

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**1993 - 925**

(13) Druh dokumentu: **A3**

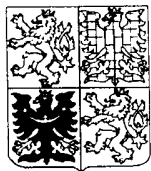
(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 D 457/02**

**A 61 K 31/48**

**A 61 P 37/00**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.05.1993**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**  
(Věstník č. 2/2000)

(71) Přihlašovatel:

Mikrobiologický ústav AVČR, Praha,  
CZ;

(72) Původce:

Křen Vladimír, Praha, CZ;  
Sedmera Petr, Praha, CZ;  
Havlíček Vladimír, Praha, CZ;

(74) Zástupce:

Patentové a licenční služby,  
Českomalínská 25, Praha 6, 160 70;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**2-acetamido-2-deoxy-0-beta-D-  
glukopyranosidy a 2 acetamido-2-deoxy-0-  
beta-D-galaktopyranosidy námelových  
alkaloidů a způsob jejich přípravy**

(57) Anotace:

2-Acetamido-2-deoxy-O-β-D-glukopyranosidy a 2-acetamino-2-deoxy-O-β-D-galaktopyranosidy námelových alkaloidů - elymoklavinu, lysergolu, 9,10 dihydrolysergolu obecného vzorce I, chanoklavinu obecného vzorce II a ergometrinu obecného vzorce III, kde R=R<sub>1</sub> nebo R<sub>2</sub>. Uvedené látky se připraví tak, že se na elymoklavín lysergol, 9,10-dihydrolysergol, chanoklavín nebo ergometrin působí N-acetylhexosaminidasou v přítomnosti p-nitrofenyl-β-N-acetylgalaktosaminidu nebo p-nitrofenyl-β-N-acetylglukosaminidu v pufru o pH 4 až 7 za teploty 4 až 35°C, načež se produkt izoluje například chromatografií na silikagelu nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.



**A**  
**2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-glukopyranosidy a 2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-galaktopyranosidy námellových alkaloidů a způsob jejich přípravy**

|       |   |           |         |       |
|-------|---|-----------|---------|-------|
| PRÍL. | U N Á D<br>P R O M Ě Ť L Y E H O<br>V L A S T N Í C T V Í | 18. V. 93 | 1130678 | DOŠLO |
|-------|---|-----------|---------|-------|

**Oblast techniky**

Vynález se týká 2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-glukopyranosidů (β-N-acetglukosaminidů) a 2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-galaktopyranosidů (β-N-acetgalaktosaminidů) námellových alkaloidů-elymoklavinu, lysergolu, 9,10-dihydrolysergolu, chanoklavinu a ergometrinu, jakož i způsobu jejich přípravy.

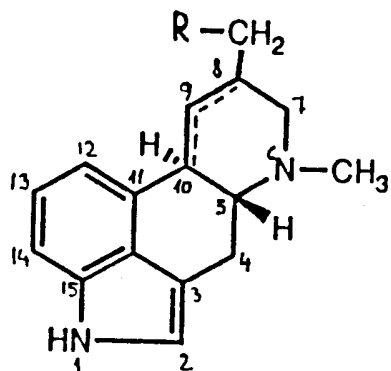
**Dosavadní stav techniky**

Látky uvedeného typu nebyly dosud připraveny. N-acetylhexosaminidylové zbytky se často vyskytují v mnoha glykokonjugátech a receptorových strukturách (Drickamer K., Cell 67,1029 (1991)). Tyto funkční zbytky působí značné změny fyziologických aktivit různých komplexů.

Námellové alkaloidy tvoří skupinu substancí se značnou strukturální rozmanitostí, různými biologickými aktivitami a rozsáhlým farmakologickým použitím. Většina farmakologicky využívaných látek jsou semisyntetické deriváty přírodních alkaloidů. Napojením β-galaktosylových zbytků na námellové alkaloidy (Křen et al. Tetrahedron Lett. 33, 7233 (1992)) se například podstatně zvyšují imunomodulační účinky alkaloidů ve srovnání s aglykony.

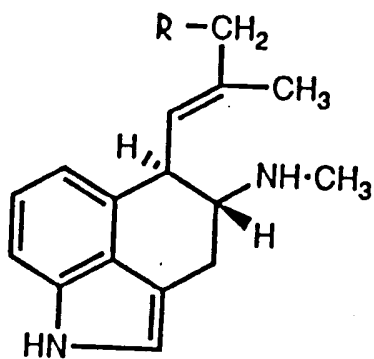
**Podstata vynálezu**

Předmětem vynálezu jsou 2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-glukopyranosidy (β-N-acetglukosaminidy) a 2-acetamido-2-deoxy-0-β-D-galaktopyranosidy (β-N-acetgalaktosaminidy) námellových alkaloidů-elymoklavinu, lysergolu, 9,10-dihydrolysergolu, obecného vzorce I, chanoklavinu obecného vzorce II a ergometrinu obecného vzorce III:

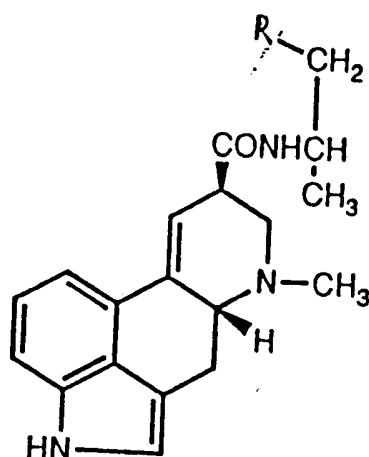


(I)

kde poloha dvojné vazby je  $\Delta^{8,9}$  nebo  $\Delta^{9,10}$  nebo chybí

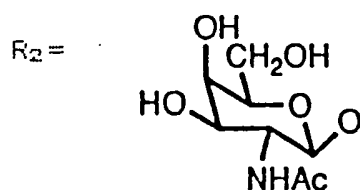
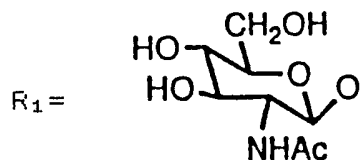


(II)



(III)

ve kterých R je R<sub>1</sub> nebo R<sub>2</sub>, přičemž



Ac znamená acetyl

Látky obecných vzorců I, II a III se připraví tak, že na námělové alkaloidy elymoklavin, chanoklavin, lysergol, 9,10-dihydrolysergol a ergometrin se působí β-N-acetylhexosaminidasou - tj. β-N-acetylgalaktosaminidasou nebo β-N-acetylglukosaminidasou, např. z *Aspergillus oryzae* nebo z *Aspergillus niger* v přítomnosti donoru β-N-acetylhexosaminidového zbytku, např. p-nitrofenyl-β-N-acetylgalaktosaminidu p-nitrofenyl-β-N-acetylhexosaminidu v pufru o pH 4 až 7, načež výsledný N-acetylhexosaminid alkaloidů se z reakční směsi po

lyofilizaci izoluje například chromatografií na silikagelu, nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Jako reakčního prostředku se používá výhodně fosfátového nebo citrátového pufru.

Látky podle vynálezu se vyznačují imunomodulačními vlastnostmi a látky obecného vzorce III mají též uterotonické účinky.

### Příklady provedení vynálezu

Dále je vynález blíže objasněn na příkladech provedení, aniž by byl jimi předmět vynálezu jakkoliv omezen.

#### Příklad 1

#### Příprava $\beta$ -N-acetylgalaktosidu elymoklavinu

Elymoklavin (240 mg, 0,945 mmol), kyselina citronová (85 mg, 0,42 mmol) a p-nitrofenyl- $\beta$ -N-acetylgalaktosaminid (150 mg, 0,438 mmol) se za tepla rozpustí v McIlvainově pufru (10 ml, 0,05 M, pH 4,5). Po ochlazení na 33 °C se ke směsi přidá  $\beta$ -N-acetylhexosa-minidasa s výhodou z *Aspergillus oryzae*. Tento enzym se připraví z komerční  $\beta$ -galaktosidasy z *Aspergillus oryzae* (Sigma, grade XI) následovně: 1 g práškové  $\beta$ -galaktosidasy se rozpustí ve 20 ml destilované vody při 0 °C. Roztok se za míchání při stejné teplotě nasytí síranem amonným do 80 % saturace. <sup>vyložený precipitát</sup> se odstředí a roztok se dále nasytí síranem amonným do 100 % saturace. Po cca 1 hod stání v lednici se vyloučený precipitát odstředí a uschová v lednici jako suspenze v nasyceném roztoku síranu amonného.

Pro 10 ml reakční směsi se použije množství enzymu odpovídající 250 mg původní galaktosidasy.

Glykosylační reakce se sleduje pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (kolona Macherey-Nagel Nucleosil 5, C-18, mobilní fáze methanol: voda: amoniak = 40 : 60 : 0,02). Když produkce glykosidu dosáhne maxima, reakce se přeruší

považením a uvolněný p-nitrofenol se odstraní extrakcí etherem. Reakční směs se lyofilizuje, pevný zbytek se rozpustí v methanolu, a dělí chromatografií na silikagelu (methanol : dichlormethan : amoniak = 20 : 80 : 0,1), glykosidy se eluují směsí (methanol : dichlormethan : ethanol : voda : amoniak = 35 : 60 : 10 : 8 : 0,1). Výtěžek elymoklavin  $\alpha$ -N-acetylgalkaktosaminidu podle HPLC je cca 15 %, izolovaný výtěžek je cca 12,5 %.

Struktura produktu byla potvrzena měřením nukleární magnetické rezonance a hmotovou spektrometrií.

#### 2-Acetamido-2-deoxy-0- $\alpha$ -D-galaktopyranosid elymoklavinu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C): 2.014 s, 3 H (Ac); 2.583 s, 3 H (N- $\text{CH}_3$ ); 2.656 ddd, 1 H (H-5,  $J(4e,5)=3.9$ ,  $J(4a,5)=11.7$ ,  $J(5,10)=9.3$ ); 2.780 ddd, 1 H (H-4a,  $J(2,4a)=1.7$ ,  $J(4a,4e)=14.0$ ); 3.050 dddd, 1 H (H-7e,  $J(7a,7e)=15.9$ ,  $J(7e,9)=2.0$ ,  $J(7e,10)=4.0$ ,  $J(7e,17)=0.4$ ); 3.368 dd, 1 H (H-4e); 3.481 ddd, 1 H (H-5',  $J(4',5')=1.1$ ,  $J(5',6'd)=7.7$ ,  $J(5',6'u)=4.1$ ); 3.605 dd, 1 H (H-3',  $J(2',3')=10.7$ ,  $J(3',4')=3.3$ ); 3.634 ddd, 1 H (H-7a,  $J(7a,9)=0.8$ ,  $J(7a,10)=2.1$ ); 3.705 dd, 1 H (H-6'u,  $J(6'd,6'u)=11.6$ ); 3.810 dd, 1 H (H-4'); 3.830 m, 1 H (H-10); 3.869 dd, 1 H (H-6'd); 3.983 dd, 1 H (H-2',  $J(1',2')=8.5$ ); 4.222 dddd, 1 H (H-17u,  $J(9,17u)=1.0$ ,  $J(10,17u)=1.7$ ,  $J(17d,17u)=12.2$ ); 4.310 ddd, 1 H (H-17d,  $J(9,17d)=1.0$ ,  $J(10,17d)=1.2$ ); 4.425 d, 1 H (H-1'); 6.526 m, 1 H (H-9); 6.933 ddd, 1 H (H-12,  $J(10,12)=1.4$ ,  $J(12,13)=7.0$ ,  $J(12,14)=0.7$ ); 6.940 d, 1 H (H-2); 7.079 dd, 1 H (H-13,  $J(13,14)=8.2$ ); 7.166 ddd, 1 H (H-14,  $J(10,14)=1.0$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C): 23.45 q (Ac); 27.49 t (C-4), 41.20 q (N- $\text{CH}_3$ ), 42.08 d (C-10), 54.54 d (C-2'), 58.05 t (C-7), 63.40 t (C-6'), 66.13 d (C-5), 70.22 d (C-4'), 73.20 t (C-17), 73.53 d (C-3'), 77.47 d (C-5'), 102.43 d (C-1'), 110.40 d (C-14), 111.61 s (C-3), 113.33 d (C-12), 120.04 d (C-2), 123.71 d (C-13), 124.83 d (C-9), 127.73 s (C-16), 131.88 s (C-8), 134.25 s (C-11), 135.59 s (C-15), 174.28 s (C=O).

EI-MS : m/z, (%) 457 (M<sup>+</sup>, 0.2%), 253.1350 (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O, vypočteno 253.1341, 11%), 238 (12), 237.1416 (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 237.1392, 38), 236.1329 (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 236.1313, 100), 235 (74), 234 (18), 133 (21), 232 (12), 221.1035 (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 221.1079, 16), 220 (15), 219.0921 (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 219.0922, 22), 207 (7), 205 (8), 192 (15), 167.0712 (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N, vypočteno 167.0735, 15), 154.0654 (C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N, vypočteno 154.0657, 28), 59.0304 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO), vypočteno 59.0371, 6), 43.0180 (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O, vypočteno 43.0184, 32).

Protonizovaný molekulární ion CI-MS(NH<sub>3</sub>): 458.2319 (C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, vypočteno 458.2291).

#### Příklad 2

Příprava N-acetylgalaktosaminidů lysergolu, 9,10-dihydrolysergolu, chanoklavinu a ergometrinu.

Glykosylace uvedených alkaloidů se provádí stejně jako je uvedeno v příkladu 1, s tím rozdílem, že se použijí ekvimolární množství dalších alkaloidů. Výtěžky (vztaženo na aglykon) N-acetylgalaktosaminidů lysergolu (12%), dihydrolysergolu (10%), chanoklavinu (14%), ergometrinu (9,5%). Uvedené látky byly izolovány a spektrálně charakterizovány jak je uvedeno v příkladu 1.

#### Příklad 3

Příprava β-N-acetylglukosaminidu elymoklavinu

Elymoklavin (240 mg, 0,945 mmol), kyselina citronová (85 mg, 0,42 mmol) a p-nitrofenyl-β-N-acetylglukosaminid (150 mg, 0,438) se za tepla rozpustí v McIlvainově pufru (10 ml, 0,05 M, pH 4,5). Po ochlazení na 33 °C se ke směsi přidá β-N-acetylhexosaminidasa s výhodou z *Aspergillus oryzae* připravený dle postupu uvedeného v příkladu 1.

Pro 10 ml reakční směsi se použije množství enzymu odpovídající 500 mg původní galaktosidasy.

Glykosylační reakce se sleduje pomocí HPLC (kolona Macherey-Nagel Nucleosil 5, C-18, mobilní fáze methanol : voda : amoniak = 40 : 60 : 0,02). Když produkce glykosidu dosáhne maxima, reakce se přeručí povařením, uvolněný p-nitrofenol se odstraní extrakcí etherem. Reakční směs se lyofilizuje, pevný zbytek se rozpustí v methanolu a dělí chromatografií na silikagelu (methanol : dichlormethan : amoniak = 20 : 80 : 0,1), glykosidy se eluují směsí (methanol : dichlormethan : ethanol : voda : amoniak = 35 : 60 : 10 : 8 : 0,1). Výtěžek elymoklavin  $\beta$ -N-acetylglukosaminidu podle HPLC je cca 11,5 %, izolovaný výtěžek je cca 9,5%.

Struktura produktu byla potvrzena měřením nukleární magnetické rezonance a hmotovou spektrometrií.

#### Elymoklavin 2-acetamido-2-deoxy-0- $\beta$ -D-glukopyranosid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C): 2.017 s, 3 H (Ac); 2.570 s, 3 H (N- $\text{CH}_3$ ); 2.639 ddd, 1 H (H-5, J (4e, 5)=3.9, J (4a, 5)=11.7, J (5,10)=9.3); 2.762 ddd, 1 H (H-4a, J (2, 4a)=1.6, J (4a, 4e)=13.9); 3.022 dddd, 1 H (H-7e, J (7a, 7e)=15.9, J (7e, 9)=1.2, J (7e, 10)=3.8, J (7e, 17u)=1.0); 3.254 dd, 1 H (H-4', J (3', 4')=8.4, J (4', 5')=9.6); 3.273 ddd, 1 H (H-5', J (5', 6'd)=1.8, J (5', 6'u)=6.6); 3.334 dd, 1 H (H-4e); 3.471 dd, 1 H (H-3', J (2', 3')=10.3); 3.609 ddd, 1 H (H-7a, J (7a, 9)=0.7, J (7a, 10)=0.7); 3.668 dd, 1 H (H-6'u, J (6'd, 6'u)=11.9); 3.725 dd, 1 H (H-2', J (1', 2')=8.5); 3.816 m, 1 H (H-10); 3.930 dd, 1 H (H-6'd); 4.207 ddd, 1 H (H-17u, J (17d, 17u)=12.3, J (9,17u)0; J (10, 17u)=1.6); 4.278 ddd, 1 H (H-17d, J (9, 17d)=1.3, J (10, 17d)=1.2); 4.453 d, 1 H (H-1'); 6.519 m, 1 H (H-9); 6.918 ddd, 1 H (H-12, J (10, 12)=0.7, J (12, 13)=7.1, J (12, 14)=0.8); 6.924 d (H-2); 7.076 dd, 1 H (H-13, J (13, 14)=8.1); 7.171 ddd, 1 H (H-14, J (10, 14)=0.7).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 25 °C): 23.44 q (Ac), 27.36 t (C-4),

41.14 q (N-Me), 41.97 d (C-10), 57.59 d (C-2'), 57.88 t (C-7), 63.62 t (C-6'), 66.07 d (C-5), 72.72 d (C-4'), 73.28 t (C-17), 76.38 d (C-3'), 78.59 d (C-5'), 102.13 d (C-1'), 110.48 d (C-14), 111.43 s (C-3), 113.38 d (C-12), 120.13 d (C-2), 123.74 d (C-13), 124.87 d (C-9), 127.67 s (C-16), 131.67 s (C-8), 134.00 s (C-11), 135.54 s (C-15), 173.98 s (C=O).

EI-MS :m/z (%) 457 (M<sup>+</sup>, 0.2%), 253.1330 (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O, vypočteno 253.1341, 33%), 238 (23), 237.1400 (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 237.1392, 51), 236.1335 (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 236.1313, 100), 235 (92), 234 (31), 233 (60), 232 (29), 221.1045 (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 221.1079, 19), 220 (21), 219.0921 (C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>, vypočteno 219.0922, 22), 207 (9), 205 (11), 192 (9), 167.0694 (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N, vypočteno 167.0735, 6), 154.0622 (C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>N, vypočteno 154.0657, 10), 59.0337 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO, vypočteno 59.0371, 5), 43.0187 (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O, vypočteno 43.0184, 15).

Molekulární ion protonizovaný MSCI : 458.2300 (C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, vypočteno 458.2291)

#### Příklad 4

Příprava  $\beta$ -N-acetylglukosaminidu elymoklavinu pomocí  $\beta$ -N-acetylglukosaminidas různého původu

Příprava  $\beta$ -N-acetylglukosaminidu elymoklavinu se provádí jak je uvedeno v příkladu 3 s tím rozdílem, že místo  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas z *Aspergillus oryzae* se použije s výhodou  $\beta$ -N-acetylglukosaminidas z *Aspergillus niger* (Sigma) v množství 26 U/ml a McIlvainův pufr o pH 4,0 nebo  $\beta$ -N-acetylglukosaminidas z hovězích ledvin (Sigma) v množství 13 U/ml a McIlvainův pufr o pH 4,25.

## Příklad 5

Příprava N-acetylglukosaminidů lysergolu, 9,10-dihydrolysergolu, chanoklavinu a ergometrinu

Glykosylace uvedených alkaloidů se provádí stejně jako je uvedeno v příkladu 3 nebo 4 s tím rozdílem, že se použijí ekvimolární množství dalších alkaloidů. Výtěžky (vztaženo na aglykon, dle postupu v příkladu 3) N-acetylglukosaminidů lysergolu (9%), dihydrolysergolu (8%), chanoklavinu (11%), ergometrinu (7,5%). Uvedené látky byly izolovány a spektrálně charakterizovány jak je uvedeno v příkladu 1.

Chanoklavin, kde  $R=R_2$  je charakterizován hmotovým spektrem  $m/z$  (%): 460 (M+H)<sup>+</sup>, 442(2), 428(2), 257(10), 239(100), 204(3) a NMR spektrem (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C) protonovým: 7,033 (H-2), 2,952 (H-4a), 3,347 (H-4e), 3,189 (H-5), 1,893 (H-7a), 1,893 (H-7e), 5,458 (H-9), 4,083 (H-10), 6,713 (H-12), 7,073 (H-13), 7,207 (H-14), 4,370 (H-17d), 4,079 (H-17u), 2,603 (NCH<sub>3</sub>), 4,467 (H-1), 3,676 (H-2), 3,487 (H-3), 3,284 (H-4), 3,258 (H-5), 3,907 (H-6 d), 3,701 (H-6 u), 1,755 (Ac)

Ergometrin, kde  $R=R_2$  je charakterizován hmotovým spektrem  $m/z$  (%): 529 (M+H)<sup>+</sup>, 511(2), 497 (1), 326 (100), 308 (2), 204(4) a NMR spektrem (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25 °C) protonovým: 6,986 (H-2), 2,710 (H-4a<sup>b</sup>), 3,590 (H-4e<sup>b</sup>), 3,106 (H-5), 2,835 (H-7a), 3,205 (H-7e), 3,634 (H-8), 6,452 (H-9), 7,193 (H-12), 7,119 (H-13), 7,219 (H-14), 2,662 (N-Me), 4,150 (H-α), 1,186 (H-β), 3,881 (H-β d), 3,579 (H-β u), 4,433 (H-1), 3,768 (H-2), 3,481 (H-3), 3,322 (H-4), 3,310 (H-5), 3,914 (H-6 d), 3,704 (H-6 u), 2,014 (Ac)

### Biologické testy nových látek

Nově připravené glykosidy námelových alkaloidů byly testovány na imunomodulační aktivitu, tj., především na posílení imunitního systému v obraně proti nádorovým onemocněním.

Postup testování:

Mononukleární buňky z periferní krve (PBMC) byly získány z

heparinizované krve (Heparin, Spofa, ČR, 5 IU/ml) po separaci na hustotním gradientu Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Sigma, USA). Buňky byly resuspendovány v kompletním kultivačním mediu. Aktivované NK-obohacené lymfoblasty byly připraveny po 10 denní kultivaci v PBMC kultuře RPMI8866 B lymfoblastoidních buněk ozářených  $\gamma$ -zářením o dávce 50 Gy (Perusia B., Ramoni C., Anegon A., Cuturi M.C., Faust J., Trinchieri G.: Nat.Immun. Cell Growth Regul. 6, 171, (1987)).

Dlouhodobé kultivace byly prováděny v mediu RPMI-1640 obohaceném L-glutaminem a antibiotiky a dále 10% fetálním telecím serem (Biocom, Brno ČR). Inkubace byla prováděna při 37<sup>0</sup>C ve zvlhčované atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Nádorové cílové buňky pro stanovení aktivity NK-buněk: K562 [ECACC, #85011407], lidské myeloidní leukemické lymfoblasty RAJI [ECACC, #85011413], lidské T-buněčné leukemické lymfoblasty byly získány ze sbírky ECACC (Salisbury, UK).

Efaktorové buňky v koncentraci 2.10<sup>5</sup>/ml byly inkubovány s cílovými buňkami označenými <sup>51</sup>Cr v konc. 1.10<sup>4</sup>/ml po 4 hodiny na mikrotitrační destičce. Po inkubaci byla radioaktivita supernatantu odečítána pomocí  $\gamma$ -scintilátoru. Všechny testy byly prováděny třikrát. Samovolné uvolnění radiaktivního chromu bylo měřeno po inkubaci bez efektorových buněk. Procento specifické lyse bylo vypočteno dle následujícího vzorce:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{exp.cpm} - \text{spont.cpm}}{\text{max.spm} - \text{spont.cpm}} \times 100$$

kde, exp.cpm (= počet rozpadů za minutu) je průměrná hodnota cpm v přítomnosti efektorových buněk, spont.cpm je uvolnění radioaktivity bez efektorových buněk a max. cpm je 40% celkového radioaktivního chromu inkorporovaného do cílových nádorových buněk.

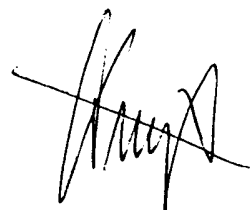
Testované glykosidy alkaloidu byly přidávány k efektorovým buňkám v různých koncentracích  $10^{-6}$  až  $10^{-15}$  M a byl měřen jejich efekt ve srovnání s kontrolami (bez přídavku těchto látek).

Při testování nových látek bylo dosaženo následujících výsledků:

2-Acetamido-2-deoxy-O- $\beta$ -D-glukopyranosid elymoklavinu a 2-acetamido-2-deoxy-O- $\beta$ -D-galaktopyranosid elymoklavinu zvyšují cytotoxicitu PBMC buněk (třída bílých krvinek) vůči NK-senzitivním (K562) a NK-rezistentním (RAJI) nádorovým liniím, ve srovnání se samotným elymoklavinem, o 20 <sup>až</sup> 50%. Účinnější látkou se jeví 2-acetamido-2-deoxy-O- $\beta$ -D-glukopyranosid elymoklavinu.

#### Průmyslová využitelnost

*Sloučeniny*  
Způsobu podle vynálezu lze využít především ve farmacii a imunologii.

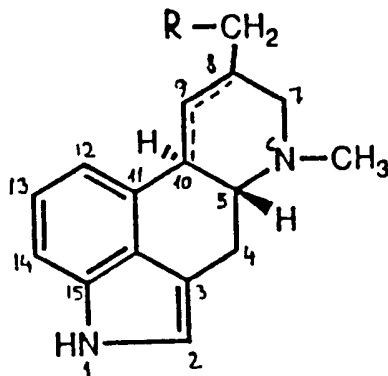


92J-92  
TJK

|       |                                     |           |        |      |
|-------|-------------------------------------|-----------|--------|------|
| PRÍL. | URAD<br>PRÁVNÍKOVÉHO<br>VLASTNÍCTVA | 18. V. 93 | 030678 | č.j. |
|       |                                     |           | DOŠLO  |      |

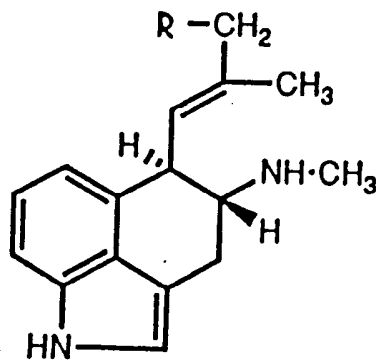
### PATENTOVÉ NÁROKY

1. <sup>A</sup> 2-acetamido-2-deoxy-0- $\beta$ -D-glukopyranosidy a 2-acetamido-2-deoxy-0- $\beta$ -D-galaktopyranosidy námelových alkaloidů - elymoklavinu, lysergolu, 9,10-dihydrolysergolu obecného vzorce I, chanoklavinu obecného vzorce II a ergometrinu obecného vzorce III:

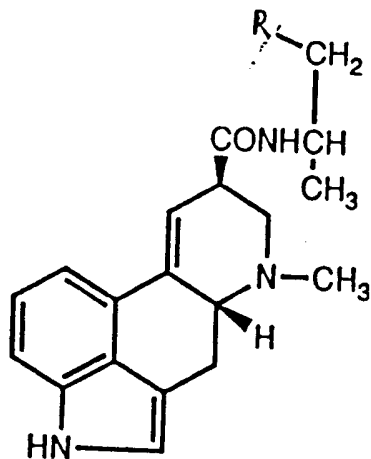


(I)

kde poloha dvojné vazby je  $\Delta^{8,9}$  nebo  $\Delta^{9,10}$  <sup>nebo</sup> chybí

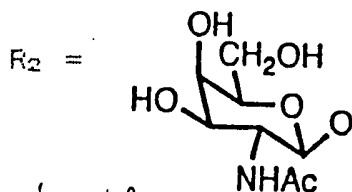
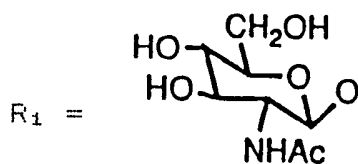


(II)



(III)

ve kterých R je R<sub>1</sub> nebo R<sub>2</sub>, přičemž



kde Ac znamená acetyl.

2. Způsob přípravy látek <sup>pyranosidů</sup> podle <sup>návrhu</sup> 1 vyznačený tím, že se na elymoklavin, lysergol, 9,10-dihydrolysergol, chanoklavin nebo ergometrin působí N-acetylhexosaminidasou v přítomnosti p-nitrofenyl-β-N-acetylgalaktosaminidu nebo p-nitrofenyl-β-N-acetylglukosaminidu v pufru o pH 4 až 7 za teploty 4 až 35°C, načež se produkt izoluje například chromatografií na silikagelu nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.