatier av toksisk opprinnelse, traumer, elding, epilepsi, nevrodegenerative sykdommer såsom Parkinsons sykdom og Huntingtons chorea, og mentale lidelser.

Administrering foretas vanligvis ved injeksjon (intramuskulær, subkutan, intravenøs, transdermal) eller pulmonal administra-

sjon, fortrinnsvis i passende bufrede, vandige oppløsninger. Sikker lagring av det farmasøytiske preparat kan garanteres ved å fremstille det i form av ampuller som inneholder oppløsninger av derivatet, valgfritt sammen med andre hjelpeingredienser, som vil vises nedenfor i forbindelse med farmasøytiske preparater. Med terapeutisk eller muligvis også preventiv hensikt, og bruk av ovennevnte parenterale administrering, varierer doseringen fortrinnsvis fra 0,05 mg til 5 mg av aktivt stoff pr. kg kroppsvekt/dag, og spesielt mellom 0,05 mg og 2 mg pr. kg kroppsvekt/dag.

Skjønt de nye terapeutiske anvendelser passer generelt ved alle patologiske tilstander forbundet med svekket nerveledning i det sentrale og perifere nervesystem, kan følgende sykdommer nevnes spesielt: Retrobulbar optisk neuritt, paralyse av de okkulomotoriske nerver, trigeminal neuralgi, paralyse av facialnerven og Bells paralyse, Garcins syndrom, traumatiske lesjoner i de perifere nerver, diabetisk og alkoholisk polyneuritt, obstetrisk paralyse, paralyttisk isjias, motor-nevron sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, myelopatisk muskelatrofi, fremadskridende bulbær paralyse, myastenia gravis og Eaton-Lamberts syndrom, muskeldystrofi, svekkelser i synaptisk nerveoverføring i CNS og PNS, og bevissthetsdefekter såsom konfusjon, konkusjon, trombose og emboli.

Oppfinnelsen omfatter også fremstilling av de funksjonelle derivater av sialinkarboksygrupper i de nye acyllysogangliosider, dvs., estere og amider, og i tillegg indre estere med laktonbindinger mellom sialinkarboksygruppene og hydroksylene fra oligosakkarid, tilsvarende de fra gangliosider, såvel som derivater peracylert på gangliosidhydroksylene, både fra acyllysogangliosider og fra deres ovennevnte funksjonelle derivater, og saltene av alle de nye acyl-di-lyso-gangliosider og av deres funksjonelle derivater. Disse sialinfunksjonelle derivater kan oppnås fra de nye acyl-di-lyso-gangliosider ved fremgangsmåter angitt i forskjellige ovennevnte patenter for de tilsvarende gangliosidderivater.

Oppfinnelsen omfatter også fremstilling av blandinger av disse derivater, som oppnås fra blandinger av acyl-lysogangliosider i henhold til oppfinnelsen, oppnådd i sin tur fra de ovennevnte gangliosidblandinger.

Estergruppene i de nye N-acyl-lysogangliosidderivater fremstilt ved oppfinnelsen er avledet særlig fra alkoholer i den alifatiske rekke og spesielt fra de med maksimum 12 og spesielt 6 karbonatomer, eller fra den aralifatiske rekke med fortrinnsvis bare en benzenring, valgfritt substituert med 1-3 lavere alkylgrupper (C_{1-4}), f.eks. metylgrupper, og et maksimum på 4 karbonatomer i den alifatiske kjede, eller ved alkoholer i den alicykliske eller alifatisk alicykliske rekke med bare en cykloalifatisk ring og maksimum på 14 karbonatomer, eller fra den heterocykliske rekke med et maksimum på 12 og spesielt 6 karbonatomer og bare en heterocyklisk ring som inneholder et heteroatom valgt fra gruppen dannet ved N, O og S. Amidgruppene av karboksylfunksjonene i N-acyl-lysogangliosidderivatene fremstilt ved den foreliggende oppfinnelse er avledet fra ammoniakk eller fra aminer av hvilken som helst klasse, fortrinnsvis med maksimum 12 karbonatomer.

De ovenfor angitte alkoholer og aminer kan være usubstituerte eller substituerte, spesielt ved funksjoner valgt fra hydroksy-, amino-, eller alkoksygrupper med et maksimum på 4 karbonatomer i alkyl-, karboksy- eller karbalkoksydelen, med et maksimum på 4 karbonatomer i alkylresten, eller alkylamino- eller dialkylaminogruppen, med et maksimum på 4 karbonatomer i alkylet derav, og kan være mettet eller umettet, spesielt med bare en dobbelbinding.

Alkoholene som forestrer karboksylfunksjonene av N-acyl-lyso-gangliosidene i henhold til fremgangsmåten i den foreliggende oppfinnelse kan være enverdig eller flerverdig, spesielt toverdig. Av alkoholene i den alifatiske rekke skal spesielt nevnes lavere alkoholer med maksimum på 6 karbonatomer, såsom metylalkohol, etylalkohol, propylalkohol og isopropylalkohol, N-butylalkohol, isobutylalkohol og tertiær butylalkohol, og av

de toverdige alkoholer såsom etylenglykol og propylenglykol. Av alkoholer av den aralifatiske rekke kan spesielt nevnes de med en enkelt benzenring, såsom benzylalkohol og fenetylalkohol. Alkoholer av den alisykliske rekke er fortrinnsvis de med bare en cykloalifatisk ring, såsom cykloheksylalkohol (cykloheksanol), terpen-alkoholer såsom metanol eller karvomentol, eller en av terpineolene eller piperitol.

Av alkoholene i den heterocykliske rekke skal spesielt nevnes tetrahydrofuranol eller tetrahydropyranol. Karboksygruppene av N-acyl-lysogangliosidene kan forestres med substituerte alifatiske alkoholer, f.eks. ved aminofunksjoner såsom amino-alkoholer, f.eks. de som har maksimalt 4 karbonatomer og spesielt aminoalkoholer med en dialkyl (C₁₋₄)-aminogruppe såsom dietylamoetanol.

Karboksyamidfunksjonene fremstilt i henhold til oppfinnelsen fås enten fra ammoniakk (amidet er i dette tilfelle det usubstituerte amid -CONH₂) eller fra primære eller sekundære aminer, spesielt fra de som inneholder maksimalt 12 karbonatomer. Disse aminer kan være av aromatiske, heterocykliske, alicykliske, men er fortrinnsvis alifatiske. En foretrukket oppfinnelsesgjenstand er representert ved karboksylamidderivater av alifatiske aminer med et maksimum på 12 karbonatomer, og disse aminer kan ha åpne, uforgrenede eller forgrenede kjeder, og kan være cykliske som f.eks. alkylaminer som fås fra alkylgrupper med mellom 1 og 6 karbonatomer såsom metylamin eller etylamin, propylamin, heksylamin, dimetylamin, dietylamin, diisopropylamin, diheksylamin eller alkylenaminer som fås fra alkylengrupper med uforgrenede kjeder som har mellom 3 og 6 karbonatomer, eller tilsvarende kjeder substituert med mellom 1 og 3 metylgrupper såsom pyrrolidin, piperidin og azepin. Alkyl- eller alkylengruppene av disse aminer kan også være avbrutt i karbonatomkjeden eller substituert med andre heteroatomer, særlig med nitrogenatomer, og amidene ifølge oppfinnelsen fås i dette tilfelle fra diaminer som f.eks. etylendiamin, trimetylendiamin og piperazin. Når alkyl- eller alkylengruppene er avbrutt eller substituert med

oksygen- eller svovelatomer, er amidene aminoalkoholderivater såsom aminoetanol eller aminopropanol, eller de er derivater av morfolin eller tiomorfolin.

Av spesiell interesse for den foreliggende oppfinnelse er de ovenfor angitte estere og amider av N-acyl-lysogangliosider, som fås fra gangliosider av gruppene A og B som angitt tidligere, og deres blandinger.

Oppfinnelsen innbefatter også fremstilling av derivater, peracylerte i hydroksylene av sakkariddelen, av sialinsyrer og ceramid, og av de estere og amider som her er beskrevet. Acylgruppene i disse derivater kan fås fra syrer av de alifatiske, aromatiske, aralifatiske, alicykliske eller heterocykliske rekker. De dannes fortrinnsvis fra syrer av den alifatiske rekke med et maksimum på 10 karbonatomer og særlig 6 karbonatomer, såsom maursyre, propionsyre, smørsyre, valeriansyre, kapronsyre eller kaprinsyre. De kan også fås fra syrer med det samme antall karbonatomer, men substituert, spesielt med hydroksysyrer såsom melkesyre, aminosyrer såsom glycin eller tobasiske syrer såsom ravsyre, malonsyre eller maleinsyre.

Av de aromatiske syrer bør nevnes de som har én enkel benzenkjerne, spesielt benzosyre og dens derivater med metyl-, hydroksyl-, amino- eller karboksygrupper såsom p-aminobenzosyre, salicylsyre eller ftalsyre.

Oppfinnelsen omfatter også fremstilling av peracylerte derivater av N-acyl-lysogangliosider og deres ovenfor angitte blandinger, men med frie karboksyfunksjoner. Spesielt viktige for disse derivater er acylerte derivater av de her angitte syrer. En gruppe av nye derivater som skal nevnes spesielt er den som består av gangliosider som er forestret eller omdannet til amider eller peracylert på hydroksygruppene, hvis estergrupper fås fra alifatiske alkoholer med et maksimum på 6 mettede karbonatomer, usubstituerte eller substituerte med hydroksy-, alkoksygrupper med et maksimum på 4 karbonatomer,

amino-, alkylamino- eller dialkylaminogrupeer med et maksimum på 4 karbonatomer i alkyl-, karboksy-, karbalkoksygrupper med et maksimum på 4 karbonatomer i alkylresten og med de tilsvarende alkoholer med høyst én dobbeltbinding, med aralifatiske alkoholer med én enkelt benzenring, usubstituert eller substituert med 1-3 metylgrupper, ved sykloalifatiske eller alifatisk-sykloalifatiske alkoholer med en sykloheksan-ring, usubstituert eller substituert med 1-3 metylgrupper og med et maksimum på 4 karbonatomer i den alifatiske del, med tetrahydrofuranol eller med tetrahydropyranol.

Amidgruppene i slike derivater fås fra ammoniakk eller fra alkylaminer, dialkylaminer eller alkylenaminer med et maksimum på 6 karbonatomer i alkylgruppen og mellom 4 og 8 karbonatomer i alkylengruppen, og hvor alkyl- eller alkylengruppene kan være avbrutt i karbonatomkjeden ved heteroatomer valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, idet aminogruppen er f.eks. -NH i det tilfelle hvor der foreligger et nitrogenatom substituert med et alkyl med maksimalt 4 karbonatomer, og/eller de kan være substituert ved grupper valgt fra amino-, alkylamino- eller dialkylaminogrupeer med maksimalt 4 karbonatomer i alkyl delen eller med hydroksy- eller alkoksygrupper med maksimalt 4 karbonatomer i alkylgruppen, eller ved aralifatiske aminer med én enkelt benzenring valgfritt substituert med maksimalt 3 metylgrupper med maksimalt 4 karbonatomer i den alifatiske del. Acylgrupper som forestrer hydroksylene er slike derivater som fås fra mettede eller umettede alifatiske syrer med et maksimum på 6 karbonatomer, som også kan være substituert med en funksjon valgt fra hydroksy-, amino- eller karboksygrupper, og deres salter.

Av de funksjonelle derivater av de nye semisyntetiske gangliosidanaloger skal spesielt nevnes sialinesterene av de ovenfor angitte nye forbindelser som fås fra metyl-, etyl-, propyl-, isopropyl-, n-butyl-, isobutyl-, tert-butyl-, benzyl-, allyl-, etoksykarbonylmetyl- eller sykloheksyl-alkoholer, sialinamider som fås fra metylamin, etylamin, propylamin, dimetylamin, dietylamin, pyrrolidin, piperidin, piperazin, morfolin,

tiomorfolin og peracylatene, perpropionylatene, perbutyrylatene, permaleylatene, persuccinylatene og peracylerte analoger av sialinestrene og -amidene som angitt ovenfor. N-acyl-radikaler avledet fra en syre av den aromatiske, alisykliske eller heterosykliske rekke kan ha det sykliske system direkte bundet til karbamidgruppen -NH-CO- av neuramin- eller sfingosinresten på gangliosidderivatet, eller ved en alifatisk-, alkylen- eller alkylidenrest. De ovenfor angitte betegnelser omfatter derfor, innenfor rekkevidden av den foreliggende oppfinnelse, både derivatene av de aromatiske-, alisykliske- eller heterosykliske syrer som sådan (dvs. bundet direkte til karbamidgruppen) og derivatene av aralifatisk-, alifatisk-, alisyklisk- og alifatisk heterosyklisk syre. Ringene i disse hydrokarbylrestene kan selvfølgelig etter tur substitueres med alifatiske hydrokarbylgrupper. De ovenfor angitte alifatiske kjeder kan også avbrytes av heteroatomer, f.eks. de valgt fra gruppen dannet ved N, S og O. De sykliske systemene kan være mono- eller polysykliske, fortrinnsvis i det siste tilfelle bisyklisk. Syrene kan være mono- eller flerbasiske, og fortrinnsvis i det siste tilfelle, tobasisk.

N-acyl-radikalene av forbindelsene fremstilt i oppfinnelsen har fortrinnsvis fra 6 til 24 karbonatomer og kan inneholde ett eller flere sykliske systemer, imidlertid fortrinnsvis bare ett, valgfritt substituert i sin tur med alifatiske hydrokarbylgrupper, spesielt alkyler, fortrinnsvis med et maksimum på 6 karbonatomer. Hydrokarbylrestene i N-acyl-gruppene kan også substitueres, både i de alifatiske deler og i ringene, med funksjoner eller modifiserte funksjoner såsom spesielt halogener, f.eks. klor, brom og fluor, fri eller forestrede hydroksygrupper, fri eller forestrede aminogruyper, eller acylater, eller substituert ved alkyl eller alkylengruyper, frie eller katalyserte oksogruyper, oksimer eller substituerte oksimer, hydrazoner eller substituerte hydrazoner, frie eller eteriserte merkaptogruyper, frie eller substituerte sulfamidgruyper, frie eller forestrede sulfoniumgruyper, sulfoksidgruyper eller nityl- eller nitrogruyper. Estrene av hydroksy- eller aminogruyper kan avledes fra syrer av den alifatiske-,

aralifatiske-, alisykliske- eller heterosykliske rekke. Slike estergrupper er fremfor alt avledes fra terapeutisk akseptable syrer. De alifatiske syrer er fortrinnsvis lavere syrer med maksimum på 8 karbonatomer, såsom eddikk-, propion-, smør- eller valeriansyre, f.eks. isovaleriansyre, eller deres substituerte derivater såsom hydroksysyrer, f.eks. glykolsyre, eller α - eller β -hydroksysmørsyre, melkesyre eller aminosyrer, f.eks. naturlige aminosyrer såsom glysin, alanin, valin eller fenylglysin, eller de basiske syrer såsom malonsyre, ravsyre, maleinsyre eller malinsyre, som også valgfritt kan substituertes.

I den aromatiske rekke er, f.eks. benzosyre eller dens derivater substituert med 1 til 3 lavere alkylgrupper, hydroksy- eller lavere alkoksygrupper, eller ved halogener såsom klor, brom eller fluor. Blant de aralifatiske syrer skal primært de med bare en benzenring nevnes, såsom fenyleddikk- eller fenylpropionsyre, valgfritt substituert som tidligere beskrevet. Alicykliske syrer er fortrinnsvis de med ringer på 5 eller 6 karbonatomer, såsom cykloheksankarbonsyre og cykloheksandikarbonsyre. Syrer i den heterosykliske rekke er de som er rapportert i det følgende, men er fortrinnsvis enkle syrer med bare en heterosyklisk gruppe, såsom derivater av pyridin, f.eks. nikotinsyre og isonikotinsyre eller pyrrolidinkarbonyre.

Passende alkoholer som kan representere den eteriserende komponent på hydroksy- eller merkaptoeteriserende grupper, er alle tidligere oppført med hensyn på estere av sialinkarboksygruppene, idet de er del av acyl-lysogangliosidene i den foreliggende oppfinnelse i form av deres funksjonelle derivater. Fordelaktig er lavere alifatiske- eller aralifatiske alkoholer med et maksimum på 4 karbonatomer i den alifatiske del. Alkyl- eller aralkylgruppene som substituerer på aminogruppene eller som er tilstede i substituerte ketal-, acetal- eller ketogruupper, eller i forestrede karboksygrupper har fortrinnsvis et maksimum på 4 karbonatomer i den alifatiske del og en benzengruppe valgfritt substituert som beskrevet

tidligere. Det samme maksimale antall karbonatomer er også tilstede i alle de alifatiske grupper betegnet som "lavere" i de ovenfor angitte betegnelser. En lavere alkylengruppe, som kan substituere aminogruupper og derved danne mettede heterosykliske grupper, utgjøres fremfor alt av de som har 4 eller 5 karbonatomer.

Aromatiske acylgrupper er avledet primært fra syrer med bare en aromatisk ring, såsom benzosyre og dens derivater substituert av en eller flere, spesielt av 1 til 3 grupper, valgt fra alkyl-, hydroksey-, okso-, amino- merkapto-, karboksy- og sulfoniumgrupper, fri eller funksjonelt modifisert, eller halogener, f.eks. som beskrevet ovenfor. Eksempler på slike syrer inkluderer: Benzoe-, salicyl-, p-aminobenzoe-, de tre isomerer av toluensyre, ftal-, isoftal- eller tereftalsyre, p-hydrokseybenzoe-, protokateku-, anisin-, vanillin-, veratrin-, piperonyl-, resorcyl-, orsellin-, pyrogallus-, p-sulfaminbenzoe-, 2,6-dimetokseybenzoe-, 3,4,5-trimetokseybenzoe-, 2-klorbenzoe-, 3-klorbenzoe-, 4-klorbenzoe-, 4-acetamidbenzoe-, N-acetylantranil-, 3-amino-benzoe-, 4-aminobenzoe-, 2-amino-4-klorbenzoe-, 4-amino-2-klorbenzoe-, 3-amino-4-metokseybenzoe-, 4-butylbenzoe-, 2-klor-5-metyltiobenzoe-, 4-klorfenoksyeddik-, 4-klor-3-sulfamoylbenzoe-, 4-cyanbenzoe-, 2,3-diklorbenzoe-, 2,4-klorbenzoe-, 2,5-diklorbenzoe-, 2,6-diklorbenzoe-, 3,4-doklorbenzoe-, 3,5-diklorbenzoe-, 4-dietylaminobenzoe-, 3,4-difluorbenzoe-, 4-etokseybenzoe-, 2-fluorbenzoe-, 4-fluorbenzoe-, 4-heptyl-benzoe-, 2-(4-hydrokseyfenoksey) propion-, 4-metyltiobenzoe-, fenoksyeddik-, 2-sulfobenzoe- og α -trifluor-o-toluensyre.

Disse acylgruppene kan imidlertid også avledes fra syrer med flere benzenringer, kondenserte eller ikke kondenserte, eller med benzenringer og andre cykliske hydrokarbylrester, såsom alicykliske- eller heterocykliske rester, såsom f.eks. naftol-, p-aminonaftol-, p-hydroksynaftol-, naftalin-, difenyl-o-o'-dikarbon-, 3-metyllinden-2-karboksy- og 2-etoksey-1-naftol-syre.

Av de aralifatiske syrer kan de med bare en benzenring nevnes, valgfritt substituert som beskrevet tidligere, og i hvilke den alifatiske kjede fortrinnsvis har fra 1 til 6 karbonatomer. Slike syrer kan bestå av kjeder som er uforgrenet, forgrenet, mettet eller umettet, og kan også substitueres av en av de ovenfor angitte funksjoner eller deres derivater og/eller kan avbrytes av heteroatomer valgt fra gruppen dannet ved N, O og S, eller ved andre aromatiske eller heterocykliske eller alicykliske kjerner. Spesielle syrer av denne type er, f.eks., fenyleddik-, hydrotropin-, kanel-, fenylpropioargyl-, piperin-, mandel-, 3-(4-fluor-benzoyl)-propion-, α -fluorkanel-, 4-fluorkanel-, 3-fluor-4-hydroksyfenyleddik-, 4-fluorfenoksyeddik-, α -fluorfenyleddik-, 4-hydroksymandel-, (+)-6-metoksy- α -metyl-2-naftalineddik-, 1-naftoksyeddik-, fenoksyeddik-, 4-fenoksybenzoe-, 3-trifluormetylkanel-, 4-trifluormetylmandel-, α,α,α -trifluor-p-tolyleddik-, 3,4,5-trimetoksykanel-, fenylglycin-, D-4-hydroksyfenylglycin-, α -sulfobenzeneddik-, 4-hydroksyfenylpropandi-, α -amino-3,4-di-hydroksybenzeneddik-, 4-aminokanel-, N-benzoyl-L-treonin-, benzyltioglycol-, 4-brommandel-, kloracetyltyrosin-, 2-klor-6-fluorfenyleddik-, 4-klorfenoksyeddik-, transkanel-, 3-(4-fluorbenzoyl)-propion-, 4-fluorfenyleddik-, DL-4-hydroksymandel-, 2-(4-hydroksyfenoksy)-propion-, (S)-(+)- α -metoksyfenyl-eddik-, (R)-(+)- α -metoksy- α -(trifluormetyl)-fenyleddik- og (S)-(-)- α -metoksy- α -(trifluormetyl)-fenyleddiksyre.

Alicykliske acylgrupper er hovedsakelig avledet fra syrer som inneholder 1 til 3 alicykliske ringer, valgt fortrinnsvis fra de som har 5 til 7 cykliske karbonatomer, valgfritt substituert med aromatiske hydrokarbylrester, f.eks. benzen eller naftalen, eller alifatiske rester, f.eks. alkyl eller alkenyl, med fortrinnsvis 1 til 6 karbonatomer, eller med hydroksy-, okso-, amino- eller karboksygrupper, fri eller funksjonelt modifisert, f.eks. som beskrevet tidligere. I gruppene avledet fra alicykliske syrer som sådan, substituerer karboksyl direkte en eller flere atomer av ringhydrogenene, eller det kan finnes i en av de ovenfor angitte alifatiske hydrokarbylgrupper, for

således å fremskaffe alicykliske-, alifatiske syrer. I et slikt tilfelle kan den alifatiske kjeden i slike alicykliske alifatiske syrer substitueres ved funksjoner såsom de oppført ovenfor i tilfelle av aralifatiske syrer, eller den kan avbrytes av heteroatomer såsom de angitt tidligere. Spesielle syrer i denne rekke er f.eks. cyklopropankarboksy-, cyklobutankarboksy-, cykloheksankarboksy-, 1-amino-1-cykloheksankarboksy-, cyklo-pentankarboksy-, 2,2-diklor-1-metylcyklopropankarboksy-, 1-metyl-1-cykloheksankarboksy-, 3-nor-adamantankarboksy-, 1-fenyl-1-cyklopropankarboksy-, (\pm)-1-benzocyklobutenkarboksy-, (1S)-(-)-camfan-, (+)-camforkarboksy-, (-)-isoborneomelke-, (-)-mentoksy-eddik-, 5-metoksy-1-indanon-3-eddik-, 3-metyl-1-adamantaneddik-, 3-metyllinden-2-karboksy-, 2-nor-bornaneddik-, 1,2,3,4-tetrahydro-2-nafton-, 1-adamantaneddik-, cykloheptankarboksy, og cykloheksansmørsyre.

En gruppe av spesiell interesse er omfattet av steroider, såsom f.eks. chol- og cholansyrer, såsom cholansyre, cholsyre, lithocholsyre, deoksycholsyre og de respektive ethionsyrer, ethionsyrene avledet fra androstan eller pregnan eller fra deres umettede derivater i 4,5-posisjonen.

De heterocykliske rester av acyler avledet fra syrer av denne rekke kan være tricykliske eller oktacykliske, fortrinnsvis mellom penta- og hepta-cykliske, og kan inneholde mellom 1 og 4 heteroatomer valgt fra gruppen dannet ved O, N og S, og kan være mettet eller umettet, spesielt med et aromatisk system av dobbeltbindinger. Videre kan de være substituerte av en eller flere av gruppene allerede angitt med hensyn på aromatiske og alicykliske acylgrupper. Spesielt kan de være substituerte av alifatiske hydrokarbylgrupper, spesielt av alkylgrupper med maksimum på 6 karbonatomer, som også kan være avbrutt i karbonatomkjeden av en av de ovenfor angitte heteroatomer. De heterocykliske grupper av denne klasse kan også være substituerte med alifatiske, alicykliske eller aralifatiske syrer og i dette tilfelle kan også den alifatiske kjede være substituert av en av de ovenfor angitte grupper, såsom amino-,

hydroksy-, frie eller funksjonelt modifiserte sulfonium- eller sulfamidgrupper, eller de kan være avbrutt av andre heteroatomer på den ovenfor angitte måte.

Spesielt skal acyler, avledet fra heterocykliske enkeltringede syrer, omtales, såsom pyrrol, pyrazol, imidazol, tiofen, furan, pyran, pyridin, pyrimidin, pyrazin, tiopyran, oksazol, isoksazol, tiazol, isotiazol, triazoler, tetrazol, triaziner, og de som er resultatet av kondensasjon av disse heterocykliske forbindelsene med en benzen- eller naftalinring, eller med flere aromatiske ringer av denne type, såsom spesielt indol, indolisin, kumarin, tionaften, karbazol, indazol, benzimidazol, benzotiazol, benzoisotiazol, kinolin, isokinolin, akridin, fenantridin, kromen, kinolin, ftalasin, kinazolin, fenazin, fenoksazin, fenotiazin og benzodiasepin og de avledet fra kondensasjon av en eller flere av de ovenfor angitte heterocykliske forbindelsene med andre heterocykliske forbindelser og/eller med aromatiske- eller benzenringer.

Endelig skal syrer av den ovenfor angitte type avledet fra alkaloider beskrives. Slike syrer er fortrinnsvis kjente syrer med biologisk eller terapeutisk-farmasøytisk interesse.

Acylene av sfingosin- og/eller neuramingrupper fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse kan avledes fra syreforbindelser av den ovenfor angitte heterocykliske type, i hvilke dobbeltbindinger av den aromatiske type er tilstede, såsom i pyridin eller pyrrol, eller fra tilsvarende derivater, delvis eller fullstendig hydrogenerte, såsom piperidin eller piperazin. De følgende syrer er spesifikke eksempler på slike syrer: 2-furonsyre, 3-furonsyre, 2-tiofeneddiksyre, 2-amino-4-tiazoleddiksyre, 2-amino-4-tiazoleddiksyre, nikotinsyre, isonikotinsyre, picolinsyre, 7-teofyllineddiksyre, 2-aminonikotinsyre, 6-aminonikotinsyre, 5-aminoorotsyre, (S)-(-)-2-azetidinkarboksylsyre, 5-bromnikotinsyre, 5-klorindol-2-karboksylsyre, 6-klornikotinsyre, cinnolin-4-karboksylsyre, L-histidin, N-acetyl-L-histidin, N-acetyl-L-tryptofan, 3-amino-4-pyrazolkarboksylsyre, 3-amino-1,2,4-triazol-5-kar-

boksyre, 5-benzimidazolkarboksyre, 2-benzofurankarboksyre, (+)-biotin, 2-klornikotinsyre, 2,4-dihydrokspyrimidin-5-karboksyre, 5-fluorindol-2-karboksyre, 2-furanpropionsyre, 5-hydantoineddiksyre, 5-hydroksyindol-3-eddiksyre, 5-hydroksy-2-indol-karboksyre, 6-hydroksynikotinsyre, 4-imidazoleddiksyre, 5-metoksyindol-3-eddiksyre, 5-metoksyindol-2-karboksyre, 5-metoksy-2-metyl-3-indoleddiksyre, 4-metoksy-2-quinolinkarboksyre, kinurensyre, tiokinurensyre, 7-klorkinurensyre, klortiokinurensyre, fluortiokinurensyre og trifluormetyl-tiokinurensyre, 1-metyllindol-2-karboksyre, 6-metylnikotinsyre, N-metylnikotinsyre, N-metyl-L-prolinsyre, 1-metyl-2-pyrrolkarboksyre, 3-metyl-2-tiofenkarboksyre, 5-metyl-2-tiofenkarboksyre, niflumsyre, 5-nitro-2-furonsyre, (-)-2-okso-4-tiazolidinkarboksyre, 1-piperidinpropionsyre, 2-pyrazinkarboksyre, 4-pyrazolkarboksyre, 4-pyridazin-karboksyre, 2-pyridyleddiksyre, 3-(3-pyridyl)-akrylsyre, 4-pyridyleddiksyre, (2-pyrimidylio)eddiksyre, quinalsyre, 3-quinolinkarboksyre, 4-quinolinkarboksyre, 4-(2-tienyl)-smørsyre, 3-tifeneddiksyre, 2-tifeneddiksyre, 2-(metyltio)-nikotinsyre, 4-pyridylioeddiksyre, tetrazol-1-eddiksyre, α -okso-2-furaneddiksyre, (metoksymino)-2-furaneddiksyre, 2- α -(metoksymino)-4-tiazoleddiksyre, α -[[4-etyl-2,3-diokso-1-piperazinyl]karbonyl]-benzeneddiksyre, 1,3-ditian-2-karboksyre, 3-(2-klorfenyl)-5-metyl-4-isoksazolkarboksyre, 3-(2-klor-6-fluorfenyl)-5-metyl-4-isoksazolkarboksyre, og 3-(2,6-diklorfenyl)-4-isoksazolkarboksyre.

I N- og N'-acyl-N,N'-di-lysogangliosidene fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse, er acylgruppen en av de ovenfor angitte grupper av aromatiske, alicykliske, alifatiske eller heterocykliske rekker. Derfor må minst én av acylgruppene, både på sfiningosinnitrogenet og på neuraminnitrogenet være av denne beskaffenhet. I N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosidene kan begge acylgruppene avledes fra syrer av de ovenfor angitte rekker og slike forbindelser er av spesiell viktighet når det

angår den foreliggende oppfinnelse fordi de er lettere å fremstille.

I N,N'-diacylderivatene kan imidlertid en av acylgruppene også avledes fra en mettet eller umettet alifatisk syre, substituert eller ikke substituert, fortrinnsvis med fra 1 til 24 karbonatomer. Blant slike syrer kan nevnes de lave syrer som har fra 1 til 11 karbonatomer, uforgrenet eller forgrenet, såsom maursyre, eddiksyre, propionsyre, smørsyrene, valeriansyrene, såsom spesielt n-valeriansyre og isovaleriansyre, pivalinsyre, kapron- og isokapronsyre, enantsyre, kaprylsyre, pelargonsyre, kaprin- og undecylsyre, di-tert-butyleddiksyre, og 2-propylvaleriansyre. Blant de umettede syrer kan angelsyre og tiglinsyre nevnes. Passende syrer med lengre kjeder inkluderer de med uforgrenede kjeder, og spesielt de som har fra 2 til 16 karbonatomer, f.eks. laurinsyre, myristinsyre og palmitinsyre. De med et enda høyere karboninnhold omfatter, f.eks., oleinsyre, elaidinsyre, stearinsyre, eikosankarbonsyre og behensyre. I acylgruppene med forgrenede kjeder er de laterale kjedene fortrinnsvis lavere alkyler med et maksimum på 4 karbonatomer, spesielt metylgrupper.

Av spesiell interesse er N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider i hvilke et alifatisk acyl på neuraminnitrogenet er et blandet acyl, som er tilstede i naturlige gangliosider, dvs. mest acetyl og mindre glykoly, og hvori hydroksylene i neuraminresten også er valgfritt acylert. Slike derivater oppnås ved selektiv hydrolyse på sfingosinnitrogenet i gangliosider og ved acylering av således oppnådde N'-lysogangliosider i N-posisjonen med en av de ovenfor angitte syrer av de aromatiske, aralifatiske, alicykliske eller heterocykliske rekker.

Tilsvarende er det mulig å hydrolysere selektivt gangliosidene på neuraminnitrogenet, og i de oppnådde N'-lysogangliosider acylere aminogruppen i denne posisjon med en av de ovenfor angitte ikke-alifatiske syrer. De blandede acyler avledet fra høyere fettsyrer, som er tilstede i naturlige gangliosider,

forblir på sfingosinnitrogenet. En slik fremstilling er en foretrukket hensikt med den foreliggende oppfinnelse.

De alifatiske acylgrupper som valgfritt er tilstede på neuraminnitrogenet eller sfingosinnitrogenet kan også substitueres med frie funksjonelle eller funksjonelt modifiserte grupper, fortrinnsvis funksjonelt polare grupper. Fortrinnsvis fra 1 til 3 funksjonelle grupper er tilstede og velges ut fra gruppen dannet av hydroksy-, amino-, keton-, merkapto-, karboksy-, sulfonium-, sulfamid-, sulfoksid-, eller sulfon- og nitryl- eller nitrogrupper, og fra de funksjonelle derivater av disse grupper, såsom estere av hydroksy-, merkapto-, karboksy-, sulfonium-, ketal-, acetal-, ketoksin-, aldoksy- og hydrasongrupper. Grupper av denne type kan valgfritt substitueres med lavere alifatiske eller aralifatiske hydrokarbylgrupper som har fra 1 til 6 karbonatomer i den alifatiske del og fortrinnsvis bare én benzenring, såsom alkylamin-, alkylenamin-, alkylmerkapto-, alkylsulfamid- og alkylhydrasongrupper. Blant esterene i hydroksylgruppene kan særlig de uorganiske hydrosider nevnes, dvs. halogener, særlig klor, fluor og brom.

Av spesiell betydning blant de nye acyl-di-lysogangliosider er N-acyl-lysogangliosidene, avledet fra naturlige gangliosider såsom gangliosidene GM₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}, GM₂ og GM₃. I slike derivater er neuraminacylgruppene de som er tilstede i slike gangliosider, dvs., en blandet acetyl-glykolgruppe, hvor acetylgruppen er fremherskende og i hvilke sialinhydroksylgruppene er valgfritt forestret med de tilsvarende syrer. De oppnås fra gangliosider ved enzymatisk hydrolyse som omfatter en deacylering på sfingosinnitrogenet alene og ved påfølgende acylering med en aromatisk-, aralifatisk-, alicyklisk- eller heterocyklisk syre. De følgende er eksempler på hvilke forbindelser som kan oppnås:

N-2,6-dimetoksybenzoyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-metoksy-indanon-3-acetyl-N-lyso-GM₁,
 N-fenylacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-cyklobutankarboksylyl-N-lyso-GM₁,
 N-2-norbornanacetyl-N-lyso-GM₁,

N-furoyl-N-lyso-GM₁,
 N-imidazolacetyl-GM₁,
 N-6-metylnikotinyl-N-lyso-GM₁,
 N-metylprolyl-N-lyso-GM₁,
 N-1-metyl-2-pyrrolkarboksyl-N-lyso-GM₁,
 N-2-pyridylacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-4,4-pyridyltioacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-3-kinolinkarboksyl-N-lyso-GM₁,
 N-tetrazolyl-1-acetyl-N-lyso-GM₁,
 N-7-teofyllinacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-2-tiofenacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-3-amino-1,2,4,-triazol-5-acetyl-N-lyso-GM₁,
 N-acetyl-DL-tryptofenactyl-(α,α,α -trifluor-toloidin)-nikotinyl-
 GM₁,
 N-5-hydantoinacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-hydroksyindol-3-acetyl-N-lyso-GM₁,
 N-2-klornikotinyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-metyl-2-tiofenacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-benzimidazolacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-hydroksy-2-indolacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-3,4,5-trimetoksybenzoyl-N-lyso-GM₁,
 N-cykloheptanacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-cyklopentanacetyl-N-lyso-GM₁,
 N-5-metyl-2-tiofenacetyl-lyso-GM₁
 og de tilsvarende derivater av andre basiske gangliosider,
 navngitt tidligere og de indre estere av alle disse forbindel-
 ser.

Eksempler på N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider er derivatene
 som tilsvarende de ovenfor angitte N-acyl-N-lysogangliosider
 avledet fra GM₁ gangliosider eller de andre gangliosider
 tidligere benevnt, i hvilke aminogruppen på neuraminnitrogenet
 også er acylert med de samme syrer, f.eks.

N,N'-di-cykloheptylacetyl-N,N'-di-lyso-GM₁, N,N'-di-cyklo-
 pentylcarboksyl-N,N'-di-lyso-GM₁, N,N'-di-fenylacetyl-N,N'-
 di-lyso-GM₁, N,N'-dipyridylacetyl-N,N'-di-lyso-GM₁ eller N,N'-
 di(5-metyl-2-tiofenacetyl)-di-lyso-GM₁.

Eksempler på N'-monoacyl-N,N'-di-lysogangliosider avledet fra gangliosidet GM₁ og fra de andre basiske gangliosidene nevnt her, inneholder acylgruppene, som ble nevnt i eksemplene spesifikke for GM₁ N-monolysogangliosider, på neuraminnitrogenet istedenfor på sfingosinnitrogenet. En annen interessant gruppe av forbindelser fremstilt i henhold til den foreliggende oppfinnelse er f.eks. gangliosidderivatene som tilsvarende ovenfor angitte N-acyl-N-lyso-GM₁-forbindelser i hvilke det "naturlig" blandede acyl på neuraminnitrogenet er substituert med en alifatisk syre med fra 3 til 6 karbonatomer, såsom valerian- eller pivalinsyre, eller en syre av denne type substituert med halogener, dvs. mono-kloreddik- eller dikloreddiksyre, eller en alifatisk syre med fra 12 til 18 karbonatomer, såsom palmitin-, olein- eller stearinsyre.

Blant forbindelsene med funksjonelt modifiserte sialinkarboksy-funksjoner kan nevnes estere avledet fra lavere alifatiske alkoholer som har fra 1 til 6 karbonatomer, såsom metyl-, etyl- eller propylestere, amidene avledet fra lavere alifatiske aminer, såsom metylamin, etylamin eller propylamin eller cykliske aminer, såsom piperidin eller piperazin, pyrrolidin, de indre estere og peracylatene, peracetylatene, perpropionylatene, og perbutylatene (dvs. acylater avledet fra alifatiske syrer som har fra 1 til 6 karbonatomer) av alle de ovenfor angitte spesifikke forbindelser.

De semisyntetiske gangliosidanalogene i den foreliggende oppfinnelse kan fremstilles på kjent måte, ved acylering av di-lysogangliosidene eller deres N-acyl eller N'-acylderivater, eller valgfritt selektiv deacylering av N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider på sfingosinnitrogenet og på neuraminnitrogenet.

For å fremstille di-acyl-derivater i hvilke acylaminogruppene avledes fra den samme syre, er det fordelaktig, for enkelthets skyld, å acylere di-lysogangliosidene i en enkel operasjon ved de kjente fremgangsmåter. Di-lysogangliosidene kan oppnås fra gangliosider eller fra N-lysogangliosider ved alkalisk

hydrolyse, f.eks. med hydroksider av tetraalkylammonium, kaliumhydroksid og andre. For å fremstille produkter i henhold til oppfinnelsen i hvilke acylamino-gruppene er avledet fra forskjellige syrer, er det fordelaktig å benytte som utgangsforbindinger N- eller N'-monoacylderivater av di-lysogangliosider. N-mono-acyl-di-lysogangliosidene kan oppnås ved selektiv acylering fra di-lysogangliosider, siden sfingosin-amino-gruppen er mer reaktiv enn neuraminaminogruppen. Moderat acylering av di-lysogangliosidene i henhold til kjente fremgangsmåter, f.eks. ved acyleringsfremgangsmåtene benyttet i peptidkjemien, gjør det mulig å oppnå de ovenfor angitte mono-acyl-derivatene på sfingosinnitrogenet. Dette etterfølges av acylering på neuraminnitrogenet på konvensjonell måte. Acyleringsfremgangsmåten for å oppnå produktene i henhold til oppfinnelsen består i dette tilfelle av en totrinns acyleringsreaksjon.

Forskjellige fremgangsmåter kan benyttes for å fremstille forbindelser med mono-acyler avledet på neuraminnitrogenet. Det er mulig, f.eks., å starte fra di-lyso-gangliosider og fortsette med å utføre en intermediær provisorisk beskyttelse av sfingosin-amino-gruppen, f.eks. ved hydrofob interaksjon med fosfatidylcholin, eller ved acylering med passende beskyttende grupper, påfølgende acylering på neuraminnitrogenet med et derivat av syren som skal introduseres i denne posisjon, deretter avbeskyttelse på sfingosinnitrogenet. Det er også mulig å acylere di-lyso-gangliosidene på de to aminogruppene med den samme syre og deretter utsette di-acylforbindelsen for påvirkning av enzymer som er istand til selektivt å splitte bare acylaminogruppen på sfingosinnitrogenet, f.eks. med enzymer benyttet til å oppnå lyso-gangliosider fra gangliosider. Et eksempel er glykosfingolipid-ceramid-deacylase-enzymet (se skjema 1).

SKJEMA 1

1	Enzymer (Glykosfingolipider Ceramid-deacylase)	N-acyl-N,N'-di-lysogangliosider
	3	
(a)	hydrofob interaksjon med fosfatidylcholin for å be- skytte sfingosin-nitrogenet	
(b)	acetylering på neuramin- nitrogenet	

CANGLIOSIDER

N,N'-di-lysogangliosider

32

Hydroksider av tetra-
alkylammonium, KOH,
andre reagenser

2	4	
		7
5		
Acylering		Acylering
(a)	acylering på sfingosin- nitrogenet med beskyttende grupper	
(b)	acetylering på neuramin- nitrogenet	
(c)	avbeskyttelse av sfingosin- nitrogenet	

6	acylering	N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider
---	-----------	--------------------------------------

174775

N-monoacyl-N,N'-di-lysogangliosidene kan imidlertid også oppnås ved deacylering av N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider på neuraminnitrogenet ved selektiv kjemisk hydrolyse, f.eks. med 0,1 molar alkoholisk kaliumhydroksyd.

I de oppnådde acyl-di-lysogangliosider er det mulig, hvis ønsket, å konvertere funksjonelt karboksygruppene på sialinsyrene eller hydroksylene av slike syrer. For eksempel kan disse gruppene konverteres til estere eller amider, eller hydroksylene i disse gruppene kan forestres med syrer (peracylater).

Fremgangsmåte til fremstilling av N-acyl-N,N'-di-lysogangliosider, N'-acyl-N,N'-di-lysogangliosider og N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider i henhold til den foreliggende oppfinnelse omfatter acylering av N,N'-di-lysogangliosider, N-acyl-N,N'-di-lysogangliosider eller N'-acyl-N,N'-di-lysogangliosider med syrer som svarer til de ovenfor angitte acylgrupper, eller deacylering av passende N,N'-diacyl-N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider selektivt på sfingosinnitrogenet eller på neuraminnitrogenet, eller blandinger av disse forbindelser. Hvis ønsket kan de oppnådde forbindelser konverteres til estere, amider eller indre estere eller til hydroksyperacylater. Slike forbindelser kan også konverteres til passende salter.

N-acyleringen i henhold til ovenfor angitt fremgangsmåte kan foretas på konvensjonell måte, f.eks. ved å omsette utgangsproduktene med et acylerende middel, og fremfor alt med et funksjonelt derivat av syren, hvis rest skal innføres. Således er det mulig å benytte som funksjonelt derivat av syren et halogenid eller et anhydrid, og acylering utføres deretter fortrinnsvis i nærvær av en tertiær base, såsom pyridin eller kollidin. Det er mulig å arbeide under vannfri forhold, ved værelsestemperatur eller høyere temperatur, eller også, med fordel, i henhold til Schotten-Baumanns fremgangsmåte under vandige betingelser i nærvær av en uorganisk base. I noen tilfelle er det også mulig å benytte estere av syrer som

reaktive funksjonelle derivater. Til å acylere er det mulig å benytte fremgangsmåter med aktiverte karboksyderivater, såsom de benyttet i peptidkjemien, f.eks. fremgangsmåte med blandede anhydrider eller derivater oppnådd med derivater av karbodiimider eller salter av isosaxolium.

Blant de forskjellige fremstillingsfremgangsmåtene, er den følgende mest hensiktsmessig:

1. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med azid av syren;
2. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med en acylimidazol av syren, som oppnås fra syren med N,N'-karbonyldimidazol;
3. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med et blandet anhydrid av syren og trifluoreddiksyre;
4. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med syrekloridet;
5. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med syren i nærvær av et karbodiimid (såsom di-cykloheksylkarbodiimid) og valgfritt med et stoff, såsom 1-hydrokxy-benzotriazol;
6. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med syren ved oppvarming;
7. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med en metylester av syren ved høy temperatur;
8. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med en fenolester av syren, såsom en ester med para-nitrofenol; og
9. Reaksjon av lysogangliosidderivatet med en ester avledet fra utvekslingen mellom et salt av syren og 1-metyl-2-klorpyridiniodid.

Det er allerede blitt beskrevet hvordan det er mulig å oppnå selektiv, delvis acylering både på sfingosinnitrogenet og på neuraminnitrogenet. Skjema 1 illustrerer fremgangsmåtene.

Enzymatisk deacylering av N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider på sfingosinnitrogenet, som rapportert tidligere, kan utføres under betingelser benyttet for delvis deacylering av gangliosider, f.eks. som beskrevet i J. Biochem., 103, 1 (1988). Den dobbelte deacylering av N,N'-diacyl-N,N'-di-lysogangliosider til N,N'-di-lysogangliosider kan utføres på samme måte som for fremstilling av de-N-acetyl-lysogangliosider som beskrevet

f.eks. i 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. Comn. 147, 127 (1987).

Den ovenfor angitte publikasjon i Carbohydr. Research 179 beskriver også en fremgangsmåte for selektiv deacylering på neuraminnitrogenet som er mulig ved virkning av 0,1M KOH i 90% n-butanol på gangliosidet GM₃. Denne deacylering kan anvendes på N,N'-diacyl-N,N'-dilysoangliosider i den foreliggende oppfinnelse for å oppnå N-acyl-N,N'-di-lysoangliosider. Fremstillingsfremgangsmåter som er innenfor den foreliggende oppfinnelses rekkevidde inkluderer enhver tilsvarende kjemisk fremgangsmåte som er sannsynlig for fagfolk.

Fremstilling av karboksy- eller hydroksyderivater av de nye lysogangliosider, oppnådd i henhold til den ovenfor angitte fremgangsmåte, kan utføres ved kjente fremgangsmåter, unntagen de metoder som vil forandre den grunnleggende gangliosidstrukturen. Dette vil ekskludere fremgangsmåter som anvender sterkt sure midler, eller de som må utføres under drastisk alkaliske eller sure betingelser, eller også de fremgangsmåter som vil føre til en uønsket alkylering av hydroksygruppene i sakkarid-delen.

Forestring av karboksygruppene i N-acylgangliosidene eller deres omdannelse til amider kan utføres, f.eks., som beskrevet i US patent 4 713 374 for gangliosider. Dannelsen av indre estere av derivatene i henhold til oppfinnelsen kan utføres på samme måten som fremstilling av indre estere av gangliosider, som f.eks. beskrevet i US-PS 4 793 091 og i EP-PS 0072 722.

Disse indre estere omfatter ikke bare forbindelsene dannet ved laktonisering av sialinkarboksygrupper med sakkaridhydroksyler, men også de som f.eks. inneholder laktonringer dannet mellom sialinkarboksylene og sialinhydroksylene, siden de siste i sin tur er bundet til sakkariddelen, og også andre mulige laktonstrukturer. Fremgangsmåten ved de ovenfor angitte patenter

til dannelse av indre estere omfatter behandling av et gangliosid i et ikke-vandig organisk oppløsningsmiddel under vannfrie betingelser med et laktoniserende middel. Egnede organiske oppløsningsmidler omfatter dimetylsulfoksid, dimetylformamid, sulfolan, tetrahydrofuran, dimetoksyetan, pyridin eller blanding av disse oppløsningsmidler. Passende reagenser for laktonisering omfatter karbodiimider som er oppløselig i organiske oppløsningsmidler, såsom dicykloheksylkarbodiimid, benzylisopropylkarbodiimid, benzyletylkarbodiimid, salter av 2-klormetylpyridin, etoksyacetylen og Woodward's reagens (N-etyl-5-fenyl-isoksazolium-3'-sulfonat). Eldre fremgangsmåter utnytter omsetningen mellom et gangliosid og eddiksyre eller trikloreddiksyre eller et karbodiimid, oppløselig i vann eller i et vandig medium. Alle disse fremgangsmåter kan også benyttes til å fremstille indre estere av de nye N-acyl-lysogangliosider. For "ytre" forestring av karboksygrupper, dvs. forestring med alkoholer i den ovenfor angitte rekke, er det mulig f.eks. å omsette N-acyl-lysogangliosider med den ønskede alkohol, i nærvær av en ionebytter, f.eks. en Dowex 50-type harpiks, hvor utbyttet er begrenset av den samtidige dannelse av indre estere, og at reaksjonstiden er ganske lang. En annen fremgangsmåte for forestring omfatter å la alkohol passere en harpiks, av Dowex-50Wx8 (100-200 mesh, form H) type, og å behandle det oppløste eluatet i den samme alkohol med det tilsvarende diazoalkan.

En annen egnet forestringsfremgangsmåte omfatter å behandle et metallsalt av lysogangliosidderivatene med et eteriserende middel. Alkaliske- og alkaliske jordmetallsalter kan benyttes i tillegg til hvilket som helst annet metallsalt. Som eteriserende midler er det mulig å benytte de som er rapportert i litteraturen, såsom spesielt estere fra forskjellige uorganiske syrer, eller fra organiske sulfonsyrer, såsom hydrasider, dvs. med andre ord, hydrokarbylhalogenider, såsom metyl- eller etyliodid, etc., eller de nøytrale sulfater eller hydrokarbylsyrer, sulfitter, karbonater, silikater, fosfitter eller hydrokarbylsulfonater, f.eks. metylbenzo- eller p-toluolsulfonat. Reaksjonen kan utføres i et egnet oppløsningsmiddel,

f.eks. en alkohol, fortrinnsvis den som tilsvarer alkylgruppen som skal innføres, men også i ikke-polare oppløsningsmidler såsom ketoner eller etere, såsom dioksan eller dimetylsulfoksid.

En spesielt fordelaktig fremgangsmåte til forestring omfatter å behandle en indre ester av lysogangliosidderivatet med en blanding av den ønskede alkohol og dens tilsvarende alkoholat. Reaksjonen kan utføres ved en temperatur som tilsvarer kokepunktet til alkoholen, men det er også mulig å benytte lavere temperaturer, idet reaksjonstiden i dette tilfelle blir lenger.

Amidene av lysogangliosidderivatene i den foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved kjente fremgangsmåter, og spesielt som følger:

- (a) Reaksjon av de indre estere av N-acyl-lysogangliosidderivatene med ammoniakk eller med aminer;
- (b) Reaksjon av karboksyestere av N-acyl-lysogangliosidderivatene med ammoniakk eller med aminer; og
- (c) Reaksjon av N-acyl-gangliosidderivatene med karboksygrupper aktivert med ammoniakk eller med aminene.

Reaksjon (a) kan utføres ved direkte behandling, med eller uten oppløsningsmiddel, av den indre gangliosidester med ammoniakk eller med aminet av hvilke amidet skal fremstilles. Reaksjonen kan også utføres ved ganske lave temperaturer, såsom -5° til $+10^{\circ}$, men fortrinnsvis ved værelsestemperatur eller høyere, f.eks. mellom 30°C og 120°C . Som oppløsningsmidler er det mulig å benytte ketoner, aromatiske hydrokarbider, dimetylformamid, dimetylsulfoksid, dioksan eller tetrahydrofuran. Reaksjon (b) utføres fortrinnsvis under de betingelser beskrevet vedrørende reaksjon (a). Ved siden av estrene beskrevet i den foreliggende oppfinnelse, er det også mulig å benytte andre estere, f.eks. estere med fenoler.

For å aktivere karboksygruppen i reaksjonen ifølge (c), kan fremgangsmåter kjent i peptidkjemien anvendes, idet man unngår

de fremgangsmåter som omfatter betingelser som er altfor sure eller basiske, og som derved kunne føre til desintegrasjon av ganliosidmolekylet. Hvis utgangsgangliosidene er i form av, f.eks. natriumsalter, er det tilrådelig først å behandle saltet med en ionebytteharpiks, Dowes-type, eller en annen sur ionebytter. Det er mulig å benytte fremgangsmåten med kondensasjon i nærvær av karbodiimider, f.eks. dicykloheksylkarbodiimid, benzylisopropylkarbodiimid eller benzyletylkarbodiimid, i nærvær av 1-hydroksybenzotriazol eller kondensasjon i nærvær av N,N'-karbonyldiimidazol.

Acylering av hydroksygruppene i sakkariidet, sialindelen og valgfritt av ceramidresten kan også utføres på kjent måte, f.eks. ved acylering med et halogenid eller et anhydrid av syren som skal benyttes til acylering, fortrinnsvis i nærvær av en tertiær base, såsom pyridin eller kollidin. Som resultat er de ovenfor angitte peracylerte derivater oppnådd. Det er også mulig i henhold til definisjonen av fremgangsmåten i den foreliggende oppfinnelse, å eksponere et de-N-acetyl-lyso-gangliosid for acylering og gjenvinne acetylaminogruppen i neuraminsyren etter acylering. Slik acylering kan også utføres på kjent måte. I dette tilfelle er relativt moderate metoder valgt for N-acylering, med hvilke hydroksygruppene i neuraminsyren forblir uforandret. Acylering av denne gruppe som skal utføres etter acyleringsreaksjonen på sfingosinnitrogenet, kan gjøres ved drastiske fremgangsmåter, f.eks. ved å benytte eddiksyreanhydrid.

Endelig, som angitt ovenfor, i alle forbindelsene som er oppnådd ved ovenfor angitte fremgangsmåte og som har saltdannende grupper, er det mulig å danne salt med slike grupper på kjent måte for å oppnå egnede saltderivater.

Oppfinnelsen omfatter også modifikasjoner av fremstillingsfremgangsmåten til de nye derivater, i hvilke en fremgangsmåte avbrytes på hvilket som helst trinn eller settes igang med en intermediær forbindelse og de gjenstående trinn utføres, eller i hvilken utgangsproduktene dannes in situ.

Farmasøytiske preparater kan tilvirkes som inneholder en eller flere av acyllysogangliosidderivater som aktive stoffer. Disse farmasøytiske preparater kan være preparater for oral-, rektal-, parenteral-, lokal- eller transdermal anvendelse. De er derfor i fast- eller halvfast form, f.eks. piller, tabletter, gelatinkapsler, kapsler, suppositorier (stikkpiller) og bløte gelatinkapsler. Ved parenteral anvendelse er det mulig å benytte former konstruert for intramuskulær-, subkutan eller transdermal administrering, eller som er egnet til infusjoner eller intravenøse injeksjoner. Disse preparatene kan derfor være i form av oppløsninger av de aktive forbindelser eller som frysetørret pulver av de aktive forbindelser som skal blandes med en eller flere farmasøytisk akseptable eksipienter eller diluenter, egnet til de ovenfor angitte anvendelser, og med en osmolaritet som er kompatibel med fysiologiske fluider. For lokal anvendelse kan det benyttes preparater i form av dusjer (spray), f.eks. nesedusjer, kremer eller salver for topisk anvendelse eller passende fremstilte plastre for transdermal anvendelse.

Preparatene kan administreres til mennesker eller dyr. De inneholder fortrinnsvis fra 0,01 vektprosent til 10 vektprosent av den aktive forbindelse for oppløsninger, dusjer, salver og kremer, og fra 1 vektprosent til 100 vektprosent, og fortrinnsvis fra 5 vektprosent til 50 vektprosent av aktiv forbindelse, for preparater i fast form. Den administrerte dose avhenger av individuelle indikasjoner, den ønskede virkning og den valgte administrasjonsvei.

Terapeutisk anvendelse av både de nye acyl-lysogangliosider og de som allerede er kjent og ført opp tidligere er mulig. Den terapeutiske anvendelse omfatter alle de tidligere angitte indikasjoner. Daglige doser til mennesker ved injeksjon (subkutan eller intramuskulær) eller transdermal- eller oral administrering varierer mellom 0,05 mg og 5 mg aktivt stoff pr. kg kroppsvekt.

De følgende eksempler belyser fremstillingen av acyl-lysogangliosidene, de farmasøytiske preparater som inneholder forbindelsene som aktive ingredienser, og deres terapeutiske anvendelser. Disse eksempler er bare illustrerende og skal ikke betraktes som begrensende for den foreliggende oppfinnelse.

EKSEMPEL 1

N,N'-di-lyso-GM₁

10 g av GM₁ oppløses i 200 ml 3N KOH og hydrolyse utføres i 72 timer ved 90°C. Oppløsningen avkjøles deretter og bringes til pH-verdi 6,5 med saltsyre. Den hensettes i 18 h ved 4°C og deretter filtreres de utfelte fettsyrene av. Den resulterende oppløsning dialyseres mot vann og konsentreres til 500 ml, og felles ut i 5 l aceton.

Produktet tørkes og silikagelkromatografi med høy ytelsesevne utføres ved å benytte en blanding av kloroform/metanol/5N NH₃ (55:45:10) som eluerende middel. Fraksjonene som inneholder produktet tørkes og gjenoppløses deretter i vann. Oppløsningen bringes til pH-verdi 10 med 0,01 N NaOH og dialyseres, konsentreres til 100 mg/ml og felles ut i 5 volumdeler aceton. Utbyttet av N,N'-di-lyso-GM₁ er 5,7 g (70% av det teoretiske). Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/5N NH₃ (55:45:10) viser at produktet er en enhetlig forbindelse, med R_f=0,05 (GM₁=0,35).

EKSEMPEL 2

N-lyso-GM₁

10 g (6,37 mM) GM₁ oppløses i 200 ml 3N KOH og hydrolyse utføres i 72 h ved 90°C. Oppløsningen avkjøles deretter og bringes til pH-verdi 6,5 med saltsyre. Den hensettes i 18 h ved 4°C og deretter filtreres de utfelte fettsyrene av. Den dialyseres mot vann og konsentreres til 500 ml og utfelles i 5 liter aceton. Produktet som inneholder N'-lyso-GM₁ og N,N'-di-lyso-GM₁ (20%) vakuumtørkes og gjenoppløses deretter i 100 ml dimetylformamid. 2,15 g (6,37 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-

N-hydroksysuccinimid, oppløst i 20 ml tetrahydrofuran, tilsettes deretter sakte og etterlates i 1 h ved værelses-temperatur for videre omsetning. Deretter tilsettes 3 ml (31,85 mM) eddikksyreanhydrid og 0,9 ml (63,7 mM) trietylamin. Etter 30 min tilsettes 12,5 ml piperidin for å fjerne den beskyttende gruppe. Reaksjonsblandingen hensettes i 18 h ved værelses-temperatur, utfelles i 2 liter aceton og tørkes. Materialet oppnådd på denne måte oppløses i 1M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 h. Det dialyseres, konsentreres til 100 mg/ml og utfelles i 5 volumer aceton. Produktet ledes gjennom en S-Sepharosekolonne (H⁺-form) ekvilibrert i metanol. Det vaskes med metanol og N-lyso-GM₁ ved eluering med 10 mM NH₄Cl i metanol. Fraksjonene som inneholder produktet tørkes og gjenoppløses deretter i vann. Oppløsningen bringes til pH-verdi 10 med 0,01N NaOH og dialyseres, konsentreres til 100 mg/ml og utfelles i 5 volumer aceton. Oppnådd produkt er tilnærmet 5 g (60 % av det teoretiske). Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/5N NH₃ (55:45:10) viser at produktet er enhetlig, med R_f = 0,11.

EKSEMPEL 3

N-cyklobutankarbonyl-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 1 ml dimetylformamid og 1,050 ml (7,6 mM) trietylamin og 728 µl (7,6 mM) cyklobutankarbonylklorid tilsettes ved værelsestemperatur.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved værelsestemperatur i løpet av 4 timer. Ved slutten av omsetningen utfelles oppløsningen i 10 ml etylacetat mettet med vann, filtreres og vakuuntørkes. Produktet renses ved silikagelkromatografi ved å anvende en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann og konsentreres deretter til 5 ml, og felles ut i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 350 mg (66 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,33$ ($\text{GM}_1 = 0,43$; lyso- $\text{GM}_1 = 0,24$).

EKSEMPEL 4

N-(2-norbornanacetyl)-N-lyso- GM_1

500 mg (0,38 mM) Lyso- GM_1 (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid og deretter tilsettes, ved 0°C , 106 μl (0,76 mM) trietylamin og norbornaneddikksyre-anhydrid, nylig fremstilt ved å omsette 1,1 ml (7,6 mM) 2-norbornaneddikksyre og 939 mg (9,12 mM) dicykloheksyl-karbodiimid oppløst i 20 ml tetrahydrofuran og deretter, 2 timer senere, filtrerer dicykloheksylurea som er dannet.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 0°C i 18 timer under omrøring. Ved slutten av reaksjonen konsentreres oppløsningen til 1 ml, utfelles i 10 ml aceton og vakuumtørkes.

Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi ved bruk av en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjonene slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres deretter til 5 ml og felles ut i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 508 mg (92 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,33$ ($\text{GM}_1 = 0,43$; lyso- $\text{GM}_1 = 0,24$).

EKSEMPEL 5

N-fenylacetyl-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det ved værelsestemperatur tilsettes 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 260 mg (1,9 mM) fenyleddikksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridinio-did oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen hensettes for omsetting i 18 h ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton. Den filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi under bruk av en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres deretter til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 354 mg (65 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,37 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 6

N-(2,6-dimetoksybenzoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 1 ml dimetylformamid og deretter tilsettes, ved værelsestemperatur, 1,056 ml (7,6 mM) trietylamin, og dimetoksybenzoanhydrid, nylig fremstilt ved reaksjon mellom 2,76 g (15,2 mM) av 2,6-dimetoksybenzoesyre og 1,08 g (3,8 mM) av 1-metyl-2-fluorpyridin-p-toluensulfonat i 10 ml dimetylformamid/tetrahydrofuran (1:1).

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved værelsestemperatur i 4 timer under omrøring. Ved avslutning av reaksjonen konsentreres oppløsningen til 5 ml, utfelles i 50 ml aceton, filtreres og vakuamtørkes. Silikagelkromatografi utføres ved å benytte en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, fordampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann og konsentreres deretter til 5 ml, og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 506 mg (90 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11), viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,37 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med en fluorometisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 7

N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (3,8 mM) trietylamin, 210 mg (1,9 mM) 2-pyroslimsyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen hensettes for omsetting i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 10 ml aceton. Den filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann og konsentreres deretter til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 402 mg (75 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen

er enhetlig, med $R_f = 0,37$ ($GM_1 = 0,43$; lyso- $GM_1 = 0,24$) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 8

N-(4-imidazolacetyl)-N-lyso- GM_1

500 mg (0,38 mM) Lyso- GM_1 (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1056 μ l (7,6 mM) trietylamin, 310 mg (1,9 mM) 4-imidazoleddiksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-kloropyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Den henses for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjonene slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 352 mg (65 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% $CaCl_2$ (50:42:22) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,33$ ($GM_1 = 0,43$; lyso- $GM_1 = 0,24$).

EKSEMPEL 9

N-(1-metylpropyl)-N-lyso- GM_1

500 mg (0,38 mM) lyso- GM_1 (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 3,5 ml dimetylformamid/vann 2,5:1 hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1056 μ l (7,6 mM) trietylamin, 260 mg (1,9 mM) N-metyl-L-prolin og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-kloropyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Blandingen henses for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjonene slås sammen, inndampes,

behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 380 mg (70 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,33 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24).

EKSEMPEL 10

N-(1-metyl-2-pyrrolkarbonyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 220 mg (1,9 mM) 1-metyl-2-pyrrolkarboksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton. Reaksjonsblandingen filtreres og tørkes. Produktet renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjonene slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 487 mg (90 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,38 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 11

N-(1-tetrazolacetyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 250 mg (1,9 mM) 1-tetrazoleddiksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton. Den filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 472 mg (87 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,32 (GM₁ = 0,43; lyso-MG₁ = 0,24).

EKSEMPEL 12

N-(2-tiofenacetyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 270 mg (1,9 mM) 2-tiofeneddiksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles

med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 383 mg (70 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,34 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 13

N-(6-metylnikotinoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 260 mg (1,9 mM) 6-metylnikotinsyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles i 100 ml aceton. Den filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 218 mg (40 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,38 (GM₁ = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 14

N-(2-pyridylacetyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 3,5 ml dimetylformamid/vann 2,5:1, hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1056 µl (7,6 mM) trietylamin, 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddikksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 327 mg (60 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,35 (G_{m1} = 0,43; lyso-GM₁ = 0,24) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 15

N-(4-pyridyltioacetyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,38 mM) Lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (7,6 mM) trietylamin, 320 mg (1,9 mM) 4-pyridyltioeddikksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en

blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 390 mg (70 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11), viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,34$ ($\text{GM}_1 = 0,43$; Lyso- $\text{GM}_1 = 0,24$) og med en fluorimetrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 16

N-(3-kinolinkarbonyl)-N-lyso- GM_1

500 mg (0,38 mM) Lyso- GM_1 (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 μl (7,6 mM) trietylamin, 330 mg (1,9 mM) 3-kinolinkarboksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 358 mg (64 % av det teoretiske).

Silkagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at forbindelsen

er enhetlig, med $R_f = 0,35$ ($GM_1 = 0,43$; Lyso- $GM_1 = 0,24$) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 17

N-(7-teofyllinacetyl)-N-lyso- GM_1

500 mg (0,38 mM) Lyso- GM_1 (fremstilt i henhold til eksempel 2) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 μ l (7,6 mM) trietylamin, 460 mg (1,9 mM) 7-teofyllineddikksyre og 194,2 mg (0,76 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 397 mg (68 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% $CaCl_2$ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,35$ ($GM_1 = 0,43$; Lyso- $GM_1 = 0,24$) og med en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 18

N-(2,6-dimetoksybenzoyl)-di-lyso- GM_1

500 mg di-lyso- GM_1 (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning tilsettes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyl-oksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ.). Den henses for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles den i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som eluerende oppløsningsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt N-FMOC-di-lyso-GM₁ slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol 1:1, hvorefter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 0,40 ml (3,96 mM) metyltrifluoracetat. Det hensettes for reaksjon ved værelsestemperatur i 3 dager. Til den resulterende reaksjonsblanding settes deretter 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Den hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles i 100 ml aceton/vann 9:1, filtreres og tørkes. Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid/metanol 1:1 og til dette settes dimetoksybenzoanhydrid, nylig fremstilt ved omsetting av 1,88 g (7,6 mM) 2,6-di-metoksybenzoesyre og 5,40 mg (1,9 mM) fluormetylpyridinpara-toluensulfonat i 5 ml dimetylformamid/tetrahydrofuran 1:1. Denne blanding hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur, utfelles i 100 ml aceton, samles med 5 ml vann og bringes til pH-verdi 9,0 med 0,01 N NaOH. Den hensettes for reaksjon ved romtemperatur i 2 timer for å fjerne trifluoracetylgruppen. Den dialyseres, konsentreres til 3 ml og utfelles i 15 ml aceton.

Råproduktet som oppnås renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2 ml kloroform/metanol (1:1) og utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 283 mg (51 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,18. Den reagerer positivt på ninhydrinfarging og viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 19

N-2-pyridylacetyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til dette settes sakte 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyl-oksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ.). Blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur. Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silkagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som eluerende oppløsningsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt N-FMOC-di-lyso-GM₁ slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 0,40 ml (3,96 mM) metyltrifluoracetat, og dette omsettes ved romtemperatur i 3 dager. Til dette settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1056 µl (7,6 mM) trietylamin, 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyldeddiksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Dette hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur, utfelles i 50 ml aceton, oppløses med 5 ml vann og bringes til pH-verdi 9,0 med 0,01 N NaOH. Denne oppløsning hensettes for reaksjon ved værelsestemperatur i 2 timer for å fjerne trifluoracetylgruppen. Den dialyseres, konsentreres til 3 ml og utfelles i 15 ml aceton. Råproduktet som oppnås renses ved silkagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2 ml kloroform/metanol (1:1) og utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 296 mg (55 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,19. Den reagerer positivt på ninhydridfarging og viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 20

N,N'-di-cykloheptankarbonyl-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid, hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 0,33 ml (2,37 mM) trietylamin, 162 µl (1,18 mM) cykloheptankarboksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles deretter i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 407 mg (68 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,32.

EKSEMPEL 21

N,N'-di-cyklopentankarbonyl-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 0,33 ml (2,37 mM) trietylamin, 123 µl

(1,18 mM) cyklopentankarboksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridinioidid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelses-temperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton. Den filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, fordampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 277 mg (48 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,30$.

EKSEMPEL 22

N,N'-di-fenylacetyl-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 0,88 ml (6,34 mM) trietylamin, 430 mg (3,17 mM) fenyleddikksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridinioidid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelses-temperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 564 mg (95 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,32. Den viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 23

N,N'-di-(5-metoksy-1-indanon-3-acetyl)-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved romtemperatur, 0,88 ml (6,34 mM) trietylamin, 700 mg (3,17 mM) 5-metoksy-1-indanon-3-eddikksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelses-temperatur og utfelles i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na₂CO₃, dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 601 mg (91 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,33, og utviser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 24

N,N'-di-(2-pyridylacetyl)-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved romtemperatur, 0,88 ml (6,34 mM) trietylamin, 550 mg

(3,17 mM) 2-pyridyleddikksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 268 mg (43 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med $R_f = 0,23$. Den viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 25

N,N'-di-(5-metyl-2-tiofenkarbonyl-di-lyso-GM₁)

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 0,88 ml (6,34 mM) trietylamin, 450 mg (3,17 mM) 5-metyl-2-tiofenkarboksyre og 0,2 g (0,79 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel. De rensede fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 509 mg (85 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (60:35:8) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,33. Den viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 26

N-acetyl-N'-2-pyridylacetyl-di-lyso-GM₁

500 mg (0,39 mM) di-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (Fmoc-succ.) og den etterlates for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som eluerende oppløsningsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-Fmoc-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvoretter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1056 µl (7,6 mM) trietylamin, 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddikksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Blandingen omsettes i 18 timer ved værelsestemperatur. Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne flyorenylgruppen. Den etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 30 ml kloroform/metanol/vann (1:1:0,1) hvoretter det tilsettes 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 373 µl (3,96 mM) eddiksyreanhydrid. Oppløsningen etterlates for reaksjon i 2 timer ved værelsestemperatur, tørkes, behandles med 5 ml 1M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 time. Oppløsningen dialyseres, konsentreres til 5 ml og utfelles i 5 volumdeler aceton. Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloro-

form/metanol/vann (60:35:8) som oppløsningsmiddel. De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 299 mg (54 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,37. Det viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 27

N-acetyl-N'-3,4,5-trimetoksybenzoyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksy-karbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ). Oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsetemperatur. Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-FMOC-di-lysoGM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol 1:1 og til denne oppløsning settes trimetoksybenzosyreanhydrid oppløst i 20 ml tetrahydrofuran, nylig fremstilt ved å omsette 0,3 g (1,9 mM) dicykloheksylkarbodiimid med 0,3 g (1,4 mM) trimetoksybenzosyre i 20 ml tetrahydrofuran og 2 timer senere avfiltres dicykloheksylurea som er dannet.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring.

Til denne reaksjonsblanding tilsettes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen etterlates for reaksjon i 18 timer ved værelsetemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann 9:1, filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 30 ml kloroform/metanol/vann (1:1:0,1) hvorefter det tilsettes 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 373 μ l (3,96 mM) eddiksyreanhydrid. Blandingen hensettes for reaksjon i 2 timer ved værelsetemperatur, tørkes, behandles med 5 ml 1 M Na_2CO_3 og holdes ved 60°C i 1 time, dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann 60:35:8 som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 286 mg (49 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig med $R_f = 0,39$. Forbindelsen viser en fluoremetrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 28

N-dikloracetyl-N'-2-pyridylacetyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksy-karbonyl-N-hydroksysuccinimid (Fmoc-succ). Oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsetemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi ved en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-Fmoc-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved værelsetemperatur,

1056 µl (7,6 mM) trietylamin, 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddiksyrehydroklorid og 194,2 g (0,76 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Reaksjonen skjer ved romtemperatur i 18 timer.

Til denne reaksjonsblanding settes deretter 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 30 ml kloroform/metanol/vann (1:1:0,1) hvorefter det tilsettes 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 950 mg (3,96 mM) dikloreddiksyreanhydrid. Blandingen hensettes for reaksjon i 2 timer ved værelsestemperatur, tørkes, behandles med 5 ml 1 M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 time. Den dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton.

Reaksjonsproduktet renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 267 mg (46 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,40. Produktet viser en fluoremetrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 29

N-dikloracetyl-N'-3,4,5-trimetoksybenzoyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning

settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksy-karbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ) og oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsetemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utsettes den resulterende blanding for utfelling i 100 ml aceton. Produktet renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel.

Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-FMOC-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) og til dette settes trimetoksybenzosyreanhydrid i 10 ml tetrahydrofuran og 2 timer senere avfiltreres det dannede dicykloheksylurea.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring.

Til blandingen settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen og den hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsetemperatur, produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes. Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 30 ml kloroform/metanol/vann (1:1:0,1) hvorefter det tilsettes 1,1 ml (7,92 mM) trimetylamin og 950 mg (3,96 mM) dikloreddiksyreanhydrid. Oppløsningen hensettes for reaksjon i 2 timer ved værelsetemperatur, tørkes, behandles med 5 ml 1 M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 time. Blandingens dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8).

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 293 mg (48 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,41 og at den har en fluorimetrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 30

N-2-furoyl-N'-butyryl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyl-oksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (Fmoc-succ). Oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-Fmoc-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 626 mg (3,96 mM) smørsyreanhydrid. Blandingen hensettes for reaksjon i 2 timer ved værelsestemperatur. Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen, og blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid hvorefter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 528 µl (3,8 mM) trietylamin, 210 mg (1,9 mM) 2-pyroslimsyre og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Oppløsningen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med

en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 289 mg (52 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,39. Det viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 31

N-2.6-dimetoksybenzoyl-N'-butyryl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid, og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksy-karbonyl-N-hydroksysuccinimid (Fmoc-succ). Blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-Fmoc-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvoretter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 626 mg (3,96 mM) smørsyreanhydrid og reaksjonen foregår i 2 timer ved værelsestemperatur.

Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 1 ml dimetylformamid hvoretter det tilsettes, ved værelsestemperatur, 1,056 ml (7,6 mM) trietylamin og 2,6-dimetoksybenzoesyreanhydrid, nylig fremstilt ved å omsette 2,76 g (15,2 mM) 2,6-dimetoksybenzoesyre med 1,08 g (3,8 mM) fluormetylpyridin-para-toluensulfonat i 10 ml dimetylformamid/tetrahydrofuran (1:1). Kondensasjonsreaksjonen utføres ved værelsestemperatur i 4 timer under omrøring. Ved avslutning av reaksjonen konsentreres oppløsningen til 5 ml, produktet utfelles i 50 ml aceton, filtreres og vakuumtørkes.

Silikagelkromatografi utføres ved å benytte en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, behandles med 1 N Na_2CO_3 , dialyseres mot destillert vann, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 297 mg (51 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig med $R_f = 0,37$. Den viser en fluorometrisk avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 32

N-2-pyridylacetyl-N'-lauroyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml diformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksy-karbonyl-N--hydroksysuccinimid (Fmoc-succ). Blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det

intermediære reaksjonsprodukt (N-FMOC-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 1,51 g (3,96 mM) laurinsyreanhydrid og reaksjonen foregår i 18 timer ved romtemperatur.

Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved romtemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml trimetylformamid/metanol (1:1) hvorefter det tilsettes, ved romtemperatur, 1056 µl (7,6 mM) trietylamin 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddiksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridinioidid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Reaksjonen foregår over 18 timer ved værelsestemperatur og produktet presipiteres i 100 ml aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8).

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 262 mg (43 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,61. Det utviser en fluorometrisk avledning på 254 nm.

EKSEMPEL 33

N-3,4,5-trimetoksybenzoyl-N'-lauroyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til dette settes langsomt

145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ). Oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved romtemperatur. Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-FMOC-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes, gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) hvoretter det tilsettes, ved 0°C, 1,1 ml (7,92 mM) trietylamin og 1,51 g (3,96 mM) laurinsyreanhydrid. Reaksjonen foregår i 18 timer ved værelsestemperatur.

Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) og til denne oppløsning settes trimetoksybenzoesyreanhydrid oppløst i 10 ml tetrahydrofuran, nylig fremstilt ved omsetning av 0,3 g (1,9 mM) dicykloheksylkarbodiimid med 0,3 g (1,4 mM) trimetoksybenzoesyre i 10 ml tetrahydrofuran og 2 timer senere avfiltreres det dannede dicykloheksylurea.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring og produktet utfelles i 100 ml aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel. De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 294 mg (46 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at produktet er en enhetlig forbindelse, med R_f = 0,63. Dens fluorometriske avlesning er på 254 nm.

EKSEMPEL 34

N-3,4,5-trimetoksybenzoyl-N'-2-pyridylacetyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid. Til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (Fmoc-succ) og oppløsningen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en oppløsning av kloroform/metanol/-vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-Fmoc-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) og til denne oppløsning settes, ved værelsestemperatur, 1056 µl (7,6 mM) trietylamin og 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddkksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridinioidid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Blandingen hensettes for reaksjon ved romtemperatur i 18 timer.

Til denne reaksjonsblanding settes 1 ml piperidin for å fjerne fluorenylgruppen. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved romtemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1), og til denne oppløsning settes trimetoksybenzoesyreanhydrid oppløst i 10 ml tetrahydrofuran, nylig fremstilt ved omsetning av 0,3 g (1,9 mM) dicyklokarbodiimid med 0,3 g (1,4 mM) trimetoksybenzoesyre i 10 ml tetrahydrofuran, og etter 2 timer avfiltreres cykloheksylurea som er dannet.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring og deretter utfelles produktet i 100 ml aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,5 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 243 mg (43 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at produktet er en enhetlig forbindelse, med R_f = 0,59. Dets fluorimetriske avlesning er på 254 nm.

EKSEMPEL 35

N-2-pyridylacetyl-N'-2,6-dimetoksybenzoyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml metylformamid, og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid (FMOC-succ). Blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen utfelles produktet i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det intermediære reaksjonsprodukt (N-FMOC-di-lyso-GM₁) slås sammen, tørkes og gjenoppløses deretter i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) og til denne oppløsning settes dimetoksybenzoylsyreanhydrid, nylig fremstilt ved omsetning av 1,88 g (1,6 mM) 2,6-dimetoksybenzoylsyre med 540 mg (1,9 mM) fluormetylpyridin-paratoluensulfonat i 5 ml dimetylformamid/tetrahydrofuran (1:1),

som deretter hensettes for reaksjon ved værelsestemperatur i 4 timer.

1 ml piperidin tilsettes deretter for å fjerne fluorenylgruppene. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 100 ml aceton/vann (9:1), filtreres og tørkes.

Det intermediære reaksjonsprodukt oppløses i 2,5 ml dimetylformamid/metanol (1:1) og til denne oppløsning settes, ved værelsestemperatur, 1056 μ l (7,6 mM) trimetylammin, 330 mg (1,9 mM) 2-pyridyleddiksyrehydroklorid og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridinioidid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid. Reaksjonen foregår ved værelsestemperatur i 18 timer og deretter utfelles produktet i 100 ml aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:35:8) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,0 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 10 ml aceton.

Oppnådd produkt: 247 mg (41 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl_2 (50:42:11) viser at produktet er en enhetlig forbindelse, med $R_f = 0,58$, med en avlesning på 254 nm.

EKSEMPEL 36

N'-3,4,5-trimetoksybenzoyl-N'-lyso-GM₁

500 mg (0,33 mM) N'-lyso-GM₁ oppløses i 50 ml kloroform/metanol (1:1) og til denne oppløsning settes 0,28 g (0,7 mM) trimetoksybenzoesyreanhydrid oppløst i 20 ml tetrahydrofuran, nylig fremstilt ved at 0,3 g (1,9 mM) dicykloheksylkarbodiimid

omsettes med 0,3 g (1,4 mM) trimetoksybenzoesyre i 20 ml tetrahydrofuran og etter 2 timer avfiltreres det dannede dicykloheksylurea.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring.

Ved avslutning av reaksjonen tørkes produktet, samles med 5 ml kloroform/metanol (1:1) og utfelles i 100 ml aceton. Råproduktet som oppnås på denne måte renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:15:2) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 5 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles med 100 ml aceton.

Oppnådd produkt: 320 mg (56,7% av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (60:35:8) viser at produktet er en fluoriserende enhetlig forbindelse, med R_f = 0,50.

EKSEMPEL 37

N'-2-furoyl-di-lyso-GM₁

500 mg di-lyso-GM₁ (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid, og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyoksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid oppløst i 2 ml tetrahydrofuran. Blandingen henses for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur.

Ved avslutning av reaksjonen tilsettes 528 µl (3,8 mM) trietylamin, 210 mg (1,9 mM) 2-pyroslimsyre og 194,2 mg (0,76 mM) klormetylpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid, ved værelsestemperatur. Denne blanding henses deretter for reaksjon i 18 timer ved romtemperatur hvorefter 2 ml piperidin tilsettes for å fjerne den beskyttende gruppe.

Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved romtemperatur og produktet utfelles deretter i 100 ml aceton, filtreres og tørkes. Produktet som er oppnådd oppløses i 10 ml 1 M Na_2CO_3 og holdes ved 60°C i 1 time. Oppløsningen dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton.

Det rå reaksjonsprodukt renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/ $2,5\text{N NH}_3$ (60:35:8) som elueringsmiddel.

Fraksjonene som inneholder det rene produkt tørkes og gjenoppløses deretter i 5 ml vann. Oppløsningen bringes til pH verdi 10 med $0,01\text{N NaOH}$ og dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 301 mg (57 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/ $0,3\% \text{CaCl}_2$ (50:42:11) viser at produktet er enhetlig med $R_f = 0,31$, og reagerer positivt på ninhydrinfarging. Dets fluorometriske avlesning er på 254 nm.

EKSEMPEL 38

N' -3.4.5-trimetoksybenzoyl-di-lyso- GM_1

500 mg di-lyso- GM_1 (0,39 mM) (fremstilt i henhold til eksempel 1) oppløses i 5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes langsomt 145 mg (0,43 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid oppløst i 2 ml tetrahydrofuran, og blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelses-temperatur.

Ved avslutning av reaksjonen tilsettes trimetoksybenzoesyreanhydrid oppløst i 20 ml tetrahydrofuran, nylig fremstilt ved at 0,3 g (1,9 mM) dicykloheksylkarbodiimid omsettes med 0,3 g (1,4 mM) trimetoksybenzoesyre i 20 ml tetrahydrofuran, hvorefter den dannede dicykloheksylurea filtreres av 2 timer senere.

Kondensasjonsreaksjonen utføres ved 25°C i 18 timer under omrøring. 2 ml piperidin tilsettes deretter for å fjerne den beskyttende gruppe og blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur, og produktet utfelles i 100 ml aceton. Det filtreres og tørkes. Produktet som oppnås på denne måte oppløses i 10 ml 1 M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 time. Det dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton. Det rå reaksjonsprodukt renses ved silica-gelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/2,5N NH₃ 60:35:8 som elueringsmiddel. Fraksjonene som inneholder det rene produkt tørkes og gjenoppløses deretter i 5 ml vann. Oppløsningen bringes til pH-verdi 10 med 0,01N NaOH og dialyseres, konsentreres til 5 ml og produktet utfelles i 50 ml aceton.

Oppnådd produkt: 317 mg (56% av det teoretiske).

Silicagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at produktet er enhetlig med R_f = 0,35, med positiv reaksjon på ninhydrinfarging. Dets fluorometriske avlesning er på 254 nm.

EKSEMPEL 39

Fremstilling av en gangliosidblanding (GA blanding) ved ekstraksjon fra bovint hjernevev

Bovin hjernebark fjernes fra dyret og homogeniseres i fosfatbuffer ved pH-verdi 6,8; til dette settes 6 volumdeler tetrahydrofuran og den resulterende blanding sentrifugeres. Supernatanten ekstraheres to ganger med tetrahydrofuran. Etter sentrifugering fjernes de ikke-polare materialene ved fordeling med etyleter og den vandige tetrahydrofuran-fase innføres i ionebyttersøylen ekvilibrert med 50% etanol. Til produktet fra søylen settes bariumhydroksyd og 4 volumdeler iset etanol. Etter 18 timers avkjøling oppsamles et bunnfall som oppløses i vann og syrnes lett med saltsyre. Den således oppnådde oppløsning dialyseres og frysetørkes. Utbyttet på dette trinn

er tilnærmet 0,6 mg rå gangliosid-blanding pr. g nervøst vev. Det frysetørrede pulver dispergeres i 20 volumdeler kloroform/-metanol (2:1) og etter at den oppnådde oppløsning er filtrert til fullstendig klarhet fordeles den ved tilsetning av 0,2 volumdeler av en oppløsning av kaliumklorid i vann til 0,88%.

Det øvre lag adskilles, dialyseres og frysetørkes. Det endelige utbyttet er tilnærmet 0,3 mg rensset blanding av gangliosidsalter pr. g hjernevev. Den oppnådde gangliosidblanding kan fraksjoneres i forskjellige porsjoner som representerer betydelig rene gangliosider (i den betydning som allerede er angitt ovenfor) ved å benytte søyler av kiselsyre og eluere med blandinger av metanol-kloroform. Således oppnås en gjennomsnittelig sammensetning på tilnærmet 40 % av gangliosid GD_{1a}, 21 % av gangliosid GM₁, 19 % av gangliosid GT_{1b} og 16 % av gangliosid GD_{1b}.

EKSEMPEL 40

2-furoyl-derivater av en blanding av N-lysogangliosider

1) Fremstilling av N-lysogangliosider

10 g av gangliosidblandingen (oppnådd i henhold til eksempel 39) oppløses i 200 ml 3N KOH og hydrolyseres i 72 timer ved 90°C. Oppløsningen avkjøles deretter og bringes til pH-verdi 6,5 med saltsyre. Den hensettes i 18 timer ved 4°C og deretter avfiltreres de utfelte fettsyrer. Oppløsningen dialyseres mot vann og konsentreres til 500 ml og produktet utfelles i 5 liter aceton.

Produktet som inneholder N'-lysogangliosider og N,N'-di-lysogangliosider (< 20 %) vakuuttørkes og gjenoppløses deretter i 100 ml dimetylformamid. Til denne oppløsning settes langsomt 2,15 g (6,37 mM) 9-fluorenylmetyloksykarbonyl-N-hydroksysuccinimid oppløst i 20 ml tetrahydrofuran og blandingen hensettes for reaksjon i 1 time ved værelsestemperatur. Endelig tilsettes 3 ml (31,85 mM) eddiksyreanhydrid og 0,9 ml (63,7 mM) trietylamin. Etter 30 min tilsettes 12,5 ml piperidin for å fjerne den

beskyttende gruppe. Blandingen hensettes for reaksjon i 18 timer ved værelsestemperatur og produktet utfelles i 2 liter aceton og tørkes. Materialet som oppnås oppløses i 1 M Na₂CO₃ og holdes ved 60°C i 1 time. Oppløsningen dialyseres, konsentreres til 100 mg/ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton. Produktet føres gjennom en S-Sepharosekolonne (H⁺ form) ekvilibrert i metanol. Det vaskes med metanol slik at N-lysogangliosider oppnås ved eluering med 10 mM NH₄Cl i metanol.

Fraksjonene som inneholder produktet tørkes og gjenoppløses i vann. De bringes til pH-verdi 10 med 0,01 N NaOH og dialyseres, konsentreres til 100 mg/ml og produktet utfelles i 5 volumdeler aceton.

Oppnådd produkt: 4,7 g (55 % av det teoretiske).

2) Fremstilling av 2-furoyl-derivat

500 mg (0,31 mM) av den tidligere fremstilte blanding av N-lysogangliosider oppløses i 2,5 ml dimetylformamid og til denne oppløsning settes 431 µl (3,1 mM) trietylamin, 174 mg (1,55 mM) 2-pyroslimsyre og 158,4 mg (0,62 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid oppløst i 2,5 ml dimetylformamid.

Reaksjonen foregår i 18 timer ved værelsestemperatur og deretter utfelles produktet i 10 ml aceton. Det filtreres og tørkes.

Det acylerte produkt adskilles fra forbindelsen som ikke har reagert ved kromatografi på en S-Sepharosekolonne (H⁺ form) ekvilibrert i metanol. Furoylderivatet elueres i metanol, tørkes, samles med 1 N Na₂CO₃, dialyseres, konsentreres til 2,5 ml og produktet utfelles i 25 ml aceton.

Oppnådd produkt: 373 mg (72 % av det teoretiske).

EKSEMPEL 41

Metylester av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,36 mM) av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁-natriumsalt (fremstilt i henhold til eksempel 7) oppløses i 5 ml N-metylpyrrolidon og til denne oppløsning settes 44,5 µl (0,72 mM) metyliodid. Blandingen hensettes for reaksjon i 3 timer ved værelsestemperatur, produktet utfelles i etylacetat, filtreres og vakuumbørkes.

Produktet renses ved silikagelkromatografi med en blanding av kloroform/metanol/vann (60:30:6) som elueringsmiddel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,5 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 25 ml aceton.

Oppnådd produkt: 449 mg (89 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11), viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,4 [N-(2-furoyl)-lyso-GM₁ = 0,37].

EKSEMPEL 42

Peracetyl at av metylester til N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,36 mM) metylester av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 41) oppløses i 5 ml pyridin, og til denne oppløsning settes 2,5 ml, nylig destillert, eddikksyreanhydrid, og blandingen omrøres i 72 timer ved romtemperatur. Ved avslutning av reaksjonen inndampes oppløsningen i en rotasjons-evaporator og resten fordeles mellom 10 ml iset vann og 10 ml etylacetat; etylacetatet vaskes i kald 1M HCl med vann og med en oppløsning av 1M NaHCO₃. De organiske fasene anhydreres med natriumsulfat, inndampes og resten renses ved silikagelkromatografi ved bruk av en blanding av diklor-metan/etylacetat/isopropanol (70:30:45). De rene fraksjoner

slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 5 ml etyleter og produktet utfelles i 25 ml n-heksan.

Oppnådd produkt: 463 mg (62 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/etylacetat (70:10:30) og etylacetat/isopropanol (95:5) viser at produktet er enhetlig, med Rf på henholdsvis 0,45 og 0,26.

EKSEMPEL 43

Indre ester av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁

400 mg (0,36 mM) natriumsalt av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁ oppløses i 5 ml N-metylpyrrolidon ved 4°C og omsettes med 55 µl (0,4 mM) trietylamin og 100 mg (0,41 mM) 1-metyl-2-klorpyridiniodid. Reaksjonen foregår i 4 timer med et kvantitativt utbytte. Produktet utfelles ved å tilsette 50 ml aceton, det filtreres, samles med 5 ml kloroform/isopropanol (1:1) og gjenutfelles i 25 ml aceton.

Oppnådd produkt: 476 mg (96 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig med Rf = 0,44 [N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁ = 0,37].

EKSEMPEL 44

2-butylamid av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁

500 mg (0,36 mM) metylester av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁ (fremstilt i henhold til eksempel 41) oppløses i 5 ml pyridin og til denne oppløsning settes 2,5 ml 2-butylamin. Reaksjonen foregår i 72 timer ved værelsestemperatur og oppløsningen tørkes i en rotasjonsevaporator, oppløses med 5 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 25 ml aceton. Det filtreres og vakuuttørkes.

Produktet renses deretter ved silikagelkromatografi med anvendelse av en blanding av kloroform/metanol/vann (60:25:4) som eluerende middel.

De rene fraksjoner slås sammen, inndampes, gjenoppløses i 2,5 ml kloroform/metanol (1:1) og produktet utfelles i 25 ml aceton.

Oppnådd produkt: 376 mg (75 % av det teoretiske).

Silikagelkromatografi med et oppløsningsmiddel dannet av kloroform/metanol/0,3% CaCl₂ (50:42:11) viser at forbindelsen er enhetlig, med R_f = 0,50 [metylester av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁ = 0,42].

Farmasøytiske preparater i iniiserbare oppløsninger

EKSEMPEL 45

Preparat nr. 1 - en 2 ml ampulle inneholder:

- aktiv substans	5 mg
- natriumklorid	16 mg
- citratbuffer pH verdi 6, i vann for injeksjon til	2 ml

Det aktive stoff er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivater beskrevet i enten eksempel 5 eller 12.

Preparat nr. 2 - en 2 ml ampulle inneholder:

- aktivt stoff	50 mg
- natriumklorid	16 mg
- citratbuffer, pH verdi 6 i vann for injeksjon til	2 ml

Det aktive stoff er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i eksempel 7.

Preparat nr. 3 - en 4 ml flakong inneholder:

- aktivt stoff	100 mg
- natriumklorid	32 mg
- citratbuffer, pH-verdi 6, i vann for injeksjon til	4 ml

Det aktive stoffet velges fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i eksempler 27, 29, 38 og 40.

Farmasøytiske blandinger fremstilt i tvillingflakonger

EKSEMPEL 46

Preparatene illustrert i dette eksempel foreligger i tvillingflakonger. Den første flakong inneholder det aktive stoff i form av frysetørket pulver i mengder som varierer mellom 10 vektprosent og 90 vektprosent, sammen med en farmasøytisk akseptabel eksipient, såsom glycin eller mannitol. Den andre flakong inneholder oppløsningsmiddelet, som en natriumklorid-oppløsning og en citratbuffer. Umiddelbart før administrering blandes innholdet av de to flakonger sammen og det frysetørrede pulver som inneholder det aktive stoff oppløses raskt og danner en injiserbar oppløsning. Den farmasøytiske form som omfatter en flakong inneholdende det aktive stoffet i form av frysetørket pulver er den foretrukne form av den foreliggende oppfinnelse.

System nr. 1

a. en 2 ml flakong med frysetørket pulver inneholder:

- aktivt substans	5 mg
- glycin	30 mg

b. en 2 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- natriumklorid	16 mg
- citratbuffer i vann for injeksjon til	2 ml

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 5 og 12.

System nr. 2

a. en 3 ml ampulle med frysetørket substans inneholder:

- | | |
|------------------|-------|
| - aktiv substans | 5 mg |
| - mannitol | 40 mg |

b. en 2 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- | | |
|---|-------|
| - natriumklorid | 16 mg |
| - citratbuffer i vann for injeksjon til | 2 ml |

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i enten eksempel 5 eller 12.

System nr. 3

a. en 3 ml ampulle med frysetørket substans inneholder:

- | | |
|------------------|-------|
| - aktiv substans | 50 mg |
| - glycin | 25 mg |

b. en 3 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- | | |
|---|-------|
| - natriumklorid | 24 mg |
| - citratbuffer i vann for injeksjon til | 3 ml |

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivater beskrevet i et av eksemplene 18,33 og 38.

System nr. 4

a. en 3 ml ampulle med frysetørket substans inneholder:

- | | |
|------------------|-------|
| - aktiv substans | 50 mg |
| - mannitol | 20 mg |

b. en 3 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- | | |
|---|-------|
| - natriumklorid | 24 mg |
| - citratbuffer i vann for injeksjon til | 3 ml |

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 18, 33 og 38.

System nr. 5

a. en 5 ml flakong med frysetørket substans inneholder:

- aktiv substans 150 mg
- glycin 50 mg

b. en 4 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- natriumklorid 32 mg
- citratbuffer i vann for injeksjon til 4 ml

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 27, 29, 38 og 40.

System nr. 6

a. en 5 ml flakong med frysetørket substans inneholder:

- aktiv substans 100 mg
- mannitol 40 mg

b. en 4 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- natriumklorid 32 mg
- citratbuffer i vann for injeksjon til 4 ml

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 27,29,38 og 40.

System nr. 7

a. en 3 ml flakong inneholder:

- sterilt, mikronisert aktiv substans 40 mg

b. en 3 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- Tween 80 10 mg
- natriumklorid 24 mg

- fosfatbuffer i vann for injeksjon til 3 ml

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 41, 42 og 43.

System nr. 8

a. en 5 ml flakong inneholder:

- sterilt, mikronisert aktiv substans 100 mg

b. en 4 ml ampulle med oppløsningsmiddel inneholder:

- Tween 80 15 mg
- soyabønne lecitin 5 mg
- natriumklorid 36 mg
- citratbuffer i vann for injeksjon til 4 ml

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 41, 42 og 43.

Farmasøytiske preparater for transdermal administrering

EKSEMPEL 47

Preparat nr. 1 - et plaster inneholder:

- aktiv substans 100 mg
- glycerol 1,6 g
- polyvinyl alkohol 200 mg
- polyvinylpyrrolidon 100 mg
- eksipient for å øke transdermal penetrering 20 mg
- vann 1,5 g

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 22,23 og 25.

preparat nr. 2 - 100 g salve inneholder:

- aktiv substans (i 5 g av blandet fosfolipid liposomer) 4,0 g

- polyetylen glycol monostearat	1,5 g
- glycerol	1,5 g
- ester av p-hydroksybenzosyre	125 mg
- vann	72,9 g

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivater beskrevet i et av eksemplene 22,23 og 25.

Farmasøytiske preparater til oral administrering

EKSEMPEL 48

Preparat nr. 1 - en tablett inneholder:

- aktiv substans	20 mg
- mikrokrySTALLinsk cellulose	150 mg
- laktose	20 mg
- amid	10 mg
- magnesiumstearat	5 mg

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 9,13,19 og 26.

Preparat nr. 2 - en pille inneholder:

- aktiv substans	30 mg
- karboksymetyl cellulose	150 mg
- amid	15 mg
- skjellakk	10 mg
- sakkarose	35 mg
- fargestoff	0,5 mg

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 9, 14 og 28.

Preparat nr. 3 - en gelatinøs kapsel inneholder:

- aktiv substans	40 mg
- laktose	100 mg
- gastroresistent belegg	5 mg

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 15, 24 og 24.

Preparat nr. 4 - en myk gelatinkapsel inneholder:

- aktiv substans	50 mg
- vegetabilsk olje	200 mg
- bivoks	20 mg
- gelatin	150 mg
- glycerol	50 mg
- fargestoff	3 mg

Den aktive substans er valgt fra gruppen dannet av gangliosid-derivatene beskrevet i et av eksemplene 15, 24 og 34.

PATENTKRAV

1. Analogifremgangsmåte til fremstilling av det terapeutisk aktive N-acyl-N, N'-di-lysogangliosider, N'-acyl-N, N'-di-lysogangliosider og N, N'-diacyl-N, N'-di-lysogangliosider, i hvilke acylgruppene som er bundet til det merkede nitrogen atom er avledet fra en alifatisk syre med 1 til 11 karbonatomer eller fra en sykloalifatisk syre med 5 til 7 karbonatomer, hvorav begge kan være substituert med fenyl, pyridyl, indanyl eller tiofenyl, hver av de nevnte substituenten kan valgfritt være substituert med en eller flere C₁₋₆ alkoksygrupper eller en eller flere oksogrupeer, eller at acylgruppen er avledet fra, valgfritt med en eller flere, C₁₋₆ alkoksygrupper substituert benzosyre, og acylgruppen, som er bundet til N nitrogenatomet, er avledet fra syrer selektert fra gruppen som består av alifatiske syrer med 1-11 karbonatomer, valgfritt substituert med fenyl, pyridyl, indanyl eller tiofenyl, hver av de nevnte substituenten er valgfritt substituert med en eller flere C₁₋₆ alkoksygrupper eller en eller flere oksogrupeer, eller med imidazolyl, tetrazolyl, tienyl, pyrrolyl, pyridyltio, kinolyl, teofylinyl, nevnte heterosykliske grupper er valgfritt substituert med en eller flere lavere alkyl eller lavere alkyl substituert pyrrolkarbonyl; sykloalifatiske syrer med 5-7 karbonatomer, som kan være substituert med fenyl, pyridyl, indanyl eller tiofenyl, hver av de nevnte substituenten kan valgfritt være substituert med en eller flere C₁₋₆ alkoksygrupper eller en eller flere oksogrupeer; benzosyre valgfritt substituert med en eller flere C₁₋₆ alkoksygrupper; og furankarboksylsyre, med det forbehold at hvis det bare er en acylgruppe tilstede, er den ikke alifatisk, eller estere og/eller indre estere og/eller peracylerte derivater derav, og valgfritt metalsalter derav, og blandinger av slike forbindelser,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter

a) å acylere N-acyl-N, N'-di-lysogangliosider eller N'-acyl-N, N'-di-lysogangliosider med syrene som tilsvarer acylgruppene som skal innføres, eller ved

b) å deacylere passende N, N'-diacyl-N, N'-di-lysoganglosider selektivt på sfingosinnitrogenet eller på neuraminnitrogenet, eller blandinger av disse forbindelser og valgfritt ytterligere inkluderer trinnet hvor de resulterende acyl-di-lysoganglosider konverteres til ester, amid, indre ester og/eller hydroksyperacylerte derivater av de oppnådde forbindelser.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N'-3,4,5-trimetoksybensoyl-N'-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N-(2-furoyl)-N-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N-(1-metyl-2-pyrrolkarbonyl)-N-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N-(2-tiofenacetyl)-N-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

6. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N,N'-di-fenylacetyl-di-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N,N'-di-(2-pyridylacetyl)-di-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.

8. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 til fremstilling av N,N'-di-(5-metyl-2-tiofenkarbonyl)-di-lyso-GM₁, karakterisert ved at tilsvarende utgangsmaterialer anvendes.