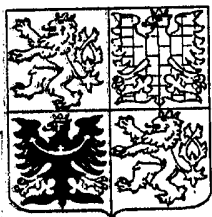


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 27.10.92
(32) 29.10.91, 16.09.92
(31) 91/784299, 92/946501
(33) US, US
(40) 11.08.93

(21) 3240-92

(13) A3

5(51)

C 12 P 17/08

// (C 12 P 17/08, C 12 R 1:89)

(71) ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, Indiana, US;

(72) Bonjouklian Rosanne, Zionsville, Indiana, US;
Moore Richard Elliott, Honolulu, Hawaii, US;
Patterson Gregory Matthew Leon, Honolulu, Hawaii, US;
Smitka Tim Allen, Indianapolis, Indiana, US;

(54) Nové alkaloidy hapalindolového typu, způsob je
jich přípravy a farmaceutický prostředek, který
je obsahuje

(57) Nové alkaloidy hapalindolového typu, označované jako
A89271 A - F a I jsou antifungálně a protinádorově účinné.
Způsob přípravy hapalindolů G a H kultivací modrozelené
řasy Fischerella ambigua ATCC 55210. Příprava A89271
faktorů B a F kultivací modrozelené řasy Hapalosiphon hi-
bernicus ATCC 55225 a biologicky čistá kultura této řasy.

3240-92

č.j.	60415
datum	27. X. 92
URAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	
Příl.	

- 1 -

Nové alkaloidy hapalindolového typu, způsob jejich přípravy a farmaceutický prostředek, který je obsahuje

Oblast techniky

Vynález se týká nových alkaloidů hapalindolového typu, které mohou být izolovány z modrozelených řas *Fischerella ambigua* ATCC 55210. Tyto nové alkaloidy jsou antifungálními a protinádorovými činidly. Vynález se také týká četných způsobů. Prvním takovým způsobem je způsob přípravy A89271 B, přičemž se kultivuje modrozelená řasa ze souboru zahrnujícího *F.ambigua* ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica* Janet (UH izolát EN-3-1) nebo jejich mutant, který produkuje A89271 B. Dalším způsobem je způsob produkce A89271 F, přičemž se kultivuje modrozelená řasa ze souboru zahrnujícího *F.ambigua* ATCC 55210 a *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 nebo jejich mutant, který produkuje A89271 F. Ještě dalším způsobem je způsob přípravy faktoru A89271 ze souboru zahrnujícího faktory A89271 A, C, D, E a I, přičemž se kultivuje *F.ambigua* ATCC 55210, nebo její mutant, který produkuje zvolený A89271 faktor. Opět dalším způsobem je způsob přípravy hapalindolu voleného ze souboru zahrnujícího hapalindoly G a H, přičemž se kultivuje *F. ambigua* ATCC 55210 nebo její mutant, který produkuje hapalindol G a H. Vynález se rovněž týká biologicky vyčištěné kultury *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 nebo jejího mutantu, produkujícího A89271. Kromě toho se vynálezu týká použití faktorů A89271 pro inhibici fungálního růstu a pro ošetřování vnímavých neoplasmů savců. Tento vynález se také týká farmaceutických prostředků obsahujících jako účinnou látku alespoň jeden faktor A89271.

Dosavadní stav techniky

Vynález se tedy týká nových antifungálních a protinádorových prostředků. Obzvláště se vynález týká alkaloidů hapalindolového typu označovaných jakožto faktory A89271 A, B, C, D, E, F, a I.

Jiné typy alkaloidů hapalindolového typu popsal Bonjouklian a kol. v americkém patentovém spise číslo 4 870185 (zveřejněno 26. 9.1989) a Moor a kol. v americkém patentovém spise číslo 4 755610 (zveřejněno 5.7.1988).

Hapalindoly jsou účinnými fungicidy, což se nejprve zjistilo v případě *Hapalosiphon fontinalis* (R.E. Moore a kol., J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, str. 6456 až 6457; R.E. Moore a kol., J. Org. Chem. 1987, 52, str. 1036; a R.E. Schwartz a kol., J. Ind. Microbiol. 1990, 5, str. 113 až 124). Nejběžnějším hapalindolem je hapalindol A, což je chlor a insonitril obsahující tetracyklický indolový alkaloid, který je pravděpodobně produktem biosyntézy z prokursoru odvozeného od tryptofanu a geraniol pyrofosfátu.

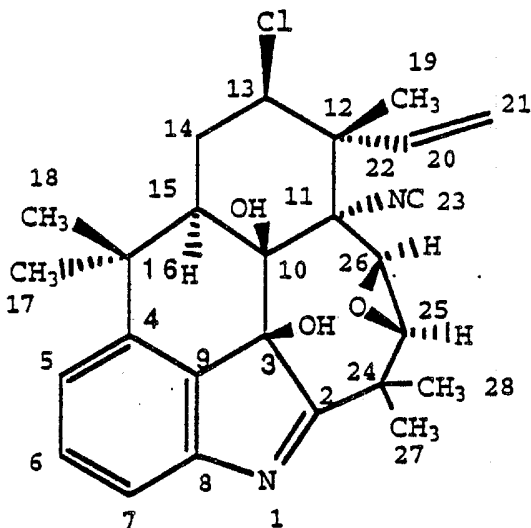
Podobné sloučeniny, hipalindolinony byly izolovány z *Fischerella* sp. R.E. Schwartz a kol., J. Org. Chem. 1987, 52, str. 3706 až 3708). Jak *Fischerella* tak *Hapalosiphon* patří do rodu *Stigonemataceae* (*Stigonematales*).

Podstata vynálezu

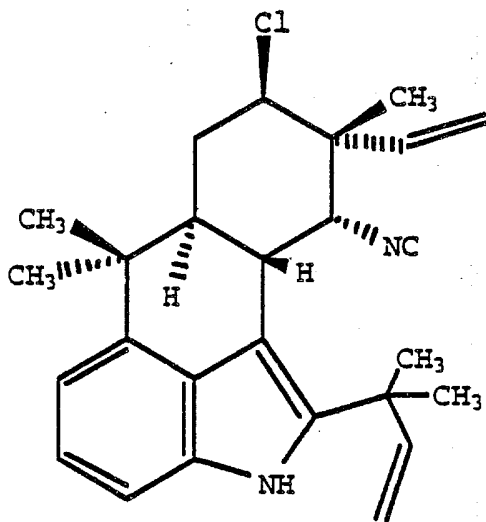
Podstatou vynálezu je nová řada hapalindolových alkaloidů faktory A89271. Faktory A89271 se také označují jakožto "ambiguines".

Podobně jako hapalindoly faktory A89271 jsou produkovány modrozelenou řasou rodu *Stigonemataceae*, viz. *Fischerella ambigua* (Nageli) Gomont (UTEX 1903) ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* W. & G.S. West (UH izolát BZ-3-1) ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica* Janet (UH izolát EN-3-1). *F. ambigua* ATCC 55210 (UTEX 1903 je veřejně dostupná a předmětem obchodu jakožto produkt společnosti Culture Collection of Algae Department of Botany, The University of Texas v Austinu, Austin, Texas 78713-7640. Faktory A89271 podle vynálezu se mohou nejlépe připravovat kultivací modrozelené řasy *Fischerella ambigua* ATCC 55210.

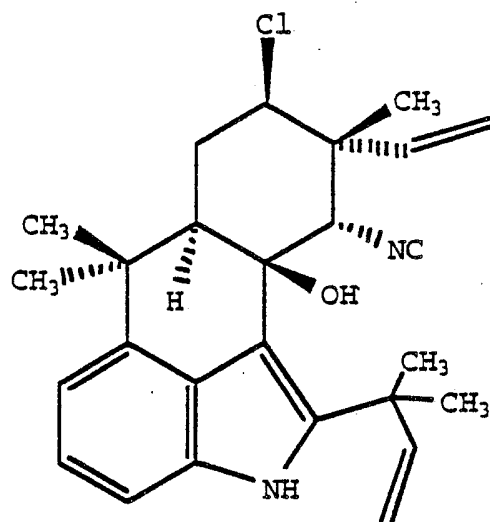
Faktory A89271 mají následující strukturu a systém číslování:



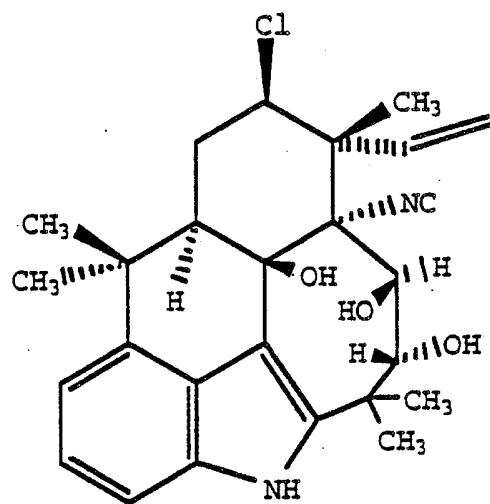
(1) A89271 A



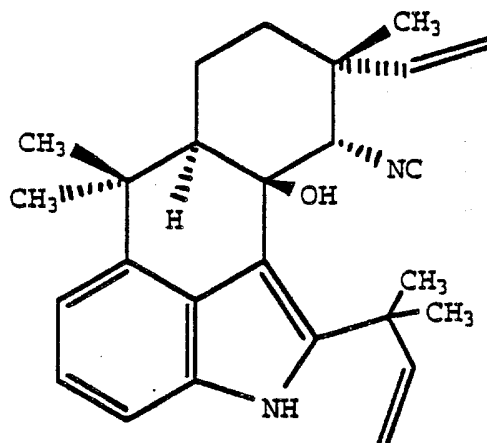
(2) A89271 B



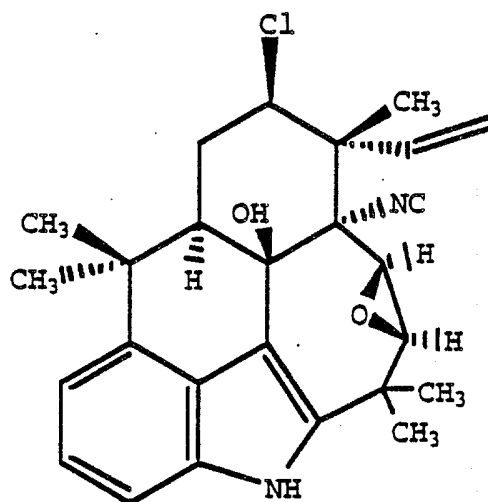
(3) A89271 C



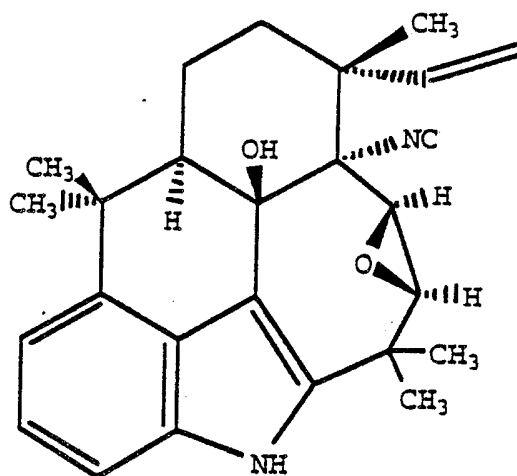
(4) A89271 D



(5) A89271 E



(6) A89271 F



(Z) A89271 I

Faktory A89271 podle vynálezu se mohou produkovat kultivací kmene produkujícího A89271 modrozelené řasy *Fischerella ambigua*. A89271 B se také může produkovat kultivací kmene produkujícího A89271 B *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica*; a A89271 F se také může produkovat použitím *Hapalosiphon hibernicus*.

Kmen *Fischerella ambigua*, produkující A89271 je uložen v souhlase s budapeštskou smlouvou a je součástí sbírky kmenových kultur The American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, kde je veřejně dostupný pod číslem No. ATCC 55210.

Kmen *Westiellopsis prolifica* produkující A89271-B je dostupný ve sbírce kultur The University v Hawaii.

Nový *Hapalosiphon hibernicus* W a G.S. West kmen: ATCC 55225

Nový kmen *Hapalosiphon hibernicus* podle vynálezu produkuje faktory 189271 B a F. Tento kmen je uložen podle budapeštské dohody a je součástí sbírky kmenových kultur ATCC pod číslem ATCC 55225.

Charakteristiky *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225

Jde o filament s pravým rozvětvením. Buňky hlavního filamentu jsou široké 8 až 10 mikrometrů. Buňky jsou kvadrátové a subválcové. Části hlavního vlákna jsou pleuriseriatové. Heterocysty v hlavním filamentu mají šířku 5 až 6 mikrometrů a délku 10 až 12 mikrometrů (válečkovitý tvar). Filamenty jsou bohatě větveny.

Buňky větvi jsou široké 4 až 6 mikrometrů a jsou tedy tenčí než hlavního filamentu. Buňky blízké typu větvení jsou podstatně delší než širší (přibližně tři až čtyři krát delší než širší). Obal je tenký a sklovitě průhledný (bezbarvý).

Podobně jako v případě jiných organismů je charakteristikou kmenů *Fischerella ambigua* ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica* jejich proměnlivost. Proto přirozené a navozené mutanty kmenů se mohou získat známými způsoby, jako je zpracování chemickým mutagenem N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Vynález se týká mutantů kultur *Fischerella ambigua* ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica*, které si podržují svoji charakteristiku produkovat faktor A89271 ze souboru A až F a I.

Alkaloidy A89271 podle vynálezu se mohou připravovat kultivací kmenů *Fischerella ambigua*, *Hapalosiphon hibernicus* a *Westiellopsis prolifica* za submerzních aerobních podmínek ve vhodném kultivačním prostředí až do vytvoření podstatné antifungální aktivity. Jiné kultivační techniky, jako je povrchový růst na ztuženém prostředí, se mohou rovněž používat pro produkci těchto sloučenin. Používaným prostředím pro růst kultur *Fischerella ambigua* ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 nebo *Westiellopsis prolifica* může být jakékoliv známé prostředí. Ekonomie produkce, optimální výtěžek a snadnost izolace produktů jsou faktory, na které se bere zřetel při volbě zdroje uhlíku a dusíku. Jakožto živných anorganických solí, které se mohou vnášet do kultivačního prostředí, se může používat běžných rozpustných solí, které jsou schopné dodávat železité, draselné, sodné, hořčnaté, vápenaté, amoniové, chloridové, uhličitánové, fosforečnanové, síranové, dusičnanové a podobné ionty.

Do růstového prostředí se také musí zavádět podstatné stopové prvky, nutné pro růst a vývoj organismů. Takové stopové prvky se běžně vyskytují jakožto nečistoty jiných složek prostředí v dostatečném množství pro požadavky růstu kultivovaného organismu. Může být nutné přidávat malá množství (například 0,2 ml/l) protipěnicího činidla, jako je například propylenglykol (molekulová hmotnost přibližně 2000) do fermentačního prostředí v provoz-

ním množství, pokud se pění stává problémem.

Pro produkci podstatného množství faktorů A89271 se může používat submerzní aerobní kultivace v tancích. Malá množství se mohou produkovat v třepačce. Pro prodlevu ve výrobě, spojenou běžně s naočkováním velkých tanků organismem, je výhodné používat vegetativního inokula. Vegetativní inokulum se připravuje v malém objemu kultivačního prostředí použitím spor nebo příbuzných forem nebo fragmentů vegetativního trichomu organismu k získání čerstvé aktivní růstové kultury organismu. Vegetativní inokulum se pak přeneso do většího tanku. Použité prostředí pro vegetativní inokulum může být totožné, jako prostředí, používané pro fermentace ve velkém měřítku, může se však použít také jiného prostředí.

Kultury *Fischerella ambigua* ATCC 55210, *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 a *Westiellopsis prolifica* mohou růst při teplotě přibližně 20 až přibližně 30 °C. Sloučeniny A89271 se produkují při teplotě přibližně 24 °C a při případném osvícení intenzitou 150 až 200 mikrosteinů $m^{-2}s^{-1}$. Pro produkci sloučenin se může používat intenzity někdy vyšší, někdy nižší.

Jak je běžné pro způsoby aerobní submerzní kultivace tohoto typu, oxid uhličitý ve sterilním vzduchu se probublává kultivačním prostředím. Pro účinnou produkci sloučenin A89271 má být procento oxidu uhličitého přibližně 1 % (při teplotě 24 °C a za tlaku 0,1 MPa).

Produkce A 89271 se může v průběhu kultivace zkušebních vzorků myceliálního extraktu sledovat zkouškami vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií nebo chromatografií v tenké vrstvě. Vzorky myceliálního extraktu se také mohou zkoušet se zřetelem na organismy, o nichž je známo, že jsou citlivé na antifungální prostředky. Takovým, užitečným organismem je *Candida albicans*.

Při produkci za submerzních aerobních kultivačních podmínek ze z kultivačního prostředí mohou faktory A89271 získat o sobě známými způsoby pracovníkům v oboru. Při způsobu izolace se zpravidla používá nejdříve filtrace kultivačního prostředí k oddělení buněk řas a pak vymražovacího sušení oddělených buněk. Vymražovacím sušením získané řasy se mohou extrahovat vhodným rozpouštědlem, jako je isopropanol, dichlormethan, ethylacetát nebo jejich

směsi. Alkaloidy se mohou oddělovat tak, že se extrakt podrobuje separačním způsobům známým v oboru, jako je například gelová filtrace a/nebo silikagelová chromatografie. Alkaloidy se pak mohou čistit vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Faktory A89271 podle vynálezu inhibují růst různých hub, zvláště patogenních živočišných a rostlinných hub.

V tabulce I až VII jsou uvedeny minimální inhibiční koncentrace (MIC), při kterých faktory zpravidla inhibují růst různých hub. V těchto tabulkách znamená pomlčka nebo výraz "N.T.", že materiál nebyl testován.

Tabulka I In vitro antifungální účinnost A89271 A
v RPMI a 10% telecím zárodečném séru

Sloučenina	MIC (mcg/mL)	
	<u>Candida albicans</u>	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>
A89271 A	2,5	>20
Amphotericin B	0,156	-
Tolnaftate	-	0,039

Tabulka II In vitro antifungální účinnost A89271 A
v Sabouraudově a dextrozovém prostředí

Sloučenina	MIC (mcg/mL)		
	<u>Candida albicans</u>	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	<u>Aspergillus fumigatus</u>
A89271 A	2,5	10	80
Amphotericin B	0,625	-	1,25
Tolnaftat	-	0,039	-

Tabulka III in vitro antifugální účinnost A89271 B,C
D a F v RPMI a 10% zárodečném telecím séru

Sloučenina	MIC (mcg/mL)	
	<u>Candida albicans</u>	<u>Trichophyton</u> <u>mentagrophytes</u>
A89271 B	1,25	2,5
A89271 C	1,25	0,625
A89271 D	1,25	0,625
A89271 F	1,25	1,25
Amphotericin B	0,156	-
Tolnaftat	-	<0,02

Tabulka IV In vitro antifungální účinnost A89271
B, C, D a F v Sabouraudově a v dextrozovém prostředí

Sloučenina	MIC (mcg/mL)		
	<u>Candida</u> <u>albicans</u>	<u>Trichophyton</u> <u>mentagrophytes</u>	<u>Aspergillus</u> <u>fumigatus</u>
A89271 B	1,25	>80	20
A89271 C	2,5	>80	>80
A89271 D	1,25	>80	>80
A89271 F	1,25	>80	>80
Amphotericin B	0,312	-	1,25
Tolnaftat	-	<0,02	-

Tabulka V In vitro antifugální účinnost A89271 E
a I v RPMI a 10% zárodečném telecím séru

Sloučenina	MIC (mcg/mL)		
	<u>Candida</u> <u>albicans</u>	<u>Trichophyton</u> <u>mentagrophytes</u>	<u>Aspergillus</u> <u>fumigatus</u>
A89271 E	2,5	2,5	>80
A89271 I	1,25	2,5	>80
Amphotericin B	0,625	N.T.	1,25
Tolnaftát	N.T.	0,02	N.T.

Tabulka VI - In vitro antifugální účinnost A89271 E a I v Saboureaudově a v dextrozovém prostředí

Sloučenina	MIC (mcg/mL)		
	<u>Candida albicans</u>	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	<u>Aspergillus fumigatus</u>
A89271 E	5	2,5	>80
A89271 I	2,5	2,5	>80
Amphotericin B	0,312	N.T.	5,0
Tolnaftát	N.T.	0,02	N.T.

Tabulka VII - In vitro antifugální účinnost A89271 E a I v antibiotikovém prostředí 3 /Difco/

Sloučenina	MIC (mcg/mL)		
	<u>Candida albicans</u>	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	<u>Aspergillus fumigatus</u>
A89271 E	5,0	5,0	>80
A89271 I	1,25	5,0	>80
Amphotericin B	0,02	N.T.	0,039
Tolnaftát	N.T.	0,02	N.T.

Vyrobený a izolovaný alespoň jeden faktor A89271 nebo jeho farmaceuticky vhodná sůl je užitečný k inhibici růstu hub, zvláště v případě živočichů a především lidí. Vynález se proto týká způsobu inhibice růstu hub v případě lidí, kteří potřebují takové ošetření, přičemž se ošetřovaným jedincům podává účinné množství alespoň jedné sloučeniny ze souboru A89271, zahrnujícího faktor A, faktor B, faktor C, faktor D, faktor E, faktor F a faktor I.

Vynález se však také týká způsobu inhibice růstu hub v případě rostlin nebo rostlinných částí, přičemž se rostlina nebo rostlinná část ošetřuje účinným množstvím alespoň jedné sloučeniny ze souboru A89271, zahrnujícího faktor A, faktor B, faktor C, faktor D, faktor E, faktor F a faktor I. Výrazem "rostlina" a/nebo "rostlinná část" se zde vždy míní celá rostlina nebo její části, například listy, květy, stonky, kořeny, plody, zelené části, hlízy ale také sklizené a skladované plodiny, například plody, zrna, hlízy, zelené části, vláknina a semena. Při ochraně rostlin se nanáší alespoň jeden z faktorů A89271 na rostlinu nebo na její část, přičemž se alespoň jeden takový faktor uvádí do styku s fytopatogenem rostliny. Pracovníkům v oboru je jasné, že takové ošetření nemusí nutně zahubit organismus. V závislosti na použitém množství, na druhu a na síle pathogenu se volí jednotlivá sloučenina, která pak ničí nebo narušuje větší nebo menší podíl pathogenu. Je dobře známo, že snížení nepříznivého působení pathogenu, i když plně onemocnění nelikviduje, má pro ošetřovanou rostlinu značný význam.

Je nejúčinnější aplikovat sloučeninu podle vynálezu na rostlinu nebo její část před výskytem zdrojů infekce. Je tedy možno používat sloučeninu podle vynálezu pro předcházení onemocnění nanášením alespoň jednoho faktoru v období klimaticky příznivém pro růst patogenů. Rostlina a její části se tak mohou chránit před poškozením, které nutně souvisí s patogenní infekcí.

Pro aktivní růst rostlin se dosahuje nejlepších výsledků při opakovaném nanášení faktoru v průběhu růstu rostliny v intervalech jednoho až několika týdnů v závislosti na počasí a na závažnosti onemocnění.

Způsoby formulace faktorů A 89271 a přípravy disperzí a

emulzí a způsoby nanášení disperzí nebo emulzí faktoru A89271 na rostlinu nebo na části rostliny jsou zcela v oboru ochrany rostlin obvyklé.

Podle zvlášť výhodného provedení vynálezu jsou A89271 faktory podle vynálezu užitečné pro ošetřování citlivých neoplasmů zvláště leukemie a pevných nádorů, například nádorů pankreas a prsu. Jakkoliv jsou faktory A89271 obecně užitečné pro ošetřování vnímavých neoplasmů, jsou faktory A, F a I zvláště vhodné pro ošetřování pevných nádorů savců, zvláště lidí.

Vynález se proto také týká způsobu ošetřování vnímavých neoplasmů savců, přičemž se podává účinné množství alespoň jedné sloučeniny ze souboru A89271, zahrnujícího faktor A, faktor B, faktor E, faktor F a faktor I nebo jeho farmaceuticky vhodnou sůl.

V tabulce VIII je uvedena účinnost vybraných faktorů A89271 na určité buněčné řady pevných nádorů. Kolonová fermentační zkouška diskové difuze na měkkém agaru je popsána v kapitole 3 publikace Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development (Frederick A. Valeriote a kol., vyd. 1990). Uvedený popsáný způsob se modifikuje přidáním 1 ml ethanolu do každého suchého faktoru ve fiole a žádaná koncentrace roztoku se nanáší na papírový kotouček (disk). Kotouček se vysuší a pak se vloží na destičky měkkého agaru, jak je ve shora uvedené publikaci popsáno.

Kromě uvedeného výhodného provedení se vynález také týká farmaceutického prostředku, který obsahuje účinné množství alespoň jedné sloučeniny ze souboru A89271, zahrnujícího faktor A, faktor B, faktor C, faktor D, faktor E, faktor F a faktor I spolu s farmaceuticky vhodným nosičem, excipientem nebo ředidlem, kterého se používá pro podávání živočichům.

Výrazem "účinné množství", zde používaným, se vždy míní dávka alespoň jedné účinné látky dostatečná pro terapeutické ošetření podle specifické lékařské indikace.

Výrazem "účinná látka" zde používaným, se vždy míní alespoň jedna sloučenina ze souboru A89271, zahrnujícího faktor A až F a I.

Pro terapeutické ošetření specifické indikace se podává alespoň jeden A89271 faktor jako takový, nebo zpracovaný na jed-

Tabulka VIII Vytváření kolonie při diskové difuzní
Zkouška^{1,2} zkoušce na měkkém agaru

A89271 Faktor (mcg/disk)	L1210	Pevný nádor					LML
		PO3	C38	Mam17	CX-1	H8	
Faktor A (45 ug)	0-400 ²	650	650 670 750		600-650	300-470	0-300
(11 ug)	250-320		610			250-420	0-300
(9 ug)	200-250	500	480			200-330	
Faktor B (80 ug)	210 200-250		430	220	220	200-300	0-250 80-250
(20 ug)	100-200		260-400			180	0-100
Faktor E (80 ug)	280 250-300	440-500	300	350		220-240	100-180
	200-220	460	480-500				
(20 ug)	100-200		300-360			100-180	80
Faktor F (80 ug)	200-250 350-460	500	500 550-580			200-300 200-400	0-120
(20 ug)	300-350		590			200-350	0-80
(16 ug)	0-220	440	460			200-330	
(8 ug)	250-280			250			0-400
Faktor I (80 ug)	260 200-220	490	500	250			0-200 100-200
(20 ug)	100-250		680			100-180	0-180
(16 ug)	110	420	390			120	

- ¹L1210 buňky myši leukemie
PO3 buňky pevného nádoru myšního pankreas
C38 buňky pevného nádoru myšního tračnicku
Mam17 buňky pevného nádoru myších bradavek
CX-1 buňky pevného nádoru lidského tračnicku
H8 buňky pevného nádoru lidského tračnicku
LML fibroblast "nízké malignance"

²měření v zonových jednotkách: 200 zonových jednotek = 6MM

jednotkovou dávku farmaceutického prostředku pro parenterální, transdermální, rektální, nasální nebo intravenózní podání nebo s výhodou pro orální podání. Takové farmaceutické prostředky se připravují v oboru o sobě známým způsobem a obsahují alespoň jednu účinnou látku ze souboru zahrnujícího A89271 faktory spolu s farmaceuticky vhodným nosičem. V takových farmaceutických prostředcích se účinná sloučenina označuje jakožto "účinná látka". Při výrobě farmaceutického prostředku se účinná látka zpravidla mísí s nosičem nebo se ředí nosičem nebo se zapouzdřuje do nosiče, který může mít formu kapsle, sáčku nebo jiného obalu. Pokud nosič slouží jako ředidlo, může být pevný, polopevný nebo kapalný a působí jako pojídlo, excipient nebo prostředí pro účinnou látku. Farmaceutický prostředek má pak formu tablet, pilulek, prášků, kosočtveřek, sáčků, elixírů, emulzí, roztoků, sirupů, suspenzí, měkkých a tvrdých želatinových kapslí, sterilních, vstříkovatelných roztoků a sterilních balených prášků.

Jakožto příklady vhodných nosičů, excipientů a ředidel se uvádějí laktoza, dextroza, sacharoza, sorbitol, manitol, škroby, klovatina akacia, fosforečnan vápenatý, algináty, salicylát vápenatý, mikrokryсталická celulóza, polyvinylpyrrolidon, celulóza, tragakant, želatina, sirup, methylcelulóza, methylhydroxybenzoát, propylhydroxybenzoát, mastek, stearát hořečnatý, voda a minerální olej. Farmaceutické prostředky mohou přídavně obsahovat mazadla, smáčedla, emulgátory, a suspenzační prostředky, konzervační prostředky, sladidla a chuťové přísady. Farmaceutické prostředky mohou být formulovány tak, aby okamžitě, po prodlouženou dobu nebo odloženě uvolňovaly alespoň jednu účinnou látku po podání nemocnému za použití o sobě známých způsobů. Pro orální podání se faktor obsahující popřípadě alespoň jeden další faktor, mísí s nosičem a s ředidly a lisuje se na tablety nebo se zapouzdřuje do želatinových kapslí. Nebo se směsi mohou rozpouštět v kapalinách, jako je například 10% vodný glukozový roztok, isotonická solanka, sterilní voda nebo jako je podobná kapalina a mohou se podávat intravenózně vstříkáním.

Farmaceutické prostředky se s výhodou formují v jednotkové dávkovací formě, přičemž každá dávka obsahuje přibližně 1 mg až

přibližně 500 mg a nejčastěji přibližně 5 mg až přibližně 300 mg alespoň jedné účinné látky. Výrazem "jednotková dávkovací forma" se zde vždy míní fyzikálně oddělené jednotky, vhodné jakožto dávka pro lidi i pro zvířata, přičemž každá jednotka obsahuje předem stanovené množství účinné látky, vypočtené podle žádoucího účinku spolu s potřebným farmaceuticky vhodným nosičem. Takové farmaceutické prostředky mohou obsahovat alespoň jeden faktor A89271 jakožto účinnou látku. Výrazem "farmaceuticky vhodný" se zde vždy míní nosič, ředidlo nebo excipient, které jsou slučitelné s ostatními složkami a nepůsobí nepříznivě na ošetřovaného jedince.

Následující příklady farmaceutických prostředků vynález toliko objasňují, nijak jej však neomezují. Používaný výraz "účinná látka" má shora vysvětlený význam.

Farmaceutický prostředek 1

Tvrdé želatinové kapsle se připravují za použití následujících složek:

	množství (mg/kapsle)
alespoň jedna účinná látka	250
škrob, sušený	200
stearát hořečnatý	10
celkem	460

Farmaceutický prostředek 2

Tablety se připravují za použití následujících složek:

	množství (mg/tableta)
alespoň jedna účinná látka	250
celulóza, mikrokrytalická	400
oxid křemičitý, sublimovaný	10
kyselina stearová	5
celkem	665

Složky se smísí a slisují se na formu tablet o hmotnosti vždy 665 mg.

Farmaceutický prostředek 3

Suspenze, obsahující vždy 50 mg účinné látky na 5 ml, se připravují za použití následujících složek:

alespoň jedna účinná látka	50,00 mg
natriumkarboxymethylcelulóza	50,00 mg
sirup	1,25 ml
roztok kyseliny benzoové	0,10 ml
chuťová přísada	q.v.
barvivo	q.v.
čištěná voda do celkem	5,0 ml

Účinná látka se vede sítím No. 45 mesh U.S. (průměr ok 45 mikrometrů) a smísí se s natriumkarboxymethylcelulózou a sirupem za vzniku hladké pasty. Roztok kyseliny benzoové, chuťová přísada a barvivo se zředí dílem vody a přidají se za míchání. Pak se přidá dostatečné množství vody k dosažení žádaného objemu.

Farmaceutický prostředek 4

Intravenózně podávaný prostředek se připraví za použití následujících složek:

alespoň jedna účinná látka	100,00 mg
isotonická solanka	1000,00 ml

Sloučeniny A89271 jsou účinné proti houbovým infekcím a citlivým neoplasmům v širokém oboru dávkování. Například denní dávka je zpravidla přibližně 0,1 mg/kg až přibližně 50 mg/kg tělesné hmotnosti. Při ošetřování dospělých jedinců je výhodnou dávkou přibližně 5 mg/kg až přibližně 25 mg/kg podávaná najednou nebo po několika částech. Skutečně podávané množství účinné látky určuje vždy lékař se zřetelem na příslušné okolnosti, jako je závažnost onemocnění, volba příslušné sloučeniny nebo sloučenin, věk, hmotnost a odezva příslušného jedince a cesta podání. Proto určitá dávka účinné látky není předmětem vynálezu. Množství dalších složek je je známe a v tomto oboru obvyklé.

Vynález blíže objasňují avšak nijak neomezuji následující příklady praktického provedení.

Obecné způsoby. ^1H a ^{13}C nukleární magnetické rezonanční (NMR) chemické posuny se vztahují na rozpouštědlové píky: δ_{H} 7,26 (zbytkový CHCl_3) a δ_{C} 77,0 pro CDCl_3 a δ_{H} 3,30 (zbytková CHD_2OD) a δ_{C} 49,0 pro methanol- d_4 . Homonukleární ^1H pojivost se stanovuje experimentem COSY a heteronukleární ^1H - ^{13}C pojivost se stanovuje HMQC (A. Bax a kol., J. Magn. Reson. 1986, 67, str. 565) a HMBC (A. Bax a kol., J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, str. 2093). Homonukleární ^1H nukleární Overhauserovy efekty (NOE) se stanovují podle rozdílu zkoušek NOE za použití 3 s ozařovacích period. V tabulce IX jsou přibližné hodnoty R_f 189271 faktorů získané chromatografií v tenké vrstvě (TLC) na silikagelu.

Tabulka IX TLC R_f hodnoty A89271 faktorů

A89271 faktor	R_f hodnota	Rozpouštědlový System ¹
A	0,47	A
B	0,83	A
C	0,75	A
D	0,21	A
E	0,77	A
F	0,67	A
I	0,29	B

¹A = toluen /EtOAc (3:1)

B = hexan /dioxan (3:2)

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Kultura *Fischerella ambigua* (Nageli) Gomont

Fischerella ambigua kmen ATCC 55210 se kultivuje v kapalném prostředí (modifikované A₃ M₇) ve skleněné baňce o obsahu 20 litrů, obsahující anorganické prostředí následujícího složení:

Složka	Množství
NaNO ₃	200 mg/L
NH ₄ Cl	10 mg/L
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	65 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	13 mg/L
3-(N-morfolino)-propanesulfonová kyselina	627 mg/L
Roztok minoritních prvků ^a	1 mL/L
Roztok stopových prvků ^b	3/25 (0,12) mL/L

Před autoklávováním se hodnota pH prostředí nastavuje na 7 hydroxidem sodným.

^a Roztok minoritních prvků	
Složka	Množství
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,54 g/L
Na ₂ EDTA	3,0 g/L
H ₃ BO ₃	0,62 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,4 g/L
ZnCl ₂	0,10 g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 mg/L
CuCl ₂ 2H ₂ O	34 mcg/L

Roztok stopových prvků		
Množství		
Složka	(mg/10 L	0,1 N H ₂ SO ₄)
MoO ₃ (85%)		176,4
NH ₄ VO ₃		229,6
Cr ₂ K ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O		960,2
NiSO ₄ ·6H ₂ O		447,8
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		493,8
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O		179,4
Al ₂ (SO ₄) ₃		317,1
As ₂ O ₃		66,1
CdCl ₂		81,5
SrSO ₄		104,9
HgCl ₂		67,7
PbCl ₂		67,1
LiCl		305,5
Rb ₂ SO ₄		78,1
NaBr		64,4
KI		65,4
NaF		110,5
Na ₂ SeO ₄		119,4
Be(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O		1037,0

Kultury se kontinuálně osvicují případnou intenzitou 150 až 200 mikroeinstein m⁻²s⁻¹ za použití studených bílých fluorescentních trubic. Obecně se kultury intenzivně provzdušňují vzduchem o obsahu 1 % oxidu uhličitého a inkubují se při teplotě 24 ± 1 °C. Po 25 až 30 dnech se axenická řasa oddělí filtrací a vysuší se vymrazováním. Výtěžek lyofilizované řasy je zpravidla přibližně 0,4 g/l.

Příklad 2

Kultivace *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 nebo *Westiellopsis prolifica* UH izolát EN-3-1

Kmeny *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 nebo *Westiellopsis prolifica* UH izolát EN-3-1 se kultivují stejně, jako je popsáno v příkladu 1. Výtěžek lyofilizované řasy je zpravidla přibližně 0,2 až 0,3 g/l pro *Hapalosiphon hibernicus* a přibližně 0,1 g/l pro *Westiellopsis prolifica*.

Příklad 3

Izolace A89271 A-F a hapalindolů G a H z *Fischerella ambigua* kmen ATCC 55210

Lyofilizovaná *Fischerella ambigua* kmen ATCC 55210 (83 g), připravená způsobem podle příkladu 1, se extrahuje systémem dichlormethan/2-propanol. Extrakt (4,07 g) se chromatografuje na sloupci 1,1 m x 5 cm Sephadexu LH-20 za použití methanolu jakožto elučního činidla. Frakce, účinné proti *Candida albicans* při diskové zkoušce, se spojí na dva podíly a odpaří se. Zbytek z podílu 1 (242 mg) se rozpustí v 50 ml methanolu a filtruje se přes 10 g C18 oxidu křemičitého. Filtrát (202 g) se pak chromatografuje na sloupci 30 cm x 2,5 cm C18 oxidu křemičitého (Chromegabond MC18, ES Industries) za použití lineárního gradientu 80 až 100 % methanolu ve vodě. Fungicidní frakce tohoto sloupce se spojí a odpaří se, čímž se získá A89271 B (11,3 mg) a druhý zbytek (38 mg).

Dalším čištěním druhého zbytku preparativní chromatografií v tenké vrstvě na silikagelu za použití systému 3 : 1 toluen/ethylacetát se získá A89271 A (21 mg) a směs A89271 C a A89271 E. Směs se rozdělí na čistý C (4 mg) a E (7 mg) preparativní chromatografií v tenké vrstvě na oxidu křemičitém za použití systému 3 : 1 hexan/dioxan.

Zbytek z podílu 2 (338 mg) se chromatografuje na C₁₈ silikagelu podobným způsobem jako materiál podílu 1, čímž se získá A89271 D (8,5 mg) a A89271 F (25 mg) spolu s hapalindoly G (10,5 mg) a H (12,5 mg). $[\alpha]_D + 217,73^\circ$

Příklad 4

Izolace A89271 I

Lyofilizovaná *Fischerella ambigua* kmen ATCC 55210 (83 g), připravená způsobem podle příkladu 1, se extrahuje způsobem podle příkladu 3, čímž se získá 1,73 g extraktu. Tento materiál se rozpustí ve 100 ml methanolu a zfiltruje se 15 g adsorbentu C18. Filtrát (995 mg) se chromatografuje na Sephadexu LH-20 způsobem podle příkladu 3, čímž se získá podíl (150 mg) obsahující indoly.

Tento materiál se chromatografuje na C18 preparativním sloupci, jak shora popsáno, za použití gradientu 80 % až 88 % methanolu ve vodě, přičemž se shromažďují 5 ml frakce (průtoková rychlost 5 ml/min). Frakce 42 až 50 obsahuje faktory A89271 A a E, frakce 52 až 58 obsahuje hapalindol G a frakce 59 až 62 obsahuje A89271 I.

Frakce, obsahující A89271 I se spojí a zkoncentrují, čímž se získá zbytek (7,6 mg), který se čistí preparativní chromatografií v tenké vrstvě na silikagelu (systém hexan/dioxan 3 : 2), čímž se získá 4,5 mg A89271 T.

Příklad 5

Izolace A89271 faktorů B a F z *Hapalosiphon hibernicus*

Lyofilizovaný *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225 (25 g), připravený způsobem podle příkladu 2, se extrahuje v míchačce třikrát vždy jednolitrovým podílem 70% ethanolu. Zfiltrované extrakty se spojí a odpaří se. Polopevný zbytek (4,72 g) se chromatografuje na C18 reversním fázovým silikagelu (50 g) za použití strmě stupňovitěho gradientu voda k methanolu k dichlormethanu. Frakce, obsahující indolové alkaloidy podle ¹H NMR a podle chromatografie v tenké vrstvě (systém 3 : 1 toluen/ethylacetát) se spojí (1,4 g) a dále se rozdělíbleskovou sloupcovou chromatografií na silikagelu (40 g) za použití směsi hexanu a ethylacetátu. Frakce eluovaná systémem 4 : 1 hexan/ethylacetát (138 mg), obsahuje v podstatě čistý A89271 B. Frakce 7 (290 mg) se dále chromatografuje na C8 reverzním fázovým silikagelu za použití rozpouštědlového gradientu podobného, jako uvedeno shora. Frakce 32 až

46 obsahuje pouze A89271 F podle ^1H NMR a podle chromatografie v tenké vrstvě. Frakce 5 (180 mg) se překrystaluje ze systému hexan/dichlormethan, čímž se získá A89271 F (100 mg) bílých jehlic.

Příklad 6

Izolace A89271 B z *Westiellopsis prolifica*

Lyofilizovaný *Westiellopsis prolifica* EN-3-1 (17,3 g) se extrahuje 70% ethanolem (jeden litr) míšením (3 krát). Zfiltrovaný extrakt se odpaří, čímž se získá polopevný zbytek (3,5 g). Surový extrakt se frakcionujebleskovou sloupcovou chromatografií na C-18 reverzním fázovém materiálu (50 g) za použití strmě stupňovaného gradientu voda k methanolu k dichlormethanu. Frakce 6 až 10 obsahuje A89271 faktory podle ^1H NMR spektroskopie a podle chromatografie v tenké vrstvě. Tyto frakce se opět spojí (1,25 g) a dále se rozdělíbleskovou sloupcovou chromatografií na silikagelu (150 mg) za použití směsi hexan/ethylacetát. Frakce 5 z tohoto sloupce (32 mg) obsahuje především A89271 B podle ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie. Tyto frakce se překrystalují ze systému hexan/dichlormethan, čímž se získá čistý A89271 B ve formě bílých jehlic (13 mg).

Příklad 7

Nosič pro strukturální formule A89271 A - F a I

1) A89271 A.

a) Charakteristiky

$[\alpha]_D -30^\circ$ (MeOH, c 0.1);

CD (MeOH) λ nm $[\theta]$: 228 (-30,200), 248 (1,000),
272 (-11,000), 303 (18,100);

UV (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 227 (13,900), 301 (2,170);

IR (KBr) ν_{max} : 3500, 3007, 2977, 2933, 2123,
1391, 1371, 1188, 1043, 1003, 937 cm^{-1} ;

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, J Hz; assignace; NOE): 7,12 (dd, J = 7,3 a 0,7 Hz; H-5; 6,17); 7,31 (m, J = 7,8 a 7,3 Hz; H-6; 5, 7), 7,32 (m, J = 7,8 a 0,7 Hz; H-7; 6), 4,09 (dd, J 12,3 a 3,9 Hz; H-13; 14eq, 15,20), 2,17 (ddd, J = -12,8, 3,9 a 2,7 Hz; H-14eq; 13,14ax,15,17), 2,47 (q, |J| = 12,8 Hz; H-14ax; 14eq,18,19), 1,64 (br ddd, J = 12,8, 2,7 a 1,2 Hz; H-15; 13,14eq,17), 1,35 (s; H₃-17; 5,14eq,15), 1,39 (s; H₃-18; 3-OH,10-OH,14ax), 1,68 (s; H₃-19; 10-OH,14ax,21Z,26), 5,96 (dd, J = 17,3 a 11,1 Hz; H-20; 13,21Z,21E), 5,37 (d, J = 17,3 Hz; H-21Z; 19,20,21E,26), 5,53 (d, J = 11,1 Hz; H-21E; 20,21Z), 3,11 (d, J = 4,3 Hz; H-25; 26,27), 3,55 (d, J = 4,3 Hz; H-26; 19,21Z,25), 1,73 (s; H₃-27; 25), 1,72 (s; H₃-28; žádná), 2,91 (s; OH na C-3; 10-OH, 18), 4,26 (d, J = 1,2 Hz; OH na C-10; 3-OH, 18,19);

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, pozice; ^1H -HMBC): 187,4 (s, C2; 3-OH,25,27,28), 83,0 (s, C3; 3-OH, 10-OH), 147,1 (s, C4; 5,6,7,15,17,18), 120,0 (d, C5; 6, 7), 130,7 (d, C6; 5), 118,8 (d, C7; 5), 152,0 (s, C8; 5,6,7), 135,8 (s, C9; 3-OH,5,7), 77,7 (s, C10; 3-OH,10-OH,14eq, 14ax,26), 68,1 (s, C11; 10-OH,19,20,25,26), 51,2 (s, C12; 13,14eq,14ax,19,20,21Z,21E,26), 63,8 (d, C13; 14eq,14ax,15,19,20), 29,0 (t, C14; 13,15), 53,3 (d, C15; 13,14eq,14ax,17,18,10-OH), 38,8 (s, C16; 5,15,17,18), 26,3 (q, C17; 15,18), 25,6 (q, C18; 17), 13,9 (q, C19; 13,20), 140,5 (d, C20; 13,19,21Z), 120,3 (t, C21; žádná), 164,5 (s, C23; žádná), 39,1 (s, C24; 25,26,27,28), 64,6 (d, C25; 26,27,28), 60,3 (d, C26; žádná), 30,6 (q, C27; 25,28), 26,6 (q, C28; 25, 27).

FABMS m/z 453/455 (3:1 MH⁺ iontový shluk)

HR FABMS m/z 453,1953 ($\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$, Δ -0,8

mmu).

b) Analýza charakteristik

NMR analýza ukazuje přítomnost 26 uhlíkových a 29 vodíkových atomů. Pozoruje se 26 signálů v ^{13}C NMR spektru pro 5 methylových, 2 methylenové, 8 methinových a 11 kvarterních atomů uhlíku. V HMQC

experimentu 15 protonovaných uhlíkových signálů je ve vztahu se 17 a 19 protonovými signály v ^1H NMR spektru. Dva zbylé protonové signály (2,91 a 4,26 ppm) se přiřkládají dvěma vyměnitelným protonům. Jelikož FAB MS ukazuje 3 : 1 protonovaný molekulární iontový svazek při mlz 453/455, má mít A89271 A jeden atom chloru, dva atomy dusíku a tři atomy kyslíku na účet multiplicity iontového svazku a zbytek hmotových jednotek. Vysoká rozlišovací měření potvrzují molekulární vzorec $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$, což vyžaduje 13 jednotek nenasycenosti.

Pouze 10 signálů je v oblasti 100 až 200 ppm spektra ^{13}C NMR. Šest piků se přiřítá atomům uhlíku trisubstituovaného benzo- idního jádra, dva navíc atomům uhlíku vinylové skupiny a další isonitrilovému uhlíku. Zbylý signál (δ 187,4) je konsistentní s iminovým uhlíkem a dokládá, že A89271 A je indolenin. A89271 A nemůže být indolem, jelikož jeho UV spektrum je atypické pro indol a jeho NMR spektrum nemá signály pro sp^2 -typ C3 a indol NH. Jelikož pouze 7 z 13 jednotek nenasycenosti se přiřítá π vazbám, je A89271 A hexacyklický.

Dva atomy kyslíku jsou v hydroxylových skupinách (δ_{H} 2,91 a 4,26), vázané na kvarterní atomy uhlíku (δ_{C} 83,0 a 77,7). Zdá se, že třetí atom kyslíku je v epoxidovém kruhu (δ_{H} 3,11 a 3,55; δ_{C} 64,6 a 60,3).

Porovnání NMR hodnot (včetně HMBC a NOESY ukazuje, že A89271 A má stejnou strukturu jako A89271 C od C4 až C21, avšak s tím rozdílem, že má hydroxylovou skupinu na C3, C26 z 5 substituentů uhlíku na C2 anelovaném na C11 a epoxidický atom kyslíku, vázaný na C25 a C26. Hydroxyl na C10 je axiální, jelikož NOE se zdají mezi OH protonem a axiálními methylovými skupinami na C12 a C16. Hydroxylová skupina je také na C3 a syn k OH na C10, jelikož (1) NOE je viditelný mezi dvěma OH protony a mezi OH protonem na C3 a axiální methylovou skupinou na C16 a (2) HMBC vztahy se našly mezi OH protonovým signálem a C2, C3, C9 a C10 signály. Jako v případě A89271 B, C a E, infra, gem-dimethylová skupina je vázána na C2, jelikož HMBC vztahy se pozorují mezi dvěma protony dvou methylových skupin (1,72 a 1,73 ppm) a C2. Zbylé atomy, to je atomy 1,2-disubstituovaného epoxidového

jádra, jsou vázány na gem-dimethylovou skupinu a C11, jelikož se zjistily HMBC vztahy mezi H26 a C10, C11, C12, C24 a C25 a mezi H15 a C24, C27 a C28. Skutečnost, že protony na epoxidovém kruhu jsou orientovány jak ukázáno v 1 jsou založeny na NOE mezi (1) H25 a protony na C26 a C 27 a (2) H26 a protony na C 19, C21 (pouze E) a C25.

c) Krystalografická analýza A89271 A rentgenovými paprsky

A89271 A krystaluje ze systému methanol/voda v jednoklonné soustavě skupina $P2_1$ s jednotkou o rozměrech $a = 0,792(2)\text{nm}$, $b = 1,2418(3)\text{ nm}$, $c = 1,3686(6)\text{ nm}$, $\beta = 94,55(3)\text{ nm}$ a vypočtená hustota je $1,27\text{ g cm}^{-3}$. Celek 1803 reflexí s 2θ menší než $116,0$, měřeno Siemens R3M-V difraktometrem s rentgenovými paprsky za použití záření mědi. Struktura řešena za použití přímých způsobů a rafinována posledními čtverci s faktory anisotropické teploty pro všechny atomy s výjimkou vodíku. Všechny atom vodíku jsou začleněny na vypočítané polohy. Finální R-faktor je $0,06$ pro 1668 pozorovaných reflexí. Tak je potvrzena struktura a relativní stereochemie A krystalografií s rentgenovými paprsky.

2) A89271 B.

a) Charakteristiky

$M_p > 300^\circ$;

$[\alpha]_D - 37^\circ (\text{MeOH}, c\ 0,1)$.

CD (MeOH) $\lambda\text{ nm } [\theta]$: 225 (20,800), 236 (-11,000),

sh 255 (-6,800), 280-292 (-1,300), 300-310 (-4,700);

UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}\text{ nm } (\epsilon)$: 225 (32,400) 282 (7,600);

IR (KBr) ν_{max} : 3620, 3487, 2975, 2142, 1602,

1467, 1445, 1231, 1046, 924 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, J v Hz; asignece; NOE): 8,03 (br s; 1-NH; 7,27,28), 7,00 (dd, $J = 7,4$ a $0,7$ Hz; H-5; 6,1), 7,12 (m, $J = 7.9$ a $7,4$ Hz; H-6; 5,7), 7,13 (m, $J = 7,9$ a $0,7$ Hz; H-7; 1-NH, 6), 3,22 (dd, $J = 11,2$ a $2,3$ Hz; H-10; 11,14ax, 18, 19), 4,67 (d, $J = 2,3$ Hz; H-11; 10, 19, 25, 26Z, 27, 28), 4,41 (dd, $J = 12,5$ a $4,4$ Hz; H-13; 14eq, 15), 2,44 (ddd, $J = -13,0$, $4,4$ a $2,8$ Hz; H-14eq; 13, 14ax, 15, 17), 1,94

(q, $|J| = 13,0$ Hz; H-14ax; 10, 14eq, 18, 19), 2,22 (ddd, $J = 12,5, 11,2$ a $2,8$ Hz; H-15; 13, 14eq, 17), 1,53 (s; H3-17; 5, 14eq, 15, 18), 1,05 (s; H3-18; 10, 14ax, 17), 1,34

(s; H3-19; 10, 11, 14ax, 20, 21Z), 6,07 (dd, $J = 17,6$ a $11,1$ Hz; H-20; 13, 19, 21Z, 21E), 5,27 (d, $J = 17,6$ Hz; H-21Z; 19, 20), 5,34 (d, $J = 11,1$ Hz; H-21E; 20), 6,21 (dd, $J = 17,6$ a $10,6$ Hz; H-25; 11, 26Z, 26E, 27, 28), 5,24 (dd, $J = 17,6$ a $0,9$ Hz; H-26Z; 11, 25, 27, 28), 5,21 (dd, $J = 10,6$ a $0,9$ Hz; H-26E; 25), 1,58 (s; H3-27; 1-NH, 11, 25, 26Z), 1,52 (s; H3-28; 1-NH, 11, 25, 26Z).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, pozice; ^1H -HMBC): 137,0 (s, C2; 1-NH, 10, 25, 27, 28), 105,4 (s, C3; 1-NH, 10, 11), 139,7 (s, C4; 5, 6, 7, 17, 18), 112,6 (d, C5; 6, 7), 122,2 (d, C6; žádná), 107,8 (d, C7; 5), 132,2 (s, C8; 1-NH, 5, 6, 7), 127,0 (s, C9; 1-NH, 5, 6, 7), 34,5 (d, C10; 11, 14eq, 14ax, 15), 66,2 (d, C11; 15, 19, 20), 44,8 (s, C12; 10, 11, 13, 14eq, 14ax, 19, 20, 21Z, 21E), 62,8 (d, C13; 11, 14eq, 14ax, 19, 20), 33,0 (t, C14; 10, 13, 15), 44,6 (d, C15; 10, 11, 14eq, 14ax, 17, 18), 36,5 (s, C16; 5, 14eq, 14ax, 15, 17, 18), 23,9 (q, C17; 18), 24,8 (q, C18; 15, 17), 16,2 (q, C19; 11, 13, 20), 142,4 (d, C20; 13, 19, 21Z, 21E), 115,9 (t, C21; žádná), 158,6 (s, C23; 11), 38,7 (s, C24; 25, 26Z, 26E, 27, 28), 146,2 (d, C25; 26Z; 27, 28), 113,1 (t, C26; none), 27,6 (q, C27; 25, 28), 29,3 (q, C28; 25, 27).

FDMS m/z 406/408 (3:1 M^+ iontový shluk)

FABMS m/z 407/409 (3:1 MH^+ iontový shluk); 380/382

($\text{MH}^+ - \text{HCN}$);

HR FABMS m/z 407,2207 ($\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{Cl}$, $\Delta +4,7$ mmu),
380,2112 ($\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NCl}$, $\Delta +3,3$ mmu).

b) Analýza charakteristik

Desorpční hmotové spektrum B vykazuje 3 : 1 molekulární iontový shluk při m/z 406/408 a vysoce rozlišující hmotové měření potvrzuje elementární složení $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{Cl}$. Z vyšetření hodnot ^1H a ^{13}C NMR vyplývá, že B je hapalindol G, substituovaný na C2

1,1-dimethyl-2-propenylovou skupinou. Signál pro proton na C2 indolového podílu chybí avšak přídavné signály potvrzují přítomnost druhé vinylové skupiny a druhé gem-dimethylové skupiny. HMBC a NOESY zkoušky potvrzují navrženou strukturu. Například kopulace se pozoruje mezi C2 a protony na N1, C10, C25, C27 a C28 při experimentu HMBC a NOE jsou evidentní mezi H11 a protony na C26 (Z pouze), C27 a C28.

3) A89271 C.

a) Charakteristiky

amorfní pevná látka

$[\alpha]_D -44^\circ$ (MeOH, c 0,1)

CD (MeOH) λ nm $[\theta]$: 224 (-7,000), 229 (-25,500),

242 (-8,700), 255 (-8,900), 291 (-5,000), 295 (-5,300);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (ϵ): 223 (40,700), 281

(9,400), 291 (7,700);

IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3486, 2976, 2144, 1442, 1227,

999, 936 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, J v

Hz; assignace ; NOE): 8,18 (br s; 1-NH; 7, 27, 28), 7,07

(dd, J = 7,3 a 0,8 Hz; H-5; 6, 17, 18), 7,17 (m, J = 8,1

a 7,3 Hz; H-6; 5, 7), 7,15 (m, J = 8,1 a 0,8 Hz; H-7;

1-NH, 6), 4,68 (s; H-11; 10-OH, 19, 20, 21Z, 25, 26Z, 26E,

27, 28), 4,41 (dd, J = 12,2 a 4,1 Hz; H-13; 14eq, 15, 20,

21Z), 2,30 (ddd, J = -13,1, 4,1 a 2,3 Hz; H-14eq; 13,

14ax, 15, 17), 2,53 (q, $|J|$ = 12,7 Hz; H-14ax; 11, 14eq,

18, 19), 2,41 (ddd, J = 12,7 a 2,3 Hz; H-15; 13, 14eq,

17), 1,54 (s; H_3 -17; 5, 14eq, 15, 18), 1,23 (s; H_3 -18; 5,

10-OH, 14ax, 17), 1,53 (s; H_3 -19; 10-OH, 11, 14ax, 20,

21Z), 6,04 (dd, J = 17,6 a 10,9 Hz; H-20; 11, 13, 19,

21Z, 21E), 5,26 (d, J = 17,6 Hz; H-21Z; 11, 13, 19, 20,

21E), 5,31 (d, J = 10,9 Hz; H-21E; 20, 21Z), 6,33 (dd, J =

17,6 a 10,4 Hz; H-25; 10-OH, 11, 26Z, 26E, 27, 28), 5,36

(d, J = 17,6 Hz; H-26Z; 10-OH, 11, 25, 26E, 27, 28), 5,28

(d, J = 10,4 Hz; H-26E; 11, 25, 26Z), 1,64 (s; H_3 -27; 1-NH,

11, 25, 26Z, 28), 1,62 (s; H_3 -28; 1-NH, 11, 25, 26Z, 27), 1,67

(s; 10-OH; 11, 14ax, 19, 25, 26E)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (multiplicity, pozice ; ^1H -HMBC): 138,8 (s, C2; 1-NH, 25, 27, 28), 111,4 (s, C3; 1-NH, 10-OH, 11), 139,8 (s, C4; 6, 17, 18), 114,4 (d, C5; 6, 7), 122,9 (d, C6; žádná), 107,6 (d, C7; 5), 131,8 (s, C8; 1-NH, 6), 125,4 (s, C9; 1-NH, 5, 7), 73,8 (s, C10; 11, 14eq, 14ax, 15, 10-OH), 68,5 (d, C11; 15, 19, 20, 10-OH), 45,3 (s, C12; 11, 13, 14eq, 14ax, 19, 20, 21Z, 21E), 63,9 (d, C13; 11, 14eq, 14ax, 15, 19, 20), 29,1 (t, C14; 13, 15), 48,0 (d, C15; 11, 13, 14eq, 14ax, 17, 18), 36,7 (s, C16; 5, 14eq, 14ax, 15, 17, 18), 27,1 (q, C17; 15, 18), 26,5 (q, C18; 15, 17), 18,5 (q, C19; 11, 13, 20), 144,2 (d, C20; 13, 19, 21Z), 115,5 (t, C21; žádná), 159,0 (s, C23; 11), 39,0 (s, C24; 25, 26Z, 26E, 27, 28), 146,8 (d, C25; 26Z, 27, 28), 112,7 (t, C26; žádná), 27,6 (q, C27; 25, 28), 28,9 (q, C28; 25, 27);

FDMS m/z 421/423 (3:1 [M-H]⁺ iontový shluk)

FABMS m/z 423/425 (3:1 MH⁺ iontový shluk)

HR FABMS m/z 423,2197 ($\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{OCl}$ Δ +0-6 mmu).

b) Analýza charakteristik

Hmotová spektrometrie potvrzuje molekulární vzorec pro A89271 C jako $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{OCl}$. ^1H NMR A89271 C nemá signál pro H10, který má B, má však signál při 1.67 pro hydroxylový proton. Hydroxylová skupina se jeví na C10 jelikož OH protonový signál vykazuje dvou vazné a tří vazné HMBC vztahy k C3, C10, C11, C15. Hydroxylová skupina na C10 by měla být axiální, jelikož signály pro axiální proton na C14 a protony axiálních methylových skupin na C12 a C16 jsou posunuty výrazně dolů a NOE se pozorují mezi OH protonem a protony na C11, C14 (pouze axiálně), C19, C25 a C26 (tільки E) Proto má A89271 C strukturu podobnou jako hapalindol s touto výjimkou, že A89271 C má 1,1-dimethyl-2-propenylovou skupinu v poloze C2.

4) A89271 D.

a) Charakteristiky

amorfní pevná látka

$[\alpha]_D -18^\circ$ (MeOH, c 0,1);

CD (MeOH) λ nm [q]: 221 (31,300), 231 (-18,000),
268 (1,500), 300 (-2,500);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (ϵ): 224 (36,000), 280 (7,200),
290 (5,500);

IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3020, 2131, 1701, 1445, 1250, 1033
cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (multiplicita, J v
Hz; **assignace**; NOE): 8,08 (br s; 1-NH; 7, 27, 28), 7,08
(dd, J = 7,2 a 0,7 Hz; H-5; 6, 17, 18), 7,15 (dd, J = 7,7
a 0,7 Hz; H-6; 5, 7), 7,21 (dd, J = 7,7 a 7,2 Hz; H-7;
1-NH, 6,53 (dd, J = 12,7 a 3,6 Hz; H-13; 14eq, 15, 20),
2,32 (ddd, J = -12,7, 3,6 a 2,7 Hz; H14eq; 13, 14ax, 15,
17), 2,61 (q, |J| = 12,7 Hz; H-14ax; 14eq, 18, 19), 2,46 (br
dd, J = 12,7 a 2,7 Hz; H-15; 13, 14eq, 17), 1,53 (s; H₃-
17; 5, 14eq, 15, 18) 1,37 (s; H₃-18; 5, 10-OH, 14ax, 17),
1,84 (s; H₃-19; 10-OH, 14ax, 21Z, 26, 26-OH), 6,08 (dd, J =
17,2 a 11,1 Hz; H-20; 13, 21Z, 21E, 26), 5,43 (d, J =
17,2 Hz; H-21Z; 19, 20, 21E, 26), 5,54 (d, J = 11,1 Hz; H-
21E; 20, 21Z), 4,65 (dd, J = 5,0 a 1,8 Hz; H-26; 19, 21Z,
25, 26-OH), 4,22 (br s; H-25; 26, 27), 1,60 (s; H₃-27; 1-NH,
25), 1,43 (s; H₃-28; 1-NH, 10-OH, 26-OH), 3,61 (s; OH na C-
10; 18, 19, 26-OH, 28), 2,55 (br s; OH na C25; 10-OH, 26-
OH), 4,01 (d, J = 5,0 Hz; OH na C-26; 10-OH, 19, 26, 28) .

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (multiplicita,
pozice : ¹H-HMBC): 136,9 (s, C2; 1-NH, 27, 28), 110,4 (s,
C3; 1-NH), 139,3 (s, C4; 6, 17, 18), 114,7 (d, C5; 7), 123,1
(d, C6; žádná), 107,3 (d, C7; 5), 133,0 (s, C8; 1-NH, 6),
124,7 (s, C9; 1-NH, 5, 7), 77,8 (s, C10; 10-OH, 14eq, 14ax,
15, 26), 70,3 (s, C11; 10-OH, 19, 20, 26, 26-OH), 50,7 (s,
C12; 13, 14eq, 14ax, 19, 20, 21Z, 21E, 26), 65,4 (d, C13;
14eq, 14ax, 15, 19, 20), 29,0 (t, C14; 13, 15), 49,4 (d,
C15; 10-OH, 13, 14eq, 14ax, 17, 18), 37,6 (s, C16; 5, 15,

17, 18), 28,8 (q, C17; 18), 26,6 (q, C18; 15, 17), 13,2 (q, C19; 13,20), 141,3 (d, C20; 13, 19, 21Z), 120,2 (t, C21; žádná), 163,0 (s, C23; žádná), 40,4 (s, C24; 26, 27, 28), 73,9 (d, C25; 26, 27, 28), 80,7 (d, C26; 26-OH), 28,1 (q, C27; 28), 27,0 (q, C28; 25, 27).

FDMS m/z 454/455/456/457 (překrytí 3:1 M+ a MH⁺ iontový shluk)

HR MS m/z 454,2009 (C₂₆H₃₁N₂O₃Cl, D +1,4 mmu).

b) Analýza charakteristik

FAB MS vykazuje 3 : 1 MH⁺ iontový shluk při m/z 454/456 a HR MS dokládá molekulární vzorec C₂₆H₃₁N₂O₃Cl. Spektrum UV a NH signal při 8,08 ppm ve ¹H NMR spektru souhlasí s indolem. NMR hodnoty ukazují, že A89271 D má podobnou strukturu jako A89271 F, přičemž je rozdílem, že epoxidový kruh je nahrazen transdiolovou jednotkou. ¹H NMR spektrum dává signály při 4,22 (H25) a 4,65 (H26) ppm, které jsou kopulovány navzájem a k hydroxylovým protonovým signálům při 2,55 a 4,01 ppm. Experiment HMBC dokládá, že transdiolová jednotka je spojena s C11 a C24, jelikož příčné piky jsou mezi signálem H 26 a signály C10, C11, C12, C24 a C25. MOESY experiment dokládá, že skupina OH na C26 je syn k methylové skupině na C12 a OH skupině na C10, jelikož NOE se jeví mezi (1) 26-OH protonem a protony 10-OH, axiální methylová skupina na C12 a pro-R methylová skupina na C24 a (2) H26 a Z proton na C21.

5) A89271 E.

a) Charakteristiky

amorfní pevná látka

[α]_D -9.5° (MeOH, c 0,1).

CD (MeOH) λ nm [θ]: 223 (12,600), 230 (-21,200),

241 (-4,100), 251 (-6,700), sh 270 (-3,400), sh 282

(-2,400), 291 (-2,100), 295-305 (-3,600);

UV (MeOH)- $\lambda_{\max}$ nm (ϵ): 223 (36,000) 281 (8,400),
291 (6,800);

IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3486, 2970, 2146, 1700, 1603,
1441, 999, 935 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita, J v
Hz; assignace; NOE): 8,15 (br s; 1-NH; 7, 27, 28), 7,06
(dd, J = 7,4 a 0,6 Hz; H-5; 6,17,18), 7,15 (dd, J = 8,1
a 7,4 Hz; H-6; 5,7), 7,13 (dd, J = 8,1 a 0,6 Hz; H-7;
1-NH,6), 4,49 (s; H-11; 10-OH, 19, 20, 25, 26Z, 26E, 27,
28), 1,93 (ddd, J = -13,1, 12,7 a 3,6 Hz; H-13; 13eq,
14eq), 1,64 (ddd, J = -13,1, 3,6 a 3,2 Hz; H-13; 13ax,
14eq), 1,88 (dtd, J = -12,7, 3,6 a 2,3 Hz; H-14eq; 13ax,
13eq, 14ax, 15, 17), 2,11 (qd, $|J|$ = 13,0 a 3,2 Hz;
H-14ax; 14eq, 18, 19) 2,21 (dd, J = 12,7 a 2,3 Hz; H-15;
14eq, 17), 1,51 (s; H₃-17; 5, 14eq, 15, 18), 1,21 (s;
H₃-18; 5, 14ax, 17), 1,42 (s; H₃-19; 11, 14ax, 20, 21Z),
5,94 (dd, J = 17,6 a 10,9 Hz; H-20; 11, 19, 21Z, 21E),
5,06 (d, J = 17,6 Hz; H-21Z; 19, 20, 21E), 5,08 (d, J =
10,9 Hz; H-21E; 20, 21Z), 6,36 (dd, J = 17,6 a 10,4 Hz;
H-25; 11, 26Z, 26E, 27, 28), 5,37 (dd, J = 17,6 a <1 Hz;
H-26Z; 11, 25, 26E, 27, 28), 5,28 (dd, J = 10,4 a <1 Hz;
H-26E; 11, 25, 26Z), 1,67 (s; H₃-27; 1-NH, 11, 25, 26Z,
28), 1,63 (s; H₃-28; 1-NH, 11, 25, 26Z, 27), 1,62 (s; 10-OH;
11).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (multiplicita,
pozice; ^1H -HMBC): 138,5 (s, C2; 1-NH, 25, 27, 28), 112,6
(s, C3; 1-NH, 10-OH, 11), 140,6 (s, C4; 5, 6, 15, 17, 18),
114,2 (d, C5; 7), 122,6 (d, C6; 5), 107,3 (d, C7; 5), 131,7
(s, C8; 1-NH, 5, 6), 125,7 (s, C9; 1-NH, 5, 7), 74,2 (s,
C10; 10-OH, 11, 14eq, 14ax, 15), 67,2 (d, C11; 10-OH, 15,
19, 20), 40,6 (s, C12; 11, 13eq, 14eq, 14ax, 19, 20, 21Z,
21E), 31,6 (t, C13; 11, 14eq, 14ax, 15, 19, 20), 17,7 (t,
C14; 13ax, 15), 47,0 (d, C15; 10-OH, 11, 13ax, 14eq, 14ax,
17, 18), 36,5 (s, C16; 5, 14eq, 15, 17, 18), 27,0 (q, C17;
15, 18), 26,6 (q, C18; 15, 17), 24,1 (q, C19; 11, 13ax, 20),
147,5 (d, C20; 11, 13ax, 19, 21Z), 111,9 (t, C21; žádná).

157,0 (s, C23; 11), 39,0 (s, C24; 25, 26Z, 26E, 27, 28),
147,1 (d, C25; 26Z, 27, 28), 112,6 (s, C26; žádná), 27,8 (q,
C27; 25, 28), 28,9 (q, C28, 25, 27) .

FDMS m/z 388 (M⁺);

FABMS m/z 389 (MH⁺);

HR FABMS m/z 389,2590 (C₂₆H₃₃N₂O, Δ +0.3 mmU).

b) Analýza charakteristik

Elementární složení A89271 E je podle MS C₂₆H₃₂N₂O. NMR dokládá, že E je dechlorovaným derivátem A89271 C. Hodnoty COSY a kopulační konstanty naznačují, že C13 až C15 jsou jednotkami CH₂-CH₂-CH_{ax}. Podle experimentů HMBC a NOESY je OH na C10 axiálně orientován.

6) A89271 F.

a) Charakteristiky

~~15~~ mp >300°C /ze rozkladu/

[α]_D -60° (MeOH, c 0,1).

CD (MeOH) λ nm [θ]: 220 (23,200), 231 (-13,400);

UV (MeOH), λ_{max}: nm (ε): 223 (36,000), 272

(7,100), 279 (6,800);

IR (KBr) γ_{max}: 3691, 3618, 2976, 2130, 1604,

1448, 1046, 944, 876 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (multiplicita, J v

Hz; assignace ; NOE) : 7,99 (br s; 1-NH; 7,27,28), 7,06

(dd, J = 7,2 a 0,7 Hz; H-5; 6,17,18), 7,19 (dd, J = 8,1

a 7,2 Hz; H-6 ; 5, 7), 7,09 (dd, J = 8,1 a 0,7 Hz;

H-7; 1-NH, 6), 4,45 (dd, J = 12,7 a 3,6 Hz; H-13; 14eq,

15, 20), 2,33 (ddd, J = -12,7, 3,6 a 2,7 Hz; H14eq; 13,

4ax, 15, 17), 2,62 (q, |J| = 12,7 Hz; H-14ax; 14eq, 18,

19), 2,34 (dd, J = 12,7 a 2,7 Hz; H-15; 13, 14eq, 17),

1,51 (s; H₃-17; 5, 14eq, 15,18), 1,40 (s; H₃-18; 5, 10-OH,

14ax, 17), 1,74 (s; H₃-19; 10-OH, 14ax, 20, 21Z, 26), 6,16

(dd, J = 17,6 a 10,9 Hz; H-20; 13, 19, 21Z, 21E, 26),

5,44 (d, J = 17,6 Hz; H-21Z; 19, 20, 21Z, 26), 5,59 (d, J =

10,9 Hz; H-21E; 21Z), 3,13 (d, J = 4,5 Hz; H25; 26, 27,

28), 3,77 (d, $J = 4,5$ Hz; H-26; 19, 21Z, 25), 1,62 (s; H₃-27; 1-NH, 25, 28), 1,67 (s; H₃ 28; 1-NH, 25, 27), 3,69 (s; OH on C-10; 18, 19).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (multiplicity, pozice ; ¹H-HMBC): 133,5 (s, C2; 1-NH, 25, 27, 28), 109,6 (s, C3; 1NH), 139,7 (s, C4; 6, 17, 18), 114,5 (d, C5; 7), 123,2 (d, C6; 5, 7), 107,0 (d, C7; 5), 133,6 (s, C8; 1-NH, 6), 124,1 (s, C9; 1-NH, 5, 7), 75,0 (s, C10, 10-OH, 14eq, 14ax, 15, 26), 68,6 (s, C11; 19, 20, 25, 26), 50,4 (s, C12; 13, 14eq, 14ax, 19, 20, 21Z, 21E, 26), 64,4 (d, C13; 14eq, 14ax, 15, 19, 20), 28,9 (t, C14; 13, 15), 48,4 (d, C15; 10-OH, 13, 14eq, 14ax, 17, 18), 37,8 (s, C16; 5, 14eq, 14ax, 15, 17, 18), 28,4 (q, C17; 15, 18), 26,5 (q, C18; 15, 17), 13,1 (q, C19; 13, 20), 141,3 (d, C20; 13, 19, 21Z), 120,0 (t, C21; žádná), 161,5 (s, C23; žádná), 36,1 (s, C24; 25, 26, 27, 28), 65,9 (d, C25; 26, 27, 28), 61,4 (d, C26; 25), 27,3 (q, C27; 25, 28), 29,8 (q, C28; 25, 27).

FDMS m/z 436/438 (3:1 M⁺ iontový shluk)

FABMS m/z 437/439 (3:1 MH⁺ iontový shluk)

HR FABMS m/z 437,1990 (C₂₆H₃₀N₂O₂Cl, $\Delta +0,7$ mmu)

b) Analýza charakteristik

Elementární složení A89271 F je podle HR MS C₂₆H₃₀N₂O₂Cl. A89271 má tedy o jeden atom kyslíku méně než A89271 A. Analýza ¹H a ¹³C NMR spektra, zvláště z experimentů HMBC a NOESY ukazuje, že struktura F je podobná jako A. V ¹H NMR spektru A89271 F chybí však 3-OH protonový signál avšak indolový NH signál je při 7,99 ppm. Indolový systém zjištěn také podle UV spektra.

7) A89271 I.

a) Charakteristiky

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (ϵ): 223 (36,700), 272 (7,600), 279 (7,300);

^1H NMR (300 MHz, d_6 -aceton.): δ 10,05 (br s, 1-NH), 7,04, 6,98, 6,96 (3 d, H-5, H-6, H-7), 2,4, 2,3, 1,9, 1,86 (5 m, H-13ax, H-13eq, H-14ax, H-14eq, H-15), 1,45 (s, CH_3 -17), 1,33 (s, CH_3 -18), 1,73 (s, CH_3 -19), 6,22 (dd, H-20), 5,35 (d, H-21Z), 5,31 (d, H-21E), 3,3 (d, H-25), 3,71 (d, H-26), 1,67 (2s, CH_3 -27, 28).

FABMS m/z 403 (MH^+);

HR FABMS m/z 403,2394 ($\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$, $\Delta + 0,8$ mmu).

Absolutní stereochemie

Absolutní stereochemie A - F a I nebyly přesně stanoveny. Stanovila se CD spektra sedmi sloučenin. Spektra B - F vykazují negativní pik při 230 až 235 nm a pozitivní pik při 220 - 225 nm, což naznačuje, že absolutní stereochemie B - F je identická. A89271 faktory pravděpodobně mají stejnou absolutní stereochemii jako hapalindoly. Hapalindol G, produkováný kulturou *F. ambigua* má optickou rotaci stejnou jako autentický vzorek hapalindolu G, produkovaneho *Hapalosiphon fontinalis*, jehož absolutní stereochemie je známa. Proto je doměnka, že absolutní konfigurace A - F a I jsou, jak bylo naznačeno.

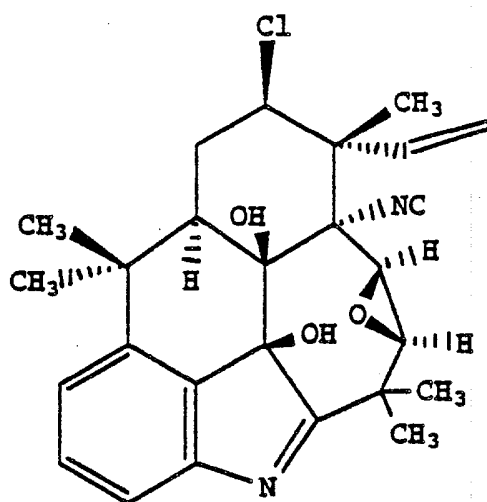
Průmyslová využitelnost

Nové hapalindolové alkaloidy, označované jakožto A89271 A - F a I a B a F, použitelné jakožto antifungální a protinádorová činidla a hapalindoly G a H se připravují kultivací modrozelené sy *Fischerella ambigua* ATCC a *Hapalosiphon hibernicus* ATCC 55225.

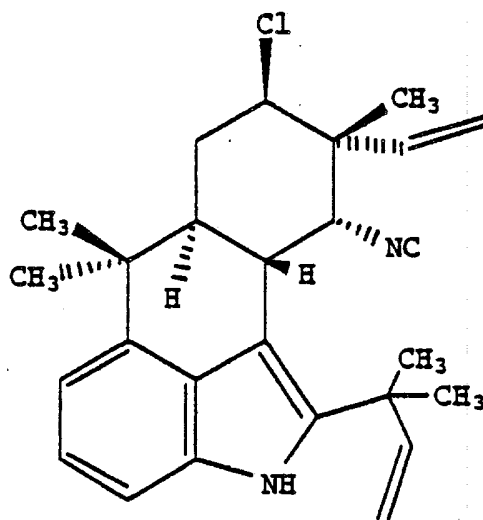
JUDr. Otak. J. ORCÍK
advokát

PATENTOVÉ NÁROKY

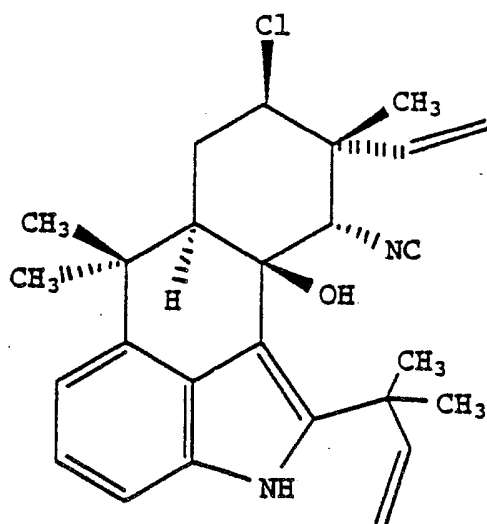
1. Nové alkaloidy hapalindolového typu vzorce



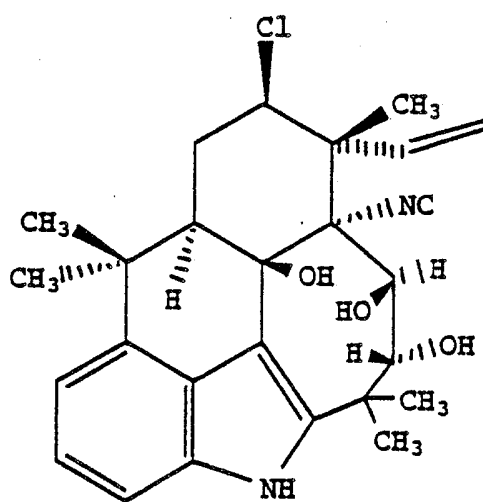
(1) A89271 A



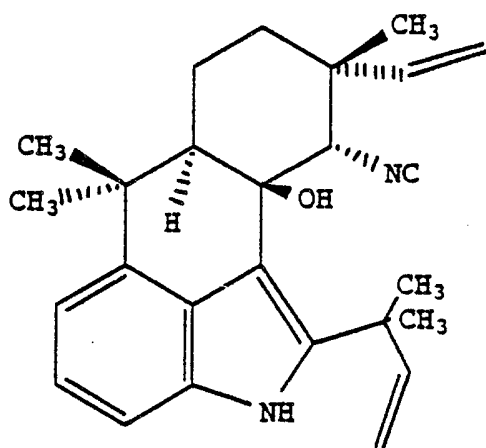
(2) A89271 B;



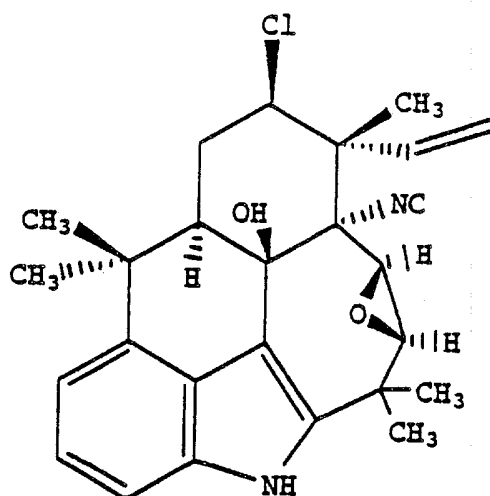
(3) A89271 C;



(4) A89271 D;

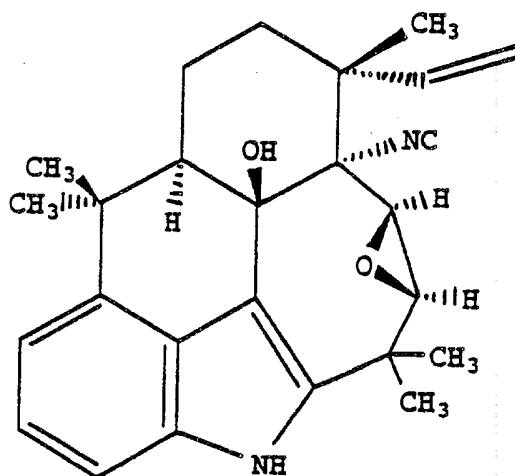


(5) A89271 E;



(6) A89271 F;

a



(7) A89271 I.

2. Nové alkaloidy hapalindolového typu podle nároku 1 vzor-
ce A89271 A.
3. Nové alkaloidy hapalindolového typu podle nároku 1 vzor-
ce A89271 E.
4. Nové alkaloidy hapalindolového typu podle nároku 1 vzor-
ce A89271 .

5. Farmaceutický prostředek s antifungální a protinádorovou účinností, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako účinnou látku obsahuje alespoň jeden A89271 faktor podle nároku 1 až 4 spolu s jednou nebo s několika látkami ze souboru zahrnujícího farmaceuticky vhodný nosič, excipient nebo ředidlo.

6. Způsob přípravy A89271 faktoru ze souboru zahrnujícího A89271 faktor A, C, D, E a I podle nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivuje řasa Fischerella ambigua ATCC 55210 nebo její variant, mutant nebo rekombinant, který produkuje žádaný A89271 faktor, za submerzních aerobních podmínek ve vhodném kultivačním prostředí až do vyprodukování ziskatelného množství zvoleného A89271 faktoru.

7. Způsob přípravy A89271 F 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivuje řasa ze souboru zahrnujícího Fischerella ambigua ATCC 55210 a Hapalosiphon hibernicus ATCC 55225 nebo jejich variant, mutant nebo rekombinant, který produkuje A89271 faktor F, za submerzních aerobních podmínek ve vhodném kultivačním prostředí až do vyprodukování ziskatelného množství A89271 faktoru F.

8. Biologický čistá kultura Hapalosiphon hibernicus ATCC 55225 nebo její variant, mutant nebo rekombinant, který produkuje A89271 faktor ze souboru zahrnujícího A89271 faktor A, C, D, E, F a I.

9. Použití A89271 faktoru podle nároku 1 až 4 jakožto antifung-
antifungálně účinné látky pro živočichy a rostliny.

10. Použití A89271 faktoru podle nároku 1 až 4 jakožto antineo-
plasticky účinné látky pro živočichy.

JUDr. Otakar ČVORČÍK
advokát