

ÚJ F-15078 VEGYÜLET

K i v o n a t

A találmány elsősorban az (I) képletű vegyületre és sóira vonatkozik. Ezek úgy állíthatók elő, hogy egy, a Phoma-nemzetséghez tartozó, illetve az (I) képletű vegyületet és ennek analógjait termelni képes mikroorganizmust fermentálnak, majd a fermentáció termékéből a kapott terméket elkülönítik, és kívánt esetben sót képeznek.

A találmány szerinti vegyületek felhasználhatók gombás fertőzések megbetegedések terápiás vagy profilaktikus jellegű kezelésére az állatgyógyászatban alkalmazható gyógyászati készítmények előállítására.

Jell: (I) képlet

Feladat:

P 0 2 0 0 2 7 4 2

25307

KÖZÉLETÉTELI
PELDANY A2

Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

ÚJ F-15078 VEGYÜLET

A találmány új, antifungális hatású vegyületekre, ezeknek a vegyületeknek az előállítására, ezeknek a vegyületeknek ilyen vegyületeket termelő mikroorganizmus fermentálása útján kapott tenyészléből való elkülönítésére, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerekre, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítményekre, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó, gombás fertőző megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére alkalmas ágensekre, ilyen vegyületeket tartalmazó mikroorganizmusokra, valamint ilyen vegyületek különböző gyógyászati készítmények előállításánál való alkalmazására vonatkozik. A találmány szerinti vegyületek tehát felhasználhatók úgy gombás fertőző megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére, hogy egy adott találmány szerinti vegyületből gyógyászatilag hatásos mennyiséget juttatunk a kezelendő egyed szervezetébe.

Jelenleg antifungális hatású ágensekként klinikailag az amphotericin B és a flucytosine megnevezésű vegyületeket, továbbá azol-származékokat alkalmaznak. Ezek közül a vegyületek közül néhányal az utóbbi időkben különböző problémák jelentkeztek, így például citotoxicitás megjelenése, illetve ilyen vegyületekkel szemben rezisztens gombák megjelenése.

Ismeretes a szakirodalomból, hogy egyes mikroorganizmusok antifungális hatású vegyületeket termelnek. Így például a Zalerion nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok pneumocandin elnevezésű vegyületeket [Schmatz, D. M., és munkatársai: J. Antibiotics 45, 1886 (1992)], az Aspergillus nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok echinokandin típusú vegyületeket [Nyfeler, R. és Keller-Schierlein, W.: Helv. Chim. Acta 57, 2459 (1974)] és az Aureobasidium nemzetségbe tartozók aureobasidin típusú vegyületeket [Ikai, K. és munkatársai: J. Antibiotics, 44, 925 (1991)] termelnek. Azonban az említett vegyületek egyike sem került még klinikai alkalmazásra.

Felismertük, hogy a Chichi-szigeten (Ogasawara-mura, Tokió, Japán) gyűjtött talajmintából elkülönített mikroorganizmus, azaz a Phoma SANK 13899 törzs fermentációs termékeiben antifungális aktivitású új vegyületek találhatók.

A fentiek alapján a találmány új, antifungális hatású vegyületekre, ezeknek a vegyületeknek az előállítására, ezeknek a vegyületeknek ilyen vegyületeket termelő mikroorganizmus fermentálása útján kapott tenyészléből való elkülönítésére, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerekre, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítményekre, ilyen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó, gombás fertőző megbetegedések kezelésére vagy megelőzésére alkalmas ágensekre, ilyen vegyületeket tartalmazó mikroorganizmusokra, valamint ilyen vegyületek különböző gyógyászati készítmények előállításánál való alkalmazására vonatkozik.

(1) A találmány tehát többek között az új, antifungális aktivitású (I) képletű vegyületre, valamint ennek sóira vonatkozik.

(2) A találmány továbbá a következőkben ismertetésre kerülő fizikokémiai tulajdonságokkal bíró vegyületre, valamint ennek sóira vonatkozik:

1) jellegzetesség: bázikus, zsírban oldható por

2) összegképlet: $C_{55}H_{98}N_8O_{14}$

3) molekulatömeg: 1094 (FAB-MS módszer)

4) nagy felbontóképességű FAB-MS $[M+H]^+$

a $C_{55}H_{99}N_8O_{14}$ összegképletre számítva: 1095,7281

talált: 1095,7365

5) ibolyántúli abszorpciós spektrum: véges abszorpció

6) infravörös abszorpciós spektrum: (KBr-szemcse, cm^{-1}): 3434, 3335, 2962, 2937, 2875, 2806, 1750, 1684, 1641, 1509, 1469, 1412, 1371, 1314, 1294, 1271, 1204, 1156, 1128, 1074, 1020

7) optikai forgatóképesség: $[\alpha]_D^{25} -120^\circ$ ($c = 1.0$, metanol)

8) 1H -NMR-spektrum [$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán]: 0,78 (3H), 0,79 (3H), 0,80 (3H), 0,82 (3H), 0,87 (3H), 0,88 (1H), 0,92 (3H), 0,93 (3H), 0,94 (3H), 0,96 (3H), 0,97 (3H), 0,98 (3H), 1,01 (3H), 1,02 (3H), 1,03 (3H), 1,06 (3H), 1,21 (1H), 1,41 (3H), 1,41 (1H), 1,48 (1H), 1,48 (1H), 1,49 (1H), 1,52 (3H), 1,55 (1H), 1,65 (1H), 1,66 (1H), 1,70 (2H), 1,73 (1H), 1,81 (1H), 1,87 (1H), 2,28 (1H), 2,31 (1H), 2,37 (1H), 2,48 (3H), 2,89 (3H), 2,94 (3H), 2,96 (1H), 3,29 (3H), 3,56 (1H), 4,06 (1H), 4,14 (1H), 4,77 (1H), 4,78 (1H), 4,84 (1H), 4,91 (1H), 4,96 (1H), 5,21 (1H), 5,25 (1H), 5,53 (1H), 6,39 (1H), 7,83 (1H), 7,94 (1H), 8,28 (1H)

9) ^{13}C -NMRspektrum [$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán): 10,9(q), 11,9(q), 15,0(q), 15,1(q), 16,0(q), 16,6(q), 17,4(q), 18,3(q), 18,6(q), 18,7(q), 19,1(q), 21,0(q), 21,4(q), 22,1(q), 23,1(q), 23,51(q), 23,54(q), 24,2(t), 24,6(d), 24,8(d), 25,4(d), 25,5(t), 27,7(d), 29,5(q), 29,8(d), 30,2(q), 36,1(q), 36,5(t), 37,7(t), 38,3(d), 38,4(d), 39,7(t), 40,9(q), 46,2(d), 51,8(d), 53,1(d), 54,7(d), 55,1(d), 63,9(d), 64,7(d), 68,1(d), 70,1(d), 73,4(d), 74,3(d), 77,1(d), 169,03(s), 169,04(s), 169,6(s), 169,8(s), 169,9(s), 170,3(s), 172,0(s), 173,4(s), 173,8(s), 174,0(s)

10) nagy felbontóképességű folyadékkromatografálás:

oszlop: Shodex Asahipak C8P 50 4E (4,6 mm átmérőjű és 250 mm hosszú, a Showa Denko K.K. japán cég terméke)

mobil fázis: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat
13 : 7 térfogatarányú elegye

átfolyási sebesség: 0,7 ml/perc

detektálás hullámhossza: λ 210 nm

retenciós idő: 10,20 perc

11) oldékonyság: oldható dimetilszulfoxidban, metanolban és kloroformban

12) aminosav-analízis: a hidrolizátumban treonin, alanin és izoleucin mutatható ki.

(3) A találmány továbbá az új, antifungális hatású (II) képletű vegyületre vonatkozik.

(4) A találmány továbbá olyan vegyületre vonatkozik, amelynek a következő fiziko-kémiai tulajdonságai vannak:

1) jellegzetesség: semleges, zsírban oldható por

2) összegképlet: $C_{57}H_{100}N_8O_{15}$

3) molekulatömeg: 1136 (FAB-MS módszer)

4) nagy felbontóképességű FAB-MS $[M+H]^+$

a $C_{57}H_{101}N_8O_{15}$ összegképletre számítva: 1137,7387

talált: 1137,7410

5) ibolyántúli abszorpciós spektrum: véges abszorpció

6) infravörös abszorpciós spektrum: (KBr-szemcse, cm^{-1}): 3433, 3333, 2963, 2937, 2875, 1751, 1686, 1642, 1516, 1469, 1409, 1388, 1372, 1311, 1292, 1272, 1201, 1156, 1128, 1074, 1017

7) optikai forgatóképesség: $[\alpha]_D^{25} -131^\circ$ (c = 1,0, metanol)

8) 1H -NMR-spektrum [$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán]: 0,78 (3H), 0,79 (3H), 0,80 (3H), 0,83 (3H), 0,87 (1H),

0,87 (3H), 0,90 (3H), 0,92 (3H), 0,93 (3H), 0,95 (3H), 0,95 (3H), 0,98 (3H), 0,98 (3H), 1,01 (3H), 1,01 (3H), 1,03 (1H), 1,05 (3H), 1,28 (3H), 1,37 (1H), 1,40 (1H), 1,46 (1H), 1,47 (1H), 1,49 (1H), 1,51 (3H), 1,64 (1H), 1,65 (1H), 1,66 (1H), 1,86 (1H), 1,72 (1H), 1,78 (1H), 2,12 (3H), 2,13 (1H), 2,26 (1H), 2,31 (1H), 2,37 (1H), 2,88 (3H), 2,93 (3H), 2,97 (3H), 3,28 (3H), 3,56 (1H), 4,03 (1H), 4,15 (1H), 4,73 (1H), 4,78 (1H), 4,82 (1H), 4,83 (1H), 4,91 (1H), 4,97 (1H), 5,15 (1H), 5,28 (1H), 5,50 (1H), 6,37 (1H), 6,87 (1H), 7,86 (1H), 8,29 (1H)

9) ^{13}C -NMRspektrum [CDCl_3 , 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán): 10,5(q), 10,9(q), 14,9(q), 15,1(q), 15,6(q), 16,6(q), 16,7(q), 18,3(q), 18,6(q), 18,7(q), 19,0(q), 20,8(q), 21,4(q), 22,0(q), 22,1(q), 23,1(q), 23,6(q), 23,6(q), 24,1(t), 24,6(t), 24,7(d), 24,8(d), 25,4(d), 27,7(d), 29,5(q), 29,8(d), 30,2(q), 31,6(d), 31,8(q), 36,1(t), 37,6(t), 38,4(d), 39,6(t), 40,9(q), 46,1(d), 51,8(d), 53,1(d), 54,7(d), 54,7(d), 61,2(d), 63,9(d), 64,6(d), 68,1(d), 73,1(d), 74,3(d), 77,0(d), 168,9(s), 168,9(s), 169,1(s), 169,9(s), 169,9(s), 170,3(s), 170,6(s), 171,7(s), 172,0(s), 173,3(s), 173,8(s)

10) nagy felbontóképességű folyadékkromatografálás:

oszlop: Shodex Asahipak C8P 50 4E (4,6 mm átmérőjű és 250 mm hosszú, a Showa Denko K.K. japán cég terméke)

mobil fázis: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat

13 : 7 térfogatarányú elegye

átfolyási sebesség: 0,7 ml/perc

detektálás hullámhossza: λ 210 nm

retenció idő: 9,05 perc

11) oldékonyság: oldható dimetilszulfoxidban, metanolban és kloroformban

12) aminosav-analízis: a hidrolizátumban treonin, alanin és izoleucin mutatható ki.

(5) A találmány tárgya továbbá eljárás a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyület előállítására. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy egy, a Phoma-nemzetséghez tartozó, illetve a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet termelni képes mikroorganizmust fermentálunk, majd a fermentáció termékéből a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet elkülönítjük.

(6) A találmány tárgya továbbá a fenti (5) pont szerinti eljárás, amelynek során Phoma-nemzetségbe tartozó, illetve a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet termelő mikroorganizmusként Phoma SANK 13899 (FERM BP-6851 számon deponálva) törzset használunk.

(7) A találmány olyan gyógyszerekre vonatkozik, amelyek hatóanyagként az (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet vagy ennek sóját tartalmazzák.

(8) A találmány továbbá olyan, gombás fertőzőes megbetegedések terápiás vagy profilaktikus kezelésére alkalmas ágensekre vonatkozik, amelyek hatóanyagként a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet vagy ennek sóját tartalmazzák.

(9) A találmány továbbá a Phoma SANK 13899 (FERM BP-6851 szám alatt deponálva) törzsre vonatkozik.

(10) A találmány a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyület vagy ennek sója alkalmazásaira vonatkozik.

(11) Végül a találmány olyan gyógyászati készítményekre vonatkozik, amelyek hatóanyagként a fenti (1) - (4) pontok bármelyike szerinti vegyületet vagy ennek sóját tartalmazzák.

A találmány szerinti vegyületek tehát a fenti (1) - (4) pontokban ismertetett vegyületek. Ezek közül a vegyületek közül a fenti (1) és (3) pontokban ismertetett vegyületek a (III) általános képlettel - ebben a képletben R jelentése hidrogénatom vagy COCH_3 csoport - jellemezhetők. A jelen találmány kapcsán a (III) általános képletű vegyületeket az F-15078

szám alatt fogjuk említeni. A fenti (1) pontban ismertetett vegyület olyan (III) általános képletű vegyület, amelynél R jelentése hidrogénatom. A jelen találmány során a fenti (1) pontban ismertetett vegyületet vagy a fenti (2) pontban ismertetett fiziko-kémiai tulajdonságokkal bíró vegyületet a F-15078A szám alatt fogjuk említeni. A fenti (3) pontban említett vegyület olyan (III) általános képletű vegyület, amelynél R jelentése COCH_3 csoport. A fenti (3) pontban ismertetett vegyületet vagy a fenti (4) pontban ismertetett fiziko-kémiai tulajdonságokkal bíró vegyületet a következőkben a F15078B szám alatt fogjuk említeni.

A F-15078A sóvá alakítható szokásos módon. A F-15078A sói felhasználhatók bármilyen célra, így például a humán gyógyászatban és az állatgyógyászatban. Amennyiben a humán gyógyászatban és/vagy az állatgyógyászatban kerül felhasználásra, a só jellegét illetően nincs megkötés, kivéve, hogy a sónak gyógyászatilag elfogadhatónak kell lennie. Az ilyen sókra példaképpen megemlíthetünk szervetlen sókat, például hidrokloridokat, továbbá szerves sókat, például pamoesavval alkotott sókat. Ha más típusú alkalmazásra kerülnek, például szerves szintézis során köztiterméként, akkor nincs megkötés az ilyen sókat illetően. Az ilyen sókra példaképpen megemlíthetünk szervetlen sókat, például acetátokat, bromidokat, kloridokat, hidrokloridokat, hidrobromidokat, jodidokat, szulfátokat, foszfátokat és difoszfátokat, valamint szerves savakkal alkotott sókat, például citrátokat, maleátokat, pamoátokat és tartarátokat.

Mindegyik F-15078 vegyület különböző izomerek formájában lehet, azonban ezeket az izomereket egyetlen kémiai szerkezettel lehet jellemezni. A találmány oltalmi köre kiterjed az egyes izomerekre, valamint ezek elegyeire.

Egyes F-15078 vegyületek szolvátokat, például hidrátokat képezhetnek, a találmány oltalmi köre kiterjed ezekre a szolvátokra. Így például ha levegőn állni hagyjuk ezeket a vegyületeket vagy átkristályosítjuk ezeket a

vegyületeket, akkor bizonyos F-15078 vegyületek abszorbeálhatnak vagy adszorbeálhatnak vizet, hidrátokat képezve. A találmány oltalmi körébe tartoznak ezek a hidrátok is.

A találmány oltalmi köre kiterjed olyan prodrugokra, amelyek átalkíthatók a szervezetben a parens F-15078 vegyületekké.

Az F-15078 vegyületek előállíthatók ilyen vegyületeket termelni képes gombák fermentációs termékeiből. F-15078 vegyületeket termelő mikroorganizmusok a Phoma nemzetségbe tartozó gombák, előnyösen a Phoma SANK 13899 törzs (a következőkben egyszerűen mint SANK 13899 törzs kerül említésre). A SANK 13899 törzset a Chichi-szigeten (Ogasawara-mura, Tokió, Japán) gyűjtött talajból sikerült izolálni.

A SANK 13899 törzset a következő táptalajokon tenyésztettük morfológiai tulajdonságainak megfigyelése céljából. A következőkben az egyes táptalajok összetételét ismertetjük.

PDA-táptalaj (burgonya-dextróz agar táptalaj)

Nissui burgonya-dextróz agar (a Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. japán cég terméke)	39 g
desztillált víz	1000 ml

CMA-táptalaj (kukoricaliszt-agar táptalaj)

kukoricaliszt-agar (a Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. japán cég terméke)	17 g
desztillált víz	1000 ml

WSH-táptalaj

Quaker zabliszt	10 g
magnéziumszulfát-heptahidrát	1 g
káliumdihidrogénfoszfát	1 g
nátriumnitrát	1 g
agar-agar	20 g
desztillált víz	1000 ml

Miura-féle táptalaj

glükóz	1 g
káliumdihidrogénfoszfát	1 g
magnéziumszulfát-heptahidrát	0,2 g
káliumklorid	0,2 g
élesztőextraktum	0,2 g
nátriumnitrát	2 g
agar-agar	20 g
desztillált víz	1000 ml

CYA-táptalaj (Czapek élesztőextraktum-agar táptalaj)

dikáliumhidrogénfoszfát	2 g
koncentrált Czapek-oldat*	10 ml
élesztőextraktum	5 g
szacharóz	30 g
agar-agar	15 g
desztillált víz	1000 ml

MEA-táptalaj (malátaextraktum nutriens agar táptalaj)

malátaextraktum	20 g
pepton	1 g
glükóz	20 g
agar-agar	20 g
desztillált víz	1000 ml

G25N-táptalaj (25 % glicerín-nitrát-agar táptalaj)

dikáliumhidrogénfoszfát	0,75 g
koncentrált Czapek-oldat*	7,5 ml
élesztőextraktum	3,7 g
glicerín	250 g
agar-agar	12 g
desztillált víz	750 ml

* A koncentrált Czapek-oldat összetétele a következő:

nátriumnitrát	30 g
káliumklorid	5 g
magnéziumsulfát-heptahidrát	5 g
vas(II)sulfát-heptahidrát	0,1 g
cinkszulfát-heptahidrát	0,1 g
rézszulfát-pentahidrát	0,05 g
desztillált víz	100 ml

A színek tónusát a „Methuen Handbook of Colour” című könyv (Kornerup, A. és Wanscher, J. H. szerkesztésében 1978-ban 3. kiadás-ként jelent meg az Erye Methuen londoni kiadó gondozásában) alapján határozzuk meg.

A SANK 13899 törzs morfológiai tulajdonságai tenyésztés alatt a következők:

PAD-táptalajon 23 °C hőmérsékleten két héten át tartó tenyésztés után a SANK 13899 törzs növekedése 13 - 17 mm átmérőben. A telep megjelenését illetően szál as gyapotra emlékeztet, a telep közepe nő és szál as gyapjú megjelenésű, a telep széle enyhén fogszerű megjelenésű. A telep felületének színe szürke (3B1) és fehér közötti, míg a fordított szín barna (6E5 és 4 közötti).

A SANK 13899 törzs növekedése CMA-táptalajon 23 °C hőmérsékleten két hét után átmérőben 15 - 17 mm. A telep kinézete porszerű, a telep sarkai foghoz hasonló megjelenésűek. A telep felületi színe szürkészöldtől (27E5) tompa zöldig (27E4) változik, míg a fordított szín sötétzöld (27F4).

A SANK 13899 törzs növekedése Miura-táptalajon 23 °C hőmérsékleten két hét után átmérőben 22-33 mm. A telep lapos, széle egyértelműen megjelenik. A telep felületi színe fehér, a fordított szín sárgásfehér (3A2) és fehér között változik.

A SANK 13899 törzs növekedése WSH-táptalajon 23 °C hőmérsék-

leten két hét után átmérőben 33-34 mm. A telep lapos, éle enyhe. A felületi szín halványsárga (3A3) és sárgásfehér (3A2) közötti, a fordított szín azonos a felületi színnel.

A SANK 13899 törzs növekedése CYA-táptalajon 23 °C hőmérsékleten két hét után átmérőben 34-35 mm. A telep szálas gyapot megjelenésű, közepe kiemelkedik és szálas gyapjú kinézetű, továbbá oldható halvány pigment választ ki. A telep éle lapos és enyhe. A telep felületi színe szürkésnarancs színű (6B3) és a fordított szín barnásnarancs színű (6C3) és barna (6D8) között változik.

A SANK 13899 törzs növekedése MEA-táptalajon 23 °C hőmérsékleten két hét után átmérőben 15-23 mm. A telep szálas gyapot megjelenésű, központja kiemelkedik és szálas gyapjú megjelenésű. A telep éles lapos, kinézete sima és enyhén fogszerű közötti. A telep felületi színe fehér és szürke (3B1) között változik, a fordított szín sötétzöld (28F4 és 3 közötti).

A SANK 13899 törzs nem növekedik G25N-táptalajon.

A gombafonal 0,5-3 µm átmérőjű, továbbá gyakran képez zsinórszerű fonalat, és sejtfala vékony vagy vastag. A micélium felülete egyenletes vagy durva, színe színtelen és barna között változik.

Ha ODA-táptalajon vagy Miura-táptalajon több, mint egy hónapon át tenyésztjük, a SANK 13899 törzs szektort képez, illetve pycnidiumot, amely a szektorterület agar-agar részében van beágyazva.

A pycnidium morfológiai tulajdonságai a következők:

A pycnidium átmérője 100-200 µm. A pycnidium az agar-agarba részlegesen vagy teljesen be van épülve, kör alakú vagy csaknem kör alakú, illetve barna vagy fekete színű. Semmiféle nyitott rész nem figyelhető meg. A konidiumot képező sejtek mérete 7,5-9 µm · 1,3-1,8 µm, és a gömbszerű pycnidiumot képező sejtekből vannak kialakítva. A sejtek egyetlen sejtek, hengeres vagy ceruzaszerű alakúak és színtelenek. A

phialo-konidium $3,5-4,7 \mu\text{m} \cdot 1,3-1,8 \mu\text{m}$ méretű, továbbá hengerszerű egyetlen, színtelen sejt. A gombafonal $0,5 - 3 \mu\text{m}$ átmérőjű, gyakran zsinórszerű és vékony vagy vastag sejtfala van. A micélium felülete sima vagy durva, illetve színtelen és barna közötti színű. A SANK 13899 a Phoma fajhoz sorolható Kobayashi, M. J. által az Antibact. Antifung. Agents, 22, 757 (1994) szakirodalmi helyen ismertettek szerint.

A SANK 13899 törzs nemzetközi letétbe került az Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (1-3, Higashi 1-chome, Ibaraki-ken, Japán) által felügyelt International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6,1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) deponáló helyen 1999. augusztus 20-án FERM BP-6851 szám alatt.

Szakember számára jól ismert, hogy a gombák hajlamosak természetes és mesterséges mutációra, például az utóbbit ibolyántúli fénnel végzett besugárzással, radioaktív sugárzással végzett besugárzással vagy kémiai reagensekkel végzett kezeléssel végrehajtva. A SANK 13899 törzs is hajlamos mutációra. Szakember számára érthető, hogy a találmány oltalmi körébe tartozónak tekintjük az összes ilyen mutánst. A mutánsok közé tartoznak a genetikai módszerekkel, például rekombinációval, transzdukcióval és transzformálással előállított mutánsok is. A SANK 13899 törzs fogalma alatt tehát magukat F-15078 vegyületeket képező SANK 13899 törzseket, ezek mutánsait és összes olyan gombát értünk, amelyek nem különböztethetők meg a SANK 13899 törzstől.

Miként a korábbiakban említettük, egy F-15078 vegyületet termelő törzs fermentálását olyan táptalajon hajtjuk végre, amelyet általában hasznosítani lehet fermentációs termékek előállítása céljából. Egy ilyen táptalaj tartalmaz szénforrásokat, nitrogénforrásokat, szervesen sókat, további nyomnyi mennyiségekben növekedési faktorokat és fémeket, me-

lyek mindegyikét a mikroorganizmusok hasznosítani tudják.

A szénforrásokra példaképpen megemlíthetjük a glükózt, fruktózt, maltózt, szacharózt, mannitot, glicerint, dextrint, zablisztet, árpát, kukoricalisztet, burgonyát, kukoricakeményítőt, szójababolajat, gyapotmagolajat, cukorszirupot, citromsavat és borkósavat. Ezeket a szénforrásokat hasznosíthatjuk egyenként vagy kettő vagy több kombinációjaként.

A szénforrás mennyisége attól függ, hogy a táptalaj milyen egyéb tápanyagforrásokat tartalmaz, rendszerint azonban 1 tömeg% és 10 tömeg% közötti mennyiségű.

A nitrogénforrásokra példaképpen megemlíthetjük a szójabablisztet, búzakupát, földimogyorólisztet, gyapotmaglisztet, kazein hidrolizált származékát, Pharmamin márkanévű anyagot, kukoricafehérjét, peptont, húsextraktumot, élesztőt, élesztőextraktumot, malátaextraktumot, nátriumnitrátot, ammóniumnitrátot és ammóniumsulfátot. Ezeket a nitrogénforrásokat használhatjuk egyenként vagy kettő vagy több kombinációjaként.

A nitrogénforrás mennyisége függ a táptalaj egyéb komponenseitől, rendszerint azonban mintegy 0,2 tömeg% és 6 tömeg% közötti mennyiségű.

Nincs szükség nagy tisztaságú szén- vagy nitrogénforrások alkalmazására, így ezek tartalmazhatnak nyomnyi mennyiségekben növekedési faktorokat, vitaminokat és szerves tápanyagokat. A táptalajhoz adagolhatunk olyan sókat, amelyek ionokat képeznek, így például nátrium-, kálium-, magnézium-, ammónium-, kalcium-, foszfát-, szulfát-, klorid- és karbonátionokat.

A táptalajhoz adhatunk továbbá vitaminokat, például B1 vitamint és biotint; a gomba szaporodását fokozó anyagként tiamint; és fémsókat, például mangánátokat és molibdátokat, mely komponensek mindegyikét a gomba hasznosítani képes.

Ha a táptalaj egy oldat, akkor a táptalajhoz a habzás megelőzése céljából hozzáadhatunk egy habzásgátlót, például szilikonolajat, poli-

alkilénglikol-étereket, növényi olajokat, állati olajokat és egyéb felületaktív anyagokat.

A táptalajként használt oldat pH-értéke F-15078 vegyületet termelni képes mikroorganizmus tenyésztése esetén függ az F-15078 vegyület és a vegyületet termelni képes törzs pH-stabilitásától, ha azonban SANK 13899 törzset használunk, akkor ezt a pH-értéket 5,0 és 7,0 között tartjuk.

Az F-15078 vegyületet termelni képes mikroorganizmus tenyésztésének hőmérséklete függ például az adott F-15078 vegyület hőstabilitásától; ha azonban SANK 13899 törzset használunk, akkor rendszerint ez a hőmérséklet 15 °C és 37 °C, előnyösen 22 °C és 35 °C, még előnyösebben 22 °C és 26 °C közötti, a leginkább előnyösen 23 °C.

Az F-15078 vegyületet termelő mikroorganizmus tenyésztésének módszerét illetően nincs különösebb megkötés. Így fermentációs módszerként hasznosíthatunk például szilárd táptalajt hasznosító tenyésztési módszert, keveréses tenyésztést, rázatásos tenyésztést, levegőztetési tenyésztést, illetve keveréses-levegőztetési tenyésztést. Az előnyös módszerekre példaképpen megemlíthetjük a keveréses tenyésztést, rázatásos tenyésztést, levegőztetési tenyésztést, valamint a levegőztetési-keveréses tenyésztést. Méginkább előnyös a rázatásos tenyésztés. Iparilag leginkább előnyös a levegőztetési-keveréses tenyésztés.

Az F-15078 vegyületet termelő mikroorganizmus tenyésztésének első lépése olyan ojtótenyésztés előállítása, amelynek során egy ferde tenyészetből az említett mikroorganizmust átojtjuk kis térfogatmennyiségű táptalajra, majd inkubálást végzünk, ezt követően pedig kívánt esetben nagyobb léptékű törzstenyésztést végzünk. Az ezt követő fermentációt már a táptalajból nagy térfogatmennyiséget használva hajtjuk végre az előállítani kívánt vegyület nyerése céljából.

Ha az F-15078 vegyületet termelő mikroorganizmus fermentálását kis méretben végezzük, az ojtótenyésztést végrehajthatjuk például egy

Erlenmeyer-lombikban, majd az ezt követő nagyobb léptékű törzstenyésztést, illetve a tényleges tenyésztést is például Erlenmeyer-lombikban hajthatjuk végre.

Ha az F-15078 vegyületet termelő mikroorganizmus fermentálását nagy méretben végezzük, előnyösen korsó alakú fermentort vagy tartály alakú fermentort alkalmazunk, melyek fel vannak szerelve keverésre és levegőztetésre alkalmas berendezésekkel. Az ilyen fermentorokban végrehajtható a tenyésztés és a sterilizálás is. Az F-15078 vegyületet üzemi méretben is előnyösen ilyen korsó vagy tartály alakú fermentorban hajtjuk végre, különösen előnyösen ugyanabban a berendezésben.

A SANK 13899 törzs tenyésztése esetén az F-15078 vegyület maximális mennyiségét a beajtástól számítva 144 óra és 192 óra elteltével kapjuk.

A fermentáció termékében jelenlévő F-15078 vegyületet extrahálhatjuk és tisztíthatjuk az e célra jól ismert módszerekkel, kihasználva az F-15078 fiziko-kémiai tulajdonságait. Ezt az elkülönítést végrehajthatjuk magából a fermentáció termékéből, a fermentáció termékének például diatómafüldön végzett szűrése útján kapott szűrletből vagy a fermentáció termékének centrifugálással végzett feldolgozása útján kapott felülúszó fázisból és/vagy az említett centrifugálás vagy szűrés során kapott micéliumból.

A szűrletben vagy a felülúszó fázisban jelenlévő F-15078 vegyület extrahálható semleges pH-értéken vízzel nem elegyedő oldószerrel, például etilacetáttal, kloroformmal, etilénkloriddal, metilénkloriddal vagy butanollal, illetve ezek közül kettő vagy több elegyével. A szűrletet vagy a felülúszó fázist felvihetjük egy olyan oszlopra, amely például aktív szénnel vagy Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4 (a Rohm and Haas Co., Ltd. amerikai egyesült államokbeli cég termékei), Diaion HP-10, Diaion HP-20, Diaion CHP-20, Diaion HP-50, Sepabeads SP-207 (a Mitsubishi

Chemical Co., Ltd. japán cég termékei) márkanevű gyantával van töltve, majd az adszorbeálódott F-15078 vegyületet eluálhatjuk például metanol és víz, aceton és víz vagy butanol és víz elegyével, illetve az oszlopból eltávolíthatjuk az egyéb komponenseket.

A micéliumban jelenlévő F-15078 vegyület extrahálható 50-90 % szerves oldószert tartalmazó vizes acetonnal vagy vizes metanollal. Az extraktumot ezután diatómaföldön szűrjük, majd a szűrletből az említett szerves oldószert eltávolítjuk. Az F-15078 vegyületet ugyanúgy tisztítjuk, mint a fermentáció termékéből kapott szűrlet vagy felülúszó esetében említett módon.

A tenyésztés után a fermentáció termékében jelenlévő F-15078 vegyületet extrahálhatjuk továbbá megfelelő mennyiségű aceton vagy metanol adagolása útján, előnyösen az oldószerből a fermentáció termékére vonatkoztatva 50 térfogat%-ot használva. Az extraktumot ezután diatómaföldön szűrjük, majd a szűrletből az F-15078 vegyületet tisztítással elkülönítjük ugyanúgy, mint a fermentáció termékéből kapott szűrletből vagy felülúszó fázisból.

Az így kapott céltermék tovább tisztítható megosztásos oszlopkromatografálással, e célra Toyopearl HW-40F TSK gélt (a Toso K.K. japán cég terméke) vagy Sephadex LH-20 gyantát (az Amersham Pharmacia Co., Ltd. terméke) használva; vagy pedig fordított fázisú oszlopkromatografálást alkalmazva, gyantaként a Nacalai Tesque K.K. cég Cosmosil 140C18 márkanevű termékét használva. Kívánt esetben az elkülönített célvegyület még tovább tisztítható nagy felbontóképességű folyadék-kromatografálással (a továbbiakban ezt HPLC rövidítés alatt említjük), fordított fázisú oszlopot, például a Showa Denko K. K. japán cég Shodex Asahipak C8P50-4E, az YMC K.K. japán cég YMCPak ODS-AM vagy a Shiseido K. K. japán cég Capcellpak UG120 jelölésű oszlopát használva.

Az F-15078 vegyület elkülönítését végrehajtjuk a fentiekben ismerte-

tett egyetlen extrakciós vagy tisztítási módszerrel, vagy a fentiekben felsorolt egyes extrakciós és tisztítási módszerek megfelelő kombinálásával, illetve kívánt esetben ugyanezen ismertetett extrakciós és purifikációs módszerek ismétlésével.

Az F-15078 vegyületet termelő törzs fermentációjának folyamata, továbbá az F-15078A vagy F-15078B vegyület tisztítása a következő 1. és 2. módszerekkel figyelhető meg.

1. Analitikai módszer HPLC felhasználásával

A HPLC-módszerek jellegét illetően nincs különösebb megkötés, feltéve, hogy HPLC kerül alkalmazásra. Így például a következő HPLC-körülményeket alkalmazhatjuk.

Oszlop: Shodex Asahipak C8P 50 4E (4,6 mm átmérőjű és 250 mm hosszú, a Showa Denko K.K. japán cég terméke).

Mobil fázis: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat
13 : 7 térfogatarányú elegye

Átfolyási sebesség: 0,7 ml/perc

Detektálás hullámhossza: λ 210 nm

F-156078A retenciós ideje: 10,20 perc

F-156078B retenciós ideje: 9,05 perc.

2. Antifungális aktivitás mérési módszere

Az antifungális aktivitás kiértékelésének módszerét illetően nincs különösebb megkötés, feltéve, hogy az adott módszer alkalmas az antifungális aktivitás meghatározására. Így például hasznosíthatjuk Yamaguchi, H. és munkatársai által a J. Med. Mycol. 36, 61 (1995) szakirodalmi helyen ismertetett, a tenyészlé hígításán alapuló módszert.

A jelen találmány (1) - (4) pontok szerinti vegyületei antifungális aktivitásúak, így felhasználhatók gombás fertőző megbetegedések terápiás vagy profilaktikus jellegű kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállításánál a humán és az állatgyógyászatban.

A találmányt közelebbről a következő példákkal, kísérleti példákkal és készítmény-előállítási példákkal kívánjuk megvilágítani anélkül, hogy a találmány oltalmi körét ezekre a példákra korlátoznánk.

1. példa

F-15078A(1) előállítása [SANK 13899 törzs(1) tenyésztése]

Három 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban az 1. táblázatban megadott komponenseket tartalmazó táptalajból 100-100 ml-t bemérünk, majd 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizálást végzünk, ezt követően pedig mindegyik lombikot beojtjuk egy ojtókacsnyi SANK 13899 törzsszel. Az előbb említett táptalajt ojtás előtti táptalajnak nevezzük. Az Erlenmeyer-lombikokat ezután 23 °C hőmérsékleten 5 napon át inkubáljuk olyan forgó-rázatóberendezésben, amelynek fordulatszáma 210/perc, illetve a rázás hossza 7 cm. Ezután az így kapott ojtás előtti előtenyészetű oldattal 5 %-os végső koncentrációban beojtást végzünk kilenc 2 l-es Erlenmeyer-lombikba előzetesen bemért, illetve az ojtás előtti táptalajjal azonos módon kezelt táptalajból 400-400 ml-t tartalmazó, a továbbiakban ojtási táptalajként nevezett táptalajon. Az így kapott tenyészetet ezután 23 °C hőmérsékleten két napon át az előzőekben említett paraméterek mellett működtetett forgó-rázató berendezésben tenyésztjük. Az így kapott ojtótenyészet-oldattal 5 %-os végső koncentrációban beojtunk négy 30 l-es korsó-alakú fermentorban a 2. táblázatban felsorolt komponenseket tartalmazó (1) jelölésű tenyésztési táptalajból 15-15 l-t, mely tenyésztési táptalajt előzetesen 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizáltunk. Ezután 23 °C hőmérsékleten 7 napon át inkubálást végzünk 100 fordulat/perc és 420 fordulat/perc közötti sebességű keverés, továbbá olyan levegőztetés mellett, amelynél a levegőztetési arány 1 térfogat/térfogat (vvm), illetve a táptalajban az oldott oxigén koncentrációja 5,0 p.p.m.

1. táblázat**Ojtás előtti és ojtási táptalaj komponensei**

glicerín	30 g
glükóz	30 g
oldható keményítő	20 g
szójababliszt	10 g
zselatin	2,5 g
a Difco cég által szállított élesztő- extraktum	2,5 g
ammóniumnitrát	2,5 g
a Nihon Yushi K.K. cég által Nissan Disfoam CB-442 márkanéven gyártott habzásgátló	0,1 ml
csapvíz	1000 ml

(a pH nem került beállításra)

2. táblázat**Az (1) jelölésű tenyésztési táptalaj komponensei**

a Difco cég által szállított dextrin	10 g
glicerín	20 g
glükóz	30 g
a Difco cég által szállított maláta-extraktum	10 g
a Difco cég által szállított élesztő-extraktum	2 g
a Difco cég által szállított tripton	1 g
ammóniumnitrát	1 g
nátriumnitrát	1 g
káliumdihidrogénfoszfát	1 g
magnéziumszulfát-heptahidrát	1 g

a Nihon Yushi K.K. japán cég által
Nissan Disfoam CB-442 márka-
néven szállított habzágató 0,1 ml

csapvíz 1000 ml

(a pH nem került beállításra).

Az F-15078A(1) izolálása

A fentiekben ismertetett módon előállított 60 l tenyészcsofathoz 60 l acetont és 3 kg, a Celite Corporation által szállított 545 márkanévű szűrési segédanyagot adunk. A kapott szuszpenziót szűrőprésses szűrésnek vetjük alá, majd a szűrletet megosztjuk 50 l etilacetáttal. A 49 l térfogatú extraktumot 50 l telített vizes nátriumklorid-oldattal, majd 50 l vízzel mossuk, 5 kg vízmentes nátriumszulfát fölött egy órán át szárítjuk és ezt követően szűrőprésses szűrésnek vetjük alá a nátriumszulfát eltávolítása céljából. A szűrletet ezután vákuum alatt szárazra pároljuk, majd a 95,9 g mennyiségben kapott olajat feloldjuk metanol és 0,04 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 8:2 térfogatarányú elegyéből 100 ml-ben. Az így kapott oldatot felvisszük a Toso K.K. japán cég Toyopearl HW-40F töltetét tartalmazó, 22 l térfogatú oszlopra, amelyet metanol és 0,04 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 8:2 térfogatarányú elegyével ekvilibráltunk, majd az oszlopot ugyanezzel az oldószerelleggyel eluáljuk. 500 ml-es frakciókat szedünk, az F-15078A a 13-25. sorszámú frakciókból (6,5 l össztérfogat) különíthető el. Ezt a 6,5 l térfogatú eluátumot vákuum alatt 2 l-re betöményítjük, majd pH-értékét 6,25 N vizes nátriumhidroxid-oldattal 7-re beállítjuk. Ezután 3,1 l etilacetáttal extrahálást végzünk, majd az extraktumot 3 l telített vizes nátriumklorid-oldattal mossuk, vízmentes nátriumszulfát fölött szárítjuk és vákuum alatt szárazra pároljuk. Az ekkor 66,5 g mennyiségben kapott olajat feloldjuk metanol és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 8:2 térfogatarányú elegyéből 160 ml-ben. Az így kapott oldatot felvisszük a Nacalai Tesques K.K. japán cég Cosmocil 140C18 töltetét tar-

talmazó, 3 l térfogatú oszlopra, amelyet acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyével ekvibráltunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 10 l-rel az oszlopot mossuk, ezután pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyével eluáljuk. 2 l-es frakciókat szedünk, az F-15078A a 2. sorszámú frakcióban eluálódik. Ezt a 2 l térfogatú frakciót vákuum alatt 800 ml-re bepároljuk, majd a koncentrátum pH-értékét 6,25 N vizes nátriumhidroxid-oldattal 7-re beállítjuk. Ezután 1 l etilacetáttal extrahálást végzünk, majd a kapott extraktumot mossuk, szárítjuk és vákuum alatt szárazra pároljuk. Ekkor 234,3 mg mennyiségben a nyers célvegyületet kapjuk. Ezt a nyers terméket HPLC alkalmazásával az alábbiakban az (1) alatt megadott körülmények között tisztítjuk, amikor F-15078A vegyületet tartalmazó frakciót kapunk.

HPLC körülményei (1)

Oszlop: az YMC K.K. japán cég YMCPak ODS-AM oszlopa, amelynek 30 mm az átmérője és 300 mm a hossza;

oldószer: acetonitril és 1 %-os vizes trietilaminfoszfát-oldat (pH-értéke 6,0) 3:1 térfogatarányú elegye;

átfolyási sebesség: 10,4 ml/perc;

hőmérséklet: szobahőmérséklet;

retenciós idő: 77-98 perc.

Az F-15078A vegyületet tartalmazó frakciót ezután sómentesítjük a korábbiakban ismertetett módon etilacetáttal végzett extrahálás, majd vákuum alatt szárazra párlás útján, amikor 34,1 mg mennyiségben az F-15078A vegyületet kapjuk.

2. példa

F-15078A (2) előállítás [SANK 13899 törzs(2) tenyésztése]

Hat 2000 ml-es Erlenmeyer-lombikban az 1. táblázatban megadott komponenseket tartalmazó ojtás előtti táptalajból 500-500 ml-t bemérünk,

majd 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizálást végzünk, ezt követően pedig mindegyik lombikot beojtjuk egy ojtókacsnyi SANK 13899 törzzsel. Az Erlenmeyer-lombikokat ezután 23 °C hőmérsékleten 6 napon át inkubáljuk olyan forgó-rázatóberendezésben, amelynek fordulatszáma 210/perc, illetve a rázatás hossza 7 cm. Ezután az így kapott ojtás előtti előtenyészetű oldattal 5 %-os végső koncentrációban beojtást végzünk két olyan 60 literes fermentortartályban, amelyek 30 – 30 liter, az 1. táblázatban megadott összetételű, előzetesen 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizált táptalajt tartalmaznak. Ezután 23 °C hőmérsékleten 2 napon át inkubálást végzünk 100 fordulat/perc sebességű keverés, továbbá olyan levegőztetés mellett, amelynél a levegőztetési arány 1 térfogat/térfogat (vvm), illetve a táptalajban az oldott oxigén koncentrációja 5,0 p.p.m. Az így kapott ojtótenyészetrel 5 térfogat%-os végső koncentrációban 600 literes fermentortartályban beojtunk 300 liter, a 3. táblázatban megadott összetételű (2) táptalajt, amelyet előzetesen 121 °C hőmérsékleten 30 percen át tartó hőkezeléssel sterilizáltunk. Ezután 23 °C hőmérsékleten 7 napon át inkubálást végzünk 83 fordulat/perc és 240 fordulat/perc közötti sebességű keverés, továbbá olyan levegőztetés mellett, amelynél a levegőztetési arány 1 térfogat/térfogat (vvm), illetve a táptalajban az oldott oxigén koncentrációja 5,0 p.p.m.

3. táblázat

(2) táptalaj komponensei

glükóz	80 g
a Difco cég által szállított malátaextraktum	20 g
a Difco cég által szállított élesztőextraktum	2 g
a Difco cég által szállított tripton	10 g
ammóniumnitrát	1 g

nátriumnitrát	1 g
káliumdihidrogénfoszfát	1 g
magnéziumsulfát-heptahidrát	1 g
a Nihon Yushi K.K. cég által Nissan Disfoam CB-442 márkaneven gyártott habzásgátló	0,1 ml
csepvíz	1000 ml

(a pH nem került beállításra)

Az F-15078A(2) izolálása

A fentiekben ismertetett módon előállított 370 l tenyészcsofathoz 15 kg, a Celite Corporation által szállított 545 márkanevű szűrési segédanyagot adunk. A kapott szuszpenziót szűrőprésses szűrésnek vetjük alá, majd a szűrőleányhez víz és metanol 1 : 1 térfogatarányú elegyéből 400 litert adunk. A kapott szuszpenziót keverjük, majd pH-értékét 6 N sósav-oldattal 2-re beállítjuk. Az így kapott szuszpenziót szűrőprésses szűrésnek vetjük alá. Az egyesített szűrlet össztérfogata 465 liter. A szűrletből 270 litert felviszünk a Nacalai Tesques K.K. japán cég Cosmocil 140 C18-OPN töltetét tartalmazó, 30 l térfogatú oszlopra, amelyet metanol és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 1:1 térfogatarányú elegyével ekvibráltunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 270 l-rel, ezt követően pedig acetonnitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyéből 100 l-rel az oszlopot mossuk, ezután pedig acetonnitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyével eluáljuk. Eluátumként először egy 15 l-es frakciót (1. frakció) különítünk el, majd további öt 10 – 10 l-es frakciót (2-6. frakciók). Az F-15078A a 2-4. sor-számú frakcióban eluálódik (összesen 30 l).

A korábban említett 465 l szűrletből a megmaradt 195 liter szűrletet felviszük a Nacalai Tesques K.K. japán cég Cosmocil 140 C18-OPN töltetét tartalmazó, 30 l térfogatú oszlopra, amelyet metanol és 0,05 %-os

vizes trifluorecetsav-oldat 1:1 térfogatarányú elegyével ekvibráltunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 200 l-rel, ezt követően pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyből 100 l-rel az oszlopot mossuk, ezután pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyével eluáljuk. Eluátumként először egy 10 l-es első frakciót, egy 5 l-es második frakciót, két további 15 – 15 literes frakciót (3. és 4. frakció) és egy 10 l-es ötödik frakciót különítünk el. Az F-15078A a 3 - 5. sorszámú frakcióban eluálódik (összesen 40 l).

A fenti két műveletsor eredményeként kapott, F-15078A vegyületet tartalmazó, összesen 70 l térfogatú frakció pH-értékét 6 N vizes nátrium-hidroxid-oldattal 7-re beállítjuk. Ezután 50 l etilacetáttal extrahálást végzünk, majd a kapott extraktumot telített vizes nátriumklorid-oldattal mossuk, vízmentes nátriumszulfát felett szárítjuk és vákuum alatt szárazra pároljuk. Ekkor 32,3 g mennyiségben olajat kapunk.

Ezt az olajat feloldjuk 200 ml metanolban, majd a kapott oldatból 50 ml-t HPLC-nek vetünk alá az alábbi (2) körülmények között. A visszamaradt 150 ml metanolos oldatot öt részre osztjuk, majd mindegyik 30 ml-es adagot ugyancsak HPLC-nek vetünk alá az alábbi (2) körülmények között. Így összesen 26 l mennyiségben kapunk F-15078A vegyületet tartalmazó egyesített frakciót. Ehhez 10 l vizet adunk, majd 10 l etilacetáttal extrahálást végzünk. A kapott extraktumot mossuk, szárítjuk és vákuumban szárazra pároljuk, amikor 7,78 g mennyiségben nyers terméket kapunk. Ebből 326 mg-ot feloldunk 2 ml metanolban, majd a kapott oldatot tíz 200 mikroliteres frakcióra osztjuk. Mindegyik frakciót HPLC alkalmazásával az alábbiakban a (3) alatt megadott körülmények között tisztítjuk, majd az előállítani kívánt terméket tartalmazó frakciókat összeöntjük, betöményítjük és liofilizáljuk, amikor 275 mg mennyiségben F-15078A vegyületet kapunk.

HPLC körülményei (2)

Oszlop: az YMC K.K. japán cég YMCPak ODS-AM oszlopa, amelynek 100 mm az átmérője és 500 mm a hossza;

oldószer: acetonitril és 1 %-os vizes trietilaminfoszfát-oldat (pH-értéke 6,0) 3:1 térfogatarányú elegye;

detektálási hullámhossz: 210 nm-es ibolyántúli fény

átfolyási sebesség: 240 ml/perc;

hőmérséklet: szobahőmérséklet;

retenciós idő: 64 perc.

HPLC körülményei (3)

oszlop: a Showa Denko K.K. japán cég Shodex Asahipak C8P 90 2F oszlopa, amelynek 20 mm az átmérője és 250 mm a hossza;

oldószer: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat 6: 4 térfogatarányú elegye;

detektálási hullámhossz: 210 nm-es ibolyántúli fény

átfolyási sebesség: 14 ml/perc;

hőmérséklet: szobahőmérséklet;

retenciós idő: 19,2 perc.

3. példa**F-15078B előállítása [SANK 13899 törzs(3) tenyésztése]**

Hat 2000 ml-es Erlenmeyer-lombikban az 1. táblázatban megadott komponenseket tartalmazó ojtás előtti táptalajból 500-500 ml-t bemérünk, majd 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizálást végzünk, ezt követően pedig mindegyik lombikot beojtjuk egy ojtókacsnyi SANK 13899 törzsszel. Az Erlenmeyer-lombikokat ezután 23 °C hőmérsékleten 6 napon át inkubáljuk olyan forgó-rázatóberendezésben, amelynek fordulatszáma 210/perc, illetve a rázatás hossza 7 cm. Ezután az így kapott ojtás előtti előtenyészteti oldattal 5 %-os végső koncentrációban beojtást végzünk két olyan 60 literes fermentortartályban, amelyek 30 – 30 liter, az 1. táblázat-

ban megadott összetételű, előzetesen 121 °C hőmérsékleten 30 percen át sterilizált táptalajt tartalmaznak. Ezután 23 °C hőmérsékleten 2 napon át inkubálást végzünk 100 fordulat/perc sebességű keverés, továbbá olyan levegőztetés mellett, amelynél a levegőztetési arány 1 térfogat/térfogat (vvm), illetve a táptalajban az oldott oxigén koncentrációja 5,0 p.p.m. Az így kapott ojtótenyésztéssel 5 térfogat%-os végső koncentrációban 600 literes fermentortartályban beojtunk 300 liter, a 2. példa 3. táblázatában megadott összetételű (2) táptalajt, amelyet előzetesen 121 °C hőmérsékleten 30 percen át tartó hőkezeléssel sterilizáltunk. Ezután 23 °C hőmérsékleten 7 napon át inkubálást végzünk 83 fordulat/perc és 240 fordulat/perc közötti sebességű keverés, továbbá olyan levegőztetés mellett, amelynél a levegőztetési arány 1 térfogat/térfogat (vvm), illetve a táptalajban az oldott oxigén koncentrációja 5,0 p.p.m.

F-15078B izolálása

A fentiekben ismertetett módon előállított 370 l tenyésztoldathoz 15 kg, a Celite Corporation által szállított 545 márkanevű szűrési segédanyagot adunk. A kapott szuszpenziót szűrőprésses szűrésnek vetjük alá, majd a szűrőleplenyhez víz és metanol 1 : 1 térfogatarányú elegyből 400 litert adunk. A kapott szuszpenziót keverjük, majd pH-értékét 6 N sósavoldattal 2-re beállítjuk. Az így kapott szuszpenziót szűrőprésses szűrésnek vetjük alá. Az egyesített szűrlet össztérfogata 465 liter. A szűrletből 270 litert felviszünk a Nacalai Tesques K.K. japán cég Cosmocil 140 C18-OPN töltetét tartalmazó, 30 l térfogatú oszlopra, amelyet metanol és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 1:1 térfogatarányú elegyével ekvilibráltunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 270 l-rel, ezt követően pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyből 100 l-rel az oszlopot mossuk, ezután pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyével eluáljuk. Eluátumként először egy 15 l-es frakciót (1. frakció) különítünk el, majd

további öt 10 – 10 l-es frakciót (2-6. frakciók). Az F-15078B a 2 - 4. sorszámú frakcióban eluálódik (összesen 30 l).

A korábban említett 465 l szűrletből a megmaradt 195 liter szűrletet felvisszük a Nacalai Tesques K.K. japán cég Cosmocil 140 C18-OPN töltetét tartalmazó, 30 l térfogatú oszlopra, amelyet metanol és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 1:1 térfogatarányú elegyével ekvilibráltunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 200 l-rel, ezt követően pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyből 100 l-rel az oszlopot mossuk, ezután pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyével eluáljuk. Eluátumként először egy 10 l-es első frakciót, egy 5 l-es második frakciót, két további 15 – 15 literes frakciót (3. és 4. frakció) és egy 10 l-es ötödik frakciót különítünk el. Az F-15078B a 3 - 5. sorszámú frakcióban eluálódik (összesen 40 l).

A fenti két műveletsor eredményeként kapott, F-15078B vegyületet tartalmazó, összesen 70 l térfogatú frakció pH-értékét 6 N vizes nátrium-hidroxid-oldattal 7-re beállítjuk. Ezután 50 l etilacetáttal extrahálást végzünk, majd a kapott extraktumot 50 l telített vizes nátriumklorid-oldattal mossuk, vízmentes nátriumszulfát felett szárítjuk és vákuum alatt szárazra pároljuk. Ekkor 32,3 g mennyiségben olajat kapunk. Ezt az olajat feloldjuk 200 ml metanolban, majd a kapott oldatból 50 ml-t HPLC-nek vetünk alá a 2. példában ismertetett (2) körülmények között. A visszamaradt 150 ml metanolos oldatot öt részre osztjuk, majd mindegyik 30 ml-es adagot ugyancsak HPLC-nek vetünk alá a 2. példában megadott (2) körülmények között. Így összesen 26 l mennyiségben kapunk F-15078B vegyületet tartalmazó egyesített frakciót. Ehhez 10 l vizet adunk, majd 10 l etilacetáttal extrahálást végzünk. A kapott extraktumot mossuk, szárítjuk és vákuumban szárazra pároljuk, amikor 7,78 g mennyiségben nyers terméket kapunk.

Ebből a nyers termékből 21,0 g-ot feloldunk 5 ml metanolban, majd a kapott oldathoz hozzáadunk 5 g, a Nacalai Tesque K.K. japán cég által Cosmocil 140C18-OPN márkanéven gyártott gyantát. Ezután az oldószert elpárologtatjuk, majd a maradékot beágyazzuk 170 ml térfogatú, Cosmocil 140C18-OPN márkanéven gyártott gyantát tartalmazó oszlopba. Az oszlopot aceton és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 4:6 térfogatarányú elegyével ekvilibráljunk, majd ugyanebből az oldószerelegyből 300 ml-rel, mossuk, ezután először pedig acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 6:4 térfogatarányú elegyből 300 ml-rel, ezt követően acetonitril és 0,05 %-os vizes trifluorecetsav-oldat 9:1 térfogatarányú elegyével eluáljuk. Eluátumként 10 ml-es frakciókat szedünk. Az F-15078B a 64 - 72. sorszámú frakcióban eluálódik (összesen 90 ml). Ezeket a frakciókat összeöntjük, vákuumban bepároljuk és liofilizáljuk. Így 109 mg mennyiségben sárgásfehér port kapunk. 100 mg por 1 ml metanollal készült oldatát öt 200 mikroliteres frakcióra osztjuk, majd mindegyiket HPLC alkalmazásával tisztításnak vetjük alá az alábbi (4) körülmények között. Az előállítani kívánt terméket tartalmazó frakciókat ezután összeöntjük, bepároljuk és liofilizáljuk. Így 69,5 mg mennyiségben fehér porként F-15078B vegyületet kapunk.

HPLC körülményei (4)

Oszlop: a Showa Denko K.K. japán cég Shodex Asahipak C8P 90 2F oszlopa, amelynek 20 mm az átmérője és 250 mm a hossza;

oldószer: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat

6: 4 térfogatarányú elegye;

detektálási hullámhossz: 210 nm-es ibolyántúli fény

átfolyási sebesség: 14 ml/perc;

hőmérséklet: szobahőmérséklet;

retenciós idő: 17,8 perc.

1. kísérleti példa**F-15078A and B vegyületek antifungális aktivitása**

Az F-15078A és B vegyületek antifungális aktivitását, azaz e vegyületeknek mindegyik vizsgált kísérleti törzzsel szemben mutatott minimális gátlási koncentrációját (angolszász rövidítéssel: MIC) Yamaguchi, H. és munkatársai által a J. Med. Mycol., 36, 61 (1995) szakirodalmi helyen leírt, úgynevezett táptalaj-hígítási módszerrel határozzuk meg olyan mikrotiter-lemezen, amely 96 lyukú. A meghatározáshoz RPMI 1640 jelölésű táptalajt hasznosítunk, amely 0,165 M mennyiségben a Sigma Company cég által szállított 3-[N-morfolino]propánszulfonsavat tartalmaz puffer-oldatként. A kapott eredményeket a 4. táblázatban adjuk meg.

4. táblázat**F-15078A és B vegyületek antifungális aktivitása**

Kísérleti törzs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	F-15078 A	F-15078B
Candida albicans ATCC 90028	2,5	>50
Aspergillus fumigatus IAM 2034	1,3	>50
Cryptococcus neoformans IAM 4772	0,31	1,56

Miként a 4. táblázatból látható, az F-15078A és B vegyületek antifungális aktivitásúak.

1. készítmény-előállítási példa - orális beadásra alkalmas kapszula

F-15078A	30 mg
laktóz	170 mg
kukoricakeményítő	150 mg
magnéziumsztearát	2 mg
összesen	352 mg

A felsorolt komponenseket por formájában összekeverjük, majd 30 mesh lyukú szitán átszítáljuk. Az így kapott porkeveréket zselatin-kapszulákba töltjük.

A találmány szerinti vegyületek antifungális aktivitásúak, így felhasználhatók gombás fertőző megbetegedések megelőzésére vagy kezelésére alkalmas gyógyászati készítmények előállítására.

Ami az ilyen gyógyászati készítmények felhasználását illeti, a beadás módját illetően nincs korlátozás, illetve a beadás módját meghatározhatja a gyógyászati készítmény jellege, valamint a beteg kora, neme, illetve a betegség és annak szimptomái.

A tablettákat, pilulákat, porokat, granulákat, szirupokat, oldatokat, szuszpenziókat, emulziókat és kapszulákat orálisan adjuk be. Intravénás, intramuszkuláris, szubkután, intrakután és/vagy intraperitoneális injektálás útján beadható a hatóanyag maga, a hatóanyagot, továbbá például glükózt és aminosavat tartalmazó oldat vagy a hatóanyagot, továbbá például zsírsavak polioxietilén-szorbitán-észtereit tartalmazó emulzió. A kúpokat a végbélbe helyezzük beadás céljából.

Az előzőekben említett gyógyászati készítmények előállíthatók a szakirodalomból e célra jól ismert módszerekkel a hatóanyagból és ismert, a gyógyszergyártásban szokásosan használt hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokból, így például gyógyszerkikészítési segédanyagokból, kötőanyagokból, szétesést elősegítő anyagokból, csúsztatókból, oldószerekből, ízesítőszerekből és bevonóanyagokból.

A tabletták előállításához hasznosíthatunk többek között gyógyszerkikészítési segédanyagokat, például laktózt, szacharózt, nátriumkloridot, glükózt, karbamidot, keményítőt, kalciumkarbonátot, kaolint, kristályos cellulózt és kovasavat; kötőanyagokat, például vizet, etanolt, propanolt, egyszerű cukorszirupot, glükóz-oldatokat, keményítő-oldatokat, zselatin-oldatokat, karboximetilcellulózt, sellakot, metilcellulózt, káliumfoszfátot és

polivinilpirrolidont; szétesést elősegítő anyagokat, például szárított keményítőt, nátriumalginátot, por alakú agar-agart, laminarán-port, nátriumhidrogénkarbonátot, kalciumkarbonátot, zsírsavak polioxietilén-szorbitán-észtereit, nátriumlaurilszulfátot, sztearinsav-monoglicerideket, keményítőt és laktózt; szétesést visszaszorító anyagokat, például szacharózt, sztearint, kakaóvaját és hidrogénezett olajokat; abszorpciót elősegítő anyagokat, például kvaterner ammóniumbázisokat és nátriumlaurilszulfátot; nedvesítőszerket, például glicerint és keményítőt; adszorbenseket, például keményítőt, laktózt, kaolint, bentonitot és kolloid kovasavat; és csúsztatókat, például tisztított talkumot, sztearátokat, por alakú borsavat és polietilén-glikolt. Kívánt esetben a tabletták átalakíthatók bevonatos tablettákká, így például cukorbevonatos tablettákká, zselatinnal bevont tablettákká, a gyomorban oldódó bevonattal ellátott tablettákká, filmbevonatos tablettákká, kettős bevonatú tablettákká és többszörös bevonatú tablettákká.

A pilulák előállításához hordozóanyagként és segédanyagként ugyancsak a szakirodalomból e célra jól ismert anyagokat hasznosíthatunk. Az ilyen segédanyagokra példaképpen megemlíthetünk gyógyszer-kikészítési segédanyagokat, például glükózt, laktózt, kakaóvaját, hidrogénezett növényi olajat, kaolint és talkumot; kötőanyagokat, például por alakú agar-agart, por alakú tragakantgyantát, zselatint és etanolt; szétesést elősegítő anyagokat, például laminaránt és agar-agart.

A kúpokhoz ugyancsak a szakirodalomból e célra jól ismert segédanyagok hasznosíthatók. Ilyen segédanyagokként megemlíthetjük a polietilén-glikolt, kakaóvaját, hosszabb szénláncú alkoholokat, hosszabb szénláncú alkoholok észtereit, zselatint és félszintetikus glicerideket.

Ha az injektálásra alkalmazott készítmény oldat, emulzió vagy szuszpenzió, ezeket előnyösen sterilizáljuk, illetve vérrel izotóniásra állítjuk be. Az injektálásra alkalmas oldatok, emulziók és szuszpenziók előállításához hasznosítható hígítóanyagok a szakirodalomból jól ismertek. Az

ilyen hígítóanyagokra példaképpen megemlíthetjük a vizet, etanolt, propilénlikolt, epoxidált izosztearilalkoholt, poliepoxidált izosztearilalkoholt, valamint zsírsavak polioxietilén-szorbitán-észtereit. Az injektálásra alkalmas készítmények például elegendő mennyiségű sót, glükózt vagy glicerint tartalmaznak ahhoz, hogy az oldat, emulzió vagy szuszpenzió a vérrel izotóniás legyen, emellett tartalmazhatnak más segédanyagokat, például szolubilizálószereket, pufferoló ágenseket vagy konzerválószereket.

Ezek a készítmények tartalmazhatnak továbbá kívánt esetben színezékeket, stabilizálószereket, izesítőszereket és édesítőszereket.

A találmány szerinti hatóanyag mennyisége egy ilyen készítményben függ például a készítmény jellegétől és a beadás útjától, általában azonban a készítmény össztömegére vonatkoztatva 1-70 tömeg%, előnyösen 1-30 tömeg%. A találmány szerinti vegyület dózisa számos tényezőtől, így például a beteg betegségétől, tüneteitől, korától és testtömegétől, valamint a beadás módjától és a gyógyászati készítmény jellegétől függ. Felnőtt ember esetén a napi felső dózishatár 20 mg és 2000 mg, illetve az alsó dózishatár 0,001 mg és 0,1 mg közötti. Az előnyös dózistartomány 0,01-200 mg, még előnyösebben 0,1-20 mg.

Egy találmány szerinti vegyületet tartalmazó gyógyszer beadható egyetlen dózisegységként több napon át vagy pedig a napi dózis felosztható olyan célszerű kisebb adózisokra, amelyek egy nap során 1-7 alkalommal adhatók be például a készítmény jellegétől, valamint a beteg állapotától, tüneteitől és testtömegétől függően.

Szabadalmi igénypontok:

1. (I) képletű vegyület és sói.
2. A következőkben ismertetésre kerülő fiziko-kémiai tulajdonságokkal bíró vegyület, valamint ennek sói:
 - 1) jellegzetesség: bázikus, zsírban oldható por
 - 2) összegképlet: $C_{55}H_{98}N_8O_{14}$
 - 3) molekulatömeg: 1094 (FAB-MS módszer)
 - 4) nagy felbontóképességű FAB-MS $[M+H]^+$
a $C_{55}H_{98}N_8O_{14}$ összegképletre számítva: 1095,7281
talált: 1095,7365
 - 5) ibolyántúli abszorpciós spektrum: véges abszorpció
 - 6) infravörös abszorpciós spektrum: (KBr-szemcse, cm^{-1}): 3434, 3335, 2962, 2937, 2875, 2806, 1750, 1684, 1641, 1509, 1469, 1412, 1371, 1314, 1294, 1271, 1204, 1156, 1128, 1074, 1020
 - 7) optikai forgatóképesség: $[\alpha]_D^{25} -120^\circ$ (c = 1.0, metanol)
 - 8) 1H -NMR-spektrum [$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán]: 0,78 (3H), 0,79 (3H), 0,80 (3H), 0,82 (3H), 0,87 (3H), 0,88 (1H), 0,92 (3H), 0,93 (3H), 0,94 (3H), 0,96 (3H), 0,97 (3H), 0,98 (3H), 1,01 (3H), 1,02 (3H), 1,03 (3H), 1,06 (3H), 1,21 (1H), 1,41 (3H), 1,41 (1H), 1,48 (1H), 1,48 (1H), 1,49 (1H), 1,52 (3H), 1,55 (1H), 1,65 (1H), 1,66 (1H), 1,70 (2H), 1,73 (1H), 1,81 (1H), 1,87 (1H), 2,28 (1H), 2,31 (1H), 2,37 (1H), 2,48 (3H), 2,89 (3H), 2,94 (3H), 2,96 (1H), 3,29 (3H), 3,56 (1H), 4,06 (1H), 4,14 (1H), 4,77 (1H), 4,78 (1H), 4,84 (1H), 4,91 (1H), 4,96 (1H), 5,21 (1H), 5,25 (1H), 5,53 (1H), 6,39 (1H), 7,83 (1H), 7,94 (1H), 8,28 (1H)
 - 9) ^{13}C -NMRspektrum [$CDCl_3$, 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán): 10,9(q), 11,9(q), 15,0(q), 15,1(q), 16,0(q), 16,6(q), 17,4(q), 18,3(q), 18,6(q), 18,7(q), 19,1(q), 21,0(q), 21,4(q), 22,1(q),

23,1(q), 23,51(q), 23,54(q), 24,2(t), 24,6(d), 24,8(d), 25,4(d), 25,5(t), 27,7(d), 29,5(q), 29,8(d), 30,2(q), 36,1(q), 36,5(t), 37,7(t), 38,3(d), 38,4(d), 39,7(t), 40,9(q), 46,2(d), 51,8(d), 53,1(d), 54,7(d), 55,1(d), 63,9(d), 64,7(d), 68,1(d), 70,1(d), 73,4(d), 74,3(d), 77,1(d), 169,03(s), 169,04(s), 169,6(s), 169,8(s), 169,9(s), 170,3(s), 172,0(s), 173,4(s), 173,8(s), 174,0(s)

10) nagy felbontóképességű folyadékkromatografálás:

oszlop: Shodex Asahipak C8P 50 4E (4,6 mm átmérőjű és 250 mm hosszú, a Showa Denko K.K. japán cég terméke)

mobil fázis: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat

13 : 7 térfogatarányú elegye

átfolyási sebesség: 0,7 ml/perc

detektálás hullámhossza: λ 210 nm

retenciós idő: 10,20 perc

11) oldékonyság: oldható dimetilszulfoxidban, metanolban és kloroformban

12) aminosav-analízis: a hidrolizátumban treonin, alanin és izoleucin mutatható ki.

3. (II) képletű vegyület és sói.

4. A következőkben ismertetésre kerülő fiziko-kémiai tulajdonságokkal bíró vegyület, valamint ennek sói:

1) jellegzetesség: semleges, zsírban oldható por

2) összegképlet: $C_{57}H_{100}N_8O_{15}$

3) molekulatömeg: 1136 (FAB-MS módszer)

4) nagy felbontóképességű FAB-MS $[M+H]^+$

a $C_{57}H_{101}N_8O_{15}$ összegképletre számítva: 1137,7387

talált: 1137,7410

5) ibolyántúli abszorpciós spektrum: véges abszorpció

6) infravörös abszorpciós spektrum: (KBr-szemcse, cm^{-1}): 3433, 3333, 2963, 2937, 2875, 1751, 1686, 1642, 1516, 1469, 1409, 1388, 1372, 1311, 1292, 1272, 1201, 1156, 1128, 1074, 1017

7) optikai forgatóképesség: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -131^{\circ}$ ($c = 1,0$, metanol)

8) ^1H -NMR-spektrum [CDCl_3 , 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán]: 0,78 (3H), 0,79 (3H), 0,80 (3H), 0,83 (3H), 0,87 (1H), 0,87 (3H), 0,90 (3H), 0,92 (3H), 0,93 (3H), 0,95 (3H), 0,95 (3H), 0,98 (3H), 0,98 (3H), 1,01 (3H), 1,01 (3H), 1,03 (1H), 1,05 (3H), 1,28 (3H), 1,37 (1H), 1,40 (1H), 1,46 (1H), 1,47 (1H), 1,49 (1H), 1,51 (3H), 1,64 (1H), 1,65 (1H), 1,66 (1H), 1,86 (1H), 1,72 (1H), 1,78 (1H), 2,12 (3H), 2,13 (1H), 2,26 (1H), 2,31 (1H), 2,37 (1H), 2,88 (3H), 2,93 (3H), 2,97 (3H), 3,28 (3H), 3,56 (1H), 4,03 (1H), 4,15 (1H), 4,73 (1H), 4,78 (1H), 4,82 (1H), 4,83 (1H), 4,91 (1H), 4,97 (1H), 5,15 (1H), 5,28 (1H), 5,50 (1H), 6,37 (1H), 6,87 (1H), 7,86 (1H), 8,29 (1H)

9) ^{13}C -NMRspektrum [CDCl_3 , 500 MHz, δ (ppm), belső standard: tetrametilszilán): 10,5(q), 10,9(q), 14,9(q), 15,1(q), 15,6(q), 16,6(q), 16,7(q), 18,3(q), 18,6(q), 18,7(q), 19,0(q), 20,8(q), 21,4(q), 22,0(q), 22,1(q), 23,1(q), 23,6(q), 23,6(q), 24,1(t), 24,6(t), 24,7(d), 24,8(d), 25,4(d), 27,7(d), 29,5(q), 29,8(d), 30,2(q), 31,6(d), 31,8(q), 36,1(t), 37,6(t), 38,4(d), 39,6(t), 40,9(q), 46,1(d), 51,8(d), 53,1(d), 54,7(d), 54,7(d), 61,2(d), 63,9(d), 64,6(d), 68,1(d), 73,1(d), 74,3(d), 77,0(d), 168,9(s), 168,9(s), 169,1(s), 169,9(s), 169,9(s), 170,3(s), 170,6(s), 171,7(s), 172,0(s), 173,3(s), 173,8(s)

10) nagy felbontóképességű folyadékkromatografálás:
oszlop: Shodex Asahipak C8P 50 4E (4,6 mm átmérőjű és 250 mm hosszú, a Showa Denko K.K. japán cég terméke)

mobil fázis: acetonitril és 10 mM vizes ammóniumhidrogénkarbonát-oldat

13 : 7 térfogatarányú elegye

átfolyási sebesség: 0,7 ml/perc

detektálás hullámhossza: λ 210 nm

retenció idő: 9,05 perc

11) oldékonyság: oldható dimetilszulfoxidban, metanolban és kloroformban

12) aminosav-analízis: a hidrolizátumban treonin, alanin és izoleucin mutatható ki.

5. Eljárás az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a Phoma-nemzetséghez tartozó, illetve az 1-4 igénypontok bármelyike szerinti vegyületet termelni képes mikroorganizmust fermentálunk, majd a fermentáció termékéből az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet elkülönítjük, és kívánt esetben sót képzünk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Phoma-nemzetségbe tartozó és az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet termelni képes mikroorganizmusként Phoma SANK 13899 (FERM BP-6851 számon deponálva) törzset használunk.

7. Phoma SANK 13899 (FERM BP-6851 számon deponálva) törzs.

8. Terápiás vagy profilaktus kezelésre alkalmas ágens, előnyösen gombás fertőzőes megbetegedésekhez, amely hatóanyagként az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet tartalmaz.

9. Gyógyászati készítmény, amely hatóanyagként az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet tartalmaz.

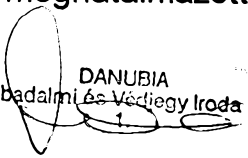
10. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyület gyógyszerhatóanyagként való alkalmazásra.

11. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyület gombás fertőzőes megbetegedéseknél gyógyszerhatóanyagként való alkalmazásra.

12. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása gyógyászati készítmények előállítására.

13. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása gombás fertőzések megbetegedések terápiás vagy profilaktikus jellegű kezelésére az állatgyógyászatban alkalmazható gyógyászati készítmények előállítására.

A bejelentő helyett
a meghatalmazott:


DANUBIA
Szabadalmi és Védjegyi Iroda Kft.

Molnár Imre
szabadalmi ügyvivő

Imre

I. ábra

