

P930025/

56.966/PA

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

"A"

17471

67711

K I V O N A T

Tisztított tetrahidropirimidin-származékok és ezeket
tartalmazó gyógyszerkészítmények

Yeda Research and Development Co. Ltd., REHOVOT,
IZRAEL

A bejelentés napja: 1993. 01. 29.

Elsőbbsége: 1992. 01. 30. (100810),

IZRAEL

A találmány tárgya tisztított tetrahidropirimidin- szár-
mazékok és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények.

Részletesebben a találmány olyan tetrahidropirimidin-
származékokra vonatkozik, melyek a DNS védelmére alkal-
mazhatók a DNS-kötő szerek, kémiai karcinogének és a su-
gárzás károsító hatásával szemben.

jellemező a lra Ø

Bevezet

KÖZZÉTÉTELI

17471

PÉLDÁNY

S.B.G. & K.

Budapesti Nemzetközi

Szabadalmi Iroda

H-1051 Budapest, Dalszínház u. 10.

Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

56.966/PA

"A" 67711

N/SZ06 : A61K 31/505

C12P 17/12 #C12R 1:465

Tisztított tetrahidropirimidin-származékok és ezeket
tartalmazó gyógyszerkészítmények

Yeda Research and Development Co. Ltd., REHOVOT,

IZRAEL

Feltalálók: Aviva Lapidot,

REHOVOT,

Livia Inbar,

REHOVOT,

Yosef Aloni,

REHOVOT,

Edna Ben-Asher,

TEL AVIV,

IZRAEL

A bejelentés napja: 1993. 01. 29.

Elsőbbsége: 1992. 01. 30. (100810),

IZRAEL

A találmány tárgya tisztított tetrahidropirimidin-származékok és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények. Részletebben a találmány olyan tetrahidropirimidin-származékokra vonatkozik, melyek képesek a DNS-t megvédeni a DNS-kötő szerek, kémiai karcinogének és mutagének károsító hatásától és a sugárzástól.

Az aktinomicinek, melyek a rák-kemoterápiában alkalmazott antitumor-antibiotikumok egyik osztályát képezik, megakadályozzák a sejt replikációját oly módon, hogy beékelődnek az egy síkban fekvő DNS-bázispárok közé, és így meggátolják a kettős hélix lecsavarodását, valamint gátolják a transzkripciót, vagyis a DNS-függő RNS-szintézist, mind in vivo, mind in vitro körülmények között. Feltételezik, hogy az in vivo vagy in vitro transzkripció gátlása úgy történik, hogy a kémiai szer a DNS-hez kötődik és gátolja az RNS polimeráz működését az elongáció alatt. A DNS-be beékelődő vegyületekről, úgymint az aktinomicin D-ről és a daunomicinről kimutatták, hogy befolyásolják a DNS másodlagos szerkezetét.

Az aktinomicin D (a továbbiakban ActD), amelyet daktinomicinnak is hívnak, és az adriamicin jól ismert antitumor-antibiotikumok. Azonban nagyfokú toxicitásuk megakadályozza általános alkalmazásukat a rák-kemoterápiában. Feletttébb kívánatos lenne az ActD és más antitumor- és citotoxikus antibiotikumok toxicitásának lecsökkentése, hogy így hatékonyan lehessen alkalmazni őket az antitumor-terápiában.

A szabadalmi bejelentés feltalálói két, korábban nem ismert metabolikus tetrahidropirimidin-származékot találtak, úgymint a 2-metil-4-karboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimi-

dint (a továbbiakban THP(A)-val jelölve) és a 2-metil-4-karboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidint (a továbbiakban THP(B)), melyek egy ActD-termelő gram-pozitív aktinomicetában, a *Streptomyces parvulus*-ban halmozódnak fel intracellulárisan. A fent említett származékokat *in vitro* és *in vivo* NMR-viszogatokkal azonosították, de nem izolálták és tisztították őket [Inbar, L. és A. Lapidot, J. Bacteriol. 170, 4055 (1988a); Inbar, L. és A. Lapidot, J. Biol. Chem. 263, 16014-16022 (1988b); Inbar, L. és A. Lapidot, J. Bacteriol. 173, 7790 (1991)].

A THP(B)-t tiszta formában már korábban kivonták egy extrém halofil baktérium, az *Ectothiorhodospira halochloris* tenyészetéből. A vegyületet "ectoin"-nak nevezték el, és ozmoregulációs funkciót tulajdonítottak neki [E. A. Galinski, H. P. Pfeiffer és H. G. Truper, Eur. J. Biochem. 149, 135 (1985)]. A THP(B).CH₃OH kristályokat vízmentes metanollal kristályosították ki [W. Scuh., H. Puff, E. A. Galinski és H. G. Truper, Z. Naturforsch. 40c, 780-784 (1985)]. Az ectoint, amely egy ciklusos aminosav, később többféle, extrém sótartalmú élőhelyeken előforduló sókedvelő és sótűrő eubaktériumban is megtalálták, úgymint a *Halomonas elongata*, *Deleya halophila*, *Halomonas haemophila*, *Bacterium Ba*, *Vibrio costicola* és *Brevibacterium lineus* baktériumokban. Ezeknek a baktériumoknak a természetes környezete a sós vagy szódás tavak, tengeri sótermelő telepek, tengerparti lagúnák vagy tengervíz, mely helyeket a magas ionkoncentráció és az alacsony vízaktivitás jellemez. A legtöbb halofil eubaktérium, élesztő, alga és gomba az ozmotikus egyensúly fenntartása érdekében szervesetlen ionokat, úgymint K⁺-t, Na⁺-t és Cl⁻-t valamint alacsony molekulatömegű

semleges nem-ionos szerves molekulákat halmoz fel. Az említett szerves molekulák nagyobb osztályait a következő csoportok képviselik: poliolok, cukrok, néhány aminosav, betainek és ectoinek. Ezeket az oldott anyagokat "kompatibilis oldott anyagoknak" nevezik, mert kiegyenlítik az ozmotikus nyomást és, a definíció szerint, kompatibilisek a sejtanycserével. A kompatibilis oldott anyagok, ideértve az ectoint is, az ozmotikus funkció mellett védő hatást fejtenek ki az enzimekre, például melegítéssel, fagyasztással és szárítással szemben. [A. Wolfahrt, J. Severin és E. A. Galinski, J. Gen. Microbiol. 136, 705-712 (1990); R. Regev, I. Peri, H. Gilboa és Y. Avi-Dor, Arch. Biochim. Biophys. 278, 106-112 (1990); P. Peters, E. A. Galinski és H. G. Truper, FEMS Microbiology Letters 71, 157-162 (1990); E. A. Galinski és K. Lippert "General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms" (Rodriquez-Valera szerk.), Plenum Press, New York 351-358 (1991)]. A Takeda Chemical Ind. 3031265 számon publikált japán szabadalmi bejelentésében nyilvánosságra hozták az ectoin kémiai szintézisét, és megemlítik, hogy kémiai ágens, mezőgazdasági ágens vagy szerves elektronikus anyagok köztes termékeként alkalmazható. Egyetlen korábbi szakirodalomból sem került nyilvánosságra a THP(A) és a THP(B) gyógyászati hatása és különösen nem a DNS-károsodás elleni védőhatása.

Feltételezhető, hogy az ActD-termelő baktériumok és a halofil eubaktériumok önvédelmi stratégiája hasonló. Nagyon sok tanulmány foglalkozott azzal a kérdéssel, hogy az antibiotikum-termelő baktériumok hogyan kerülnek el az önpusztítást. Ismeretes, hogy azokban a különböző szervezetekben, amelyek endogén antibio-

tikumot termelnek, ezen antibiotikumok célhelyei rezisztensek, bár sok esetben e rezisztencia alapját még nem teljesen tisztázták. Eddig csak az antibiotikum célhelyeinek néhány önmódosító mechanizmusát jellemezték. Azokban az esetekben, amelyeknél az antibiotikum-szintézis a protein-szintézis része, az önvédelem a riboszómális RNS-célhely specifikus metilációjától függ. Bár az antibiotikumok azon képességét, hogy a cél-DNS-hez kötődjék, eddig még nem sikerült meggátolni.

Az ActD hatásos inhibitora a DNS-dependens RNS szintézisnek. Mivel az *S. parvulus* normálisan a fejlődése során ActD-t termel, RNS-szintézis megy végbe az antibiotikum készítésével egyidőben. Ez csak úgy lehetséges, ha a sejt a transzkripció rendszerére ActD-vel szemben rezisztens.

Hasonlóan, a halofil mikroorganizmusoknál a sejtek lényeges tulajdonsága a transzkripció rendszer magas elektrolit-koncentrációval szembeni rezisztenciája. Mivel a DNS fiziológiás pH-n egy igen erősen töltött polianion, kationok veszik körül, amelyek a proteinek DNS-hez történő kötődésekor kiszorulnak a DNS felszínéről. Az ozmoreguláció-kutatás egy megoldandó feladata annak a kiderítése, hogy in vivo a halofil baktériumokban hogyan pufferolt a DNS-protein kölcsönhatás a sejt ionkoncentrációjában végbemenő fluktuáció ellentétes hatásával szemben. Szükségszerű, hogy a halofil baktériumok valamilyen túlélési stratégiát alkalmazzanak, hogy elkerüljék a makromolekulák magas intracelluláris Na-ion-koncentrációnál bekövetkező szerkezeti rendellenességeit. A *Streptomyces* genus különböző antibiotikum-termelő vonalait izolálták talajból, miután a talaj sótartalmát lokálisan módosították. Feltételezhető, hogy ezekben a mikroorganizmusokban az

antibiotikus és az ozmotikus stresszre adott válasz szabályozásában hasonló mechanizmusok működnek.

Az antibiotikum-termelő organizmusok önvédelmi mechanizmusának tisztázásánál NMR-technikák alkalmazásával intracelluláris változásokat figyeltek meg. A *S. parvulus* ActD kontroll-mechanizmusának tanulmányozásakor azonosították a THP(A)-t és a THP(B)-t, és úgy találták, hogy azok intracellulárisan halmozódnak fel [Inbar, L. és A. Lapidot (1988a)]. Jelöléses kísérletekkel megállapították, hogy a THP-k nem prekursorai az ActD-nek [Inbar, L. és A. Lapidot (1988b)]. A találmány szerint izolált és tisztított THP(A)-ról és THP(B)-ről NMR-rel és röntgen-krisztallográfiával kimutattuk, hogy a THP-k fél-szék konformációjú zwitterionos molekulát képeznek (1. ábra).

A találmány szerint úgy találtuk, hogy a THP(A) és a THP(B) nemcsak a *S. parvulus*-ban van jelen, hanem a közeli rokon ActD-termelő mikroorganizmusokban is, úgymint a *Streptomyces chrysomallus*-ban és a *Streptomyces antibioticus*-ban, amint azt a találmány szerinti ¹³C NMR-kísérletekkel kimutattuk. Ezek a kísérletek világosan feltárták, hogy a THP(A) és a THP(B) ezekben a sejtekben az ActD szintézise alatt termelődik. A THP-k megtalálása néhány ActD-termelő *Streptomyces*-ben, az ActD szintézis alatti viszonylag magas intracelluláris koncentrációjuk, és az, hogy szintézisük kezdetének időpontja megegyezik az ActD szintézisének kezdetével, mind mind azt jelzik, hogy szerepet játszhatnak az ActD-termelő organizmusok önvédelmi mechanizmusában. Továbbá úgy találtuk, hogy egy *in vitro* transzkripció rendszerét alkalmazva [T. R. Kadesch és M. J. Chamberlin, *J. Biol. Chem.* 257, 5286 (1982)], melyben az RNS polimeráz II-t

teljesen gátoltuk ActD-vel, a THP(A) és a THP(B) együttes hatására részlegesen helyreállt az RNS polimeráz aktivitása.

A találmány szerint úgy találtuk, hogy a THP(A) önmagában vagy a THP(A) és a THP(B) kombinálva képes megvédeni a DNS-t a restrikciós enzimek emésztésétől. Továbbá azt is lehetővé teszik, hogy az *E. coli* hatékonyan növekedjen magas sókoncentráció mellett vagy adriamicin jelenlétében, melyek egyébként megakadályoznák az *E. coli* szaporodását. Továbbá a THP(A) és a THP(B) funkció szinergetikus a DNS-ActD komplex kialakulásának meggátlásában. A THP(A)-nak önmagában vagy egy THP(A)-t és THP(B)-t tartalmazó keveréknek van egy közvetlen hatása is az ActD jelenlétében történő transzkripcióra, amelyet egy *in vivo* transzkripciós assay-ben mutatunk be.

A találmány tárgya THP(A)-t és/vagy THP(B)-t és egy gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó gyógyszerkészítmények. Ezek a készítmények sajátosan megvédik a DNS-t a nem-tumoros szövetekben a DNS-kötő szerek károsításától, úgymint a toxikus antitumor-szerektől vagy kémiai karcinogénektől, mutagénektől vagy sugárzástól, úgymint az UV-sugárzástól.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények aktív alkotórészeként a 2-metil-4-karboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin [THP(A)], egy sója, 5-étere vagy 5-észtere és/vagy a 2-metil-4-karboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin [THP(B)] vagy egy sója közül kiválasztott tetrahidropirimidin-származékot és egy gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaznak.

A találmány további tárgya THP(A) lényegében tiszta formában és kristályos formában, valamint a THP(B).2H₂O kristályos forma. Úgy találtuk, hogy a só-állapotú THP(A) és THP(B) kon-

formációja azonos az oldatban felvett konformációjukkal.

A találmány további tárgya egy olyan eljárás, mellyel THP(A) és THP(B) nyerhető lényegében tiszta formában. A THP(A) és a THP(B) racemát alakban vagy optikailag aktív formában létezik. Úgy találtuk, hogy a találmány szerint tisztított természetes terméknek S formája van és biológiailag aktív.

A találmány további tárgyait és előnyeit a találmány leírásában mutatjuk be.

A THP(A) és a THP(B) szintetikus úton állítható elő vagy természetes forrásokból izolálható és tiszta formában szeparálható. Ilyen természetes források a *Streptomyces* fajok, például a *S. parvulus*, *S. chrisomallus* vagy a *S. antibioticus* és mutánsaik Act-termelő mikroorganizmusainak sejtkivonatai. A THP(B) izolálható és tisztítható sóstressz alatt álló sótüdő és sókedvelő baktériumokból, úgymint az *Ectothiorhodospira* nemzetség baktériumaiból, például az *E. halochloris*ből, *E. halophilá*ból és ezek mutánsaiból, vagy a *Halomonadaceae* család heterotróf halofil baktériumaiból. A THP(A) előállítható a *Streptomyces* fajok közül a talajlakó mikroorganizmusokból, például a *S. clavuligerus*ből, *S. griseus*ből és ezek mutánsaiból kismértékű sóstressz mellett.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a THP(A)-t és a THP(B)-t ActD termelő *Streptomyces* törzsből izoláljuk és tisztítjuk egy, az alábbi lépéseket tartalmazó eljárással:

- (a) az említett *Streptomyces* törzs tenyésztése megfelelő tenyésztő tápközegben
- (b) a sejtek összegyűjtése és sejtkivonat készítése a mosott sejtekből
- (c) a THP(A) és THP(B) tetrahidropirimidin származékok

elkülönítése a kísérő szénhidrátoktól, polioloktól, aminosavaktól, peptidektől és proteinektől néhány oszlopkromatográfiás szeperációs lépéssel

(d) a két tetrahidropirimidin-származékot tartalmazó oldat ion-cserés oszlop-kromatografálása, és

(e) mindkét tetrahidropirimidin-származék eluálása különböző oldószerrel, lényegében tiszta THP(A) és THP(B) nyerve.

A találmány szerint alkalmazott ActD-termelő *Streptomyces* törzs előnyösen a *S. parvulus*, pontosabban a *S. parvulus* ATTC 12434, mely az ATTC-nél szabadon hozzáférhető.

A sejtkivonatokat a szakirodalomból ismert eljárásokkal készítjük, például a mosott sejtpelletet vízbe történő szuszpendálásával és 100°C-on történő melegítésével vagy perklórsavas eljárással. Ezután a sejtextraktumokat ecetsavval elegyítjük, mielőtt a szeperációs eljárásoknak alávetnénk. Először a szénhidrátokat és a poliolokat távolítjuk el, például vízzel, azután az aminosavakat távolítjuk el anion-cserés kromatográfiával, és az intracelluláris peptid- és proteinszármazékokat Sephadex G25-tel. A (d) lépésben a THP(B) elválasztását a THP(A)-tól Dowex 50 W oszloppal (NH_4^+ forma) hajtjuk végre, és az (e) lépésben a THP(A)-t vízzel, a THP(B)-t 3M ammónium-hidroxiddal eluáljuk.

Egy másik előnyös megvalósítási módban a THP(A)-t egy talajból izolált *Streptomyces* törzs sejtextraktumából izoláljuk és tisztítjuk a fentebb leírtakhoz hasonlóan. Az eljárás a következő lépéseket tartalmazza:

(a) Az említett *Streptomyces* törzs tenyésztése egy alkalmas tenyésztő tápközegben 0,25-0,5 M NaCl-ben

- (b) a sejtek összegyűjtése és sejtkivonat készítése a mosott sejtekből
- (c) a THP(A) eltávolítása a kísérő szénhidrátoktól, aminosavaktól és proteinektől néhány oszlopkromatográfiás szeparációs lépéssel
- (d) a THP(A)-t tartalmazó oldat ioncserés oszlop-kromatografálása, és
- (e) a THP(A) eluálása vízzel és így lényegében tiszta THP(A) nyerése.

Talajlakó *Streptomyces* törzsként a találmány szerint előnyösen alkalmazható a *S. clavuligerus*, pontosabban a *S. clavuligerus* NRRL 3585, amely az NNRL-nél szabadon hozzáférhető, és az *S. griseus*, pontosabban az *S. griseus* ATCC 10137, mely az ATCC-nél szerezhető be szabadon.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményekben a THP(A) és a THP(B) olyan szereves és szervetlen bázisokkal alkotott sóit alkalmazzuk, melyek fiziológiailag elfogadható sók. A THP(A) 5-étereit így alacsonyabb szénatomszámú alkil-étereket és cukorrészel alkotott étereket, például nukleotid-analógokat foglalnak magukban. Ezeket a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal, megfelelő alkoholokkal történő reakciókkal állítjuk elő. A THP(A) 5-észtereit olyan alacsony szénatomszámú alkanoil-észterekből állnak, melyeket alacsony szénatomszámú alkánsavval állítunk elő.

A THP(A), THP(B) vagy ezek kombinációi a DNS-kötő szerekkel kezelt betegekben a nem-tumoros sejtek védelmére alkalmazható a DNS-kötő szer károsító hatásával szemben. DNS-kötő szer lehet bármely, a jelenlegi rák-kemoterápiában alkalmazott antitumor-antibiotikum, például daktinomicin (ActD), daunorubicin, doxorubicin (adriamicin), bleomicin, mitomicin és hasonlóak. Mivel ezek

az antitumor-antibiotikumok toxikusak a normál szövetre, a THP(A), THP(B) vagy a THP(A) és a THP(B) kombinációja lecsökkenti ezek toxikus hatását. Más antitumor-antibiotikumokat magas toxicitásuk miatt jelenleg nem alkalmaznak a rák-kemoterápiában. Az antraciklin-antibiotikumok, a cinerubin A és B toxicitása csökkenthető THP(A)-val, THP(B)-vel vagy THP(A)+THP(B)-vel, így lehetővé válik a jövőben ezek alkalmazása az antitumor-terápiában.

A THP(A), THP(B) vagy ezek kombinációja a kémiai karcinogénekkal, mutagénekkal - beleértve a sugárzást - szemben is alkalmazható a DNS megvédésére.

A THP(A) és a THP(B) nem toxikus az emlősökre. Egereket kezelve 1, 10 és 100 mg/100g testtömeg dózissal nem tapasztaltunk toxikus hatást. A THP(A)-nak és a THP(B)-nek antibiotikus aktivitása nincs, ahogy azt néhány gram-pozitív és gram-negatív baktériumtenyésztéssel végrehajtott teszttel kimutattuk.

A THP(A)-ból vagy egy sójából, 5-éteréből vagy 5-észteréből és a THP(B)-ből vagy sójából gyógyszerkészítményt állítunk elő, az említett vegyületek és egy gyógyászati lag aktív hordozó összekeverésével. A készítményhez adalékok, úgymint stabilizálók stb. adhatók.

A találmány magában foglalja a gyógyszerek beadásának bármely alkalmas módját, de előnyös az egyszeri intravénás injekció és az intravénás infúzió.

Azokban a találmány szerinti gyógyszerkészítményekben, melyek a THP(A)-t és THP(B)-t is tartalmazzak, ezek egymáshoz viszonyított moláris aránya változtatható. Előnyösen a találmány szerinti gyógyászati kompozíció a THP(A)-t és a THP(B)-t

ekvimoláris mennyiségben tartalmazza.

A csak THP(A)-t, csak THP(B)-t vagy ezek kombinációit tartalmazó gyógyászati készítményben a THP(A) és a THP(B) mennyisége változtatható a beteg állapotától, a betegség súlyosságától és a beadott antitumor-szer mennyiségétől függően. Az egyik megvalósítási módban a gyógyászati készítményt az antitumor-szerhez képest feleslegben adjuk be.

A találmány szerinti gyógyászati kompozíció beadható az antitumor-antibiotikum beadása előtt, vele együtt, előnyösen a beadás után. Hatékony mennyiségben csökkenti az antitumor-szer toxikus hatását.

A példákhoz, melyekkel találmányunkat csak illusztrálni kívánjuk, a következő ábrák tartoznak:

1. ábra: A tisztított THP(B) (a) és a tisztított THP(A) (500-MHz) ^1H NMR-spektrumát ábrázolja.

2. ábra: A THP(A) és THP(B) molekuláris szerkezetét és sztereokémiai konfigurációját (S forma) ábrázolja.

3. ábra: A következő proton NMR-spektrumokat mutatjuk be: (a) egy ActD-d(ATGCAT) 0,6:1 arányú keveréke, (b) a fenti keverékhez THP(B)-t adva 0,1:1:30 arányban, (c) a (b) szereinti keverékhez THP(A)-t hozzáadva 0,6:1:30:30 arányban. A spektrumot D_2O foszfát-puffer oldatban kaptuk, pH=7-nél, 10°C -on, sugárzás általi oldószer-szupressziót alkalmazva a késleltetés alatt. Ezekhez a kísérletekhez 4,0 mM ActD törzsoldatot és 100 mM THP(A) és THP(B) törzsoldatot használtunk foszfát-pufferben. Mindegyik ^1H NMR-kísérlethez 1,8 mg d(ATGCAT)-t alkalmaztunk 0,45 ml foszfát-pufferben.

4. ábra: Az ActD-d(ATGCAT) keverék alap-aromás proton-

régió spektrumait (500 MHz-nél) mutatja be különböző kémiai szer : DNS arányánál - amelyet az (a-e) görbéknel jelöltünk -, és az 0:30:30 moláris arányú d(ATGCAT), THP(A) és THP(B) keverék és az ActD spektrumát különböző kémiai szer:DNS arányánál, mely arányokat az (a'-e') görbéknel tüntettünk fel. Az (a) és (a') kinagyított spektrumát mutatjuk be (A) és (A')-ként. A spektrumokat pH=7-nél kaptuk (mint 3. ábránál). Az ActD-d(ATGCAT) protonrezonanciáit a spektrumon jelöltük: adenzin (belső) H2 protonjait 8,03 és 8,00 ppm-nél, adenzin (terminális) H2 protonjait 7,86 ppm-nél és a guanozin H8 protonjait 7,70 és 7,63 ppm-nél. Az ActD-d(ATGCAT) kémiai eltolódás jelei azonosak az S. C. Brown, K. Mullis, C. Levenson, R. H. Shafer [Biochemistry 23, 403 (1984)] által leírtakkal.

5. ábra: Egy olyan radiogrammot ábrázol, melyen bemutatjuk az RNS polimeráz II transzkripciójának gátlását ActD-vel és az aktivitás helyreállítását THP(A) és THP(B) hozzáadásával. Mindegyik sáv összetevőit a 6. táblázatban ismertetjük. A sávok relatív intenzitását a 6. táblázat szerint adtuk meg. A DNS koncentrációja 71,4 μ M volt.

6. ábra: Bemutatjuk az adriamicin DNS-szintézis gátlásának visszafordulását THP-k hatására. Sematikusán ábrázoljuk a beépült [3 H] timidint az adriamicin függvényében, melyet a grafikon alatt mutatunk be. Ores négyzetek - [3 H] timidin beépülés az adriamicin függvényében, tele négyzetek - [3 H] timidin beépülés az adriamicin koncentrációjának függvényében THP-k (100 μ g/ml) jelenlétében.

7. ábra: Az aktinomicin transzkripcióra gyakorolt gátló hatásának visszafordulását mutatjuk be a THP-k hatására, HeLa WCE

rendszert alkalmazva. A transzkripciót úgynevezett "pulse chase" feltételek mellett hajtottuk végre, ahogy azt a 6. példában leírjuk. A DNS-t növekvő koncentrációjú THP-kkel (A+B) preinkubáltuk 20 percig 30°C-on, ezután aktinomicin D-t adtunk hozzá 0,4 µg/ml koncentrációban. 20 perc inkubálás után WCE-t (10 µl) adtunk hozzá, és 20 percig 30°C-on inkubáltuk. Ezután radioaktív nukleotid-keveréket adtunk hozzá az 5 perces "pulse"-reakcióhoz, melyet a "chase"-keverék hozzáadása követett, mely 10mM CTP-t tartalmazott. A transzkripciót 30 percig 30°C-on folytattuk, ezután leállítottuk. Az RNS-t kivontuk, és a 6. példában leírt módon elemeztük. H-sáv - molekulatömeg-markerek, C-sáv - kontroll reakció adriamicin vagy THP-k nélkül. A 0,4 µg/ml aktinomicin D-vel történt reakciók sávjait (+)-szal jelöltük, a növekvő THP-koncentrációnál (0,5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 µg/ml) kapott sávok felett a THP-koncentrációt jelöltük. A sávok relatív intenzitását a 6. példában leírt módon becsültük meg, és a kontroll százalékában adtuk meg (C sáv).

8. ábra: Kémiaailag definiált tápközegben, különböző sókoncentrációknál tenyésztett *S. clavuligerus* extraktumok párosítatlan proton természetes abundancia ^{13}C NMR (126,7 MHz) spektrumait mutatja. (A) 0,5 M NaCl (B) 0,25 M NaCl (C) só nélkül. A

C csúcsok a következőket tartalmazzák: A - THP(A), Tre - trehalóz, Glu - glutaminsav

9. ábra: Kémiaailag definiált tápközegben, különböző sókoncentrációk mellett növesztett *S. clavuligerus* sejtekben lévő intracelluláris metabolitokat mutatja be a 8. ábra szerinti NMR-spektrumból kiszámítva. A glutaminsavat aminosav-analizátorral mértük, és a THP(A) és a trehalóz-értékét az NMR-spektrumból

integrálással számítottuk ki.

10. ábra: 66 órán át 0,5 M NaCl-t tartalmazó kémiaailag definiált tápközegben tenyésztett *S. griseus* sejtkivonatainak párosítatlan proton ^{13}C NMR (126,7 MHz) spektrumát mutatjuk be. A ^{13}C csúcsok a következőkből állnak: A - THP(A), Tre -trehalóz, Glu - glutaminsav, Eth - etanol (a THP(A) kvantitatív mérésének érdekében hozzáadva).

11. ábra: *S. griseus*ból nyert tisztított THP(A) párosítatlan proton ^{13}C NMR (126,7 MHz) spektruma.

A találmányt a következő példákkal mutatjuk be a korlátozás szándéka nélkül.

Példák

1. példa: A THP(A) és a THP(B) izolálása és tisztítása *S. parvulus* ATCC 12434 sejtkivonatából

(a) Tenyésztés

A 4°C-on talaj-kultúrában tartott *S. parvulus* (ATCC 12434) NZ-amin tápközegben (Sheffield Chemicals N. Y., USA) növesztettük 2 napig 30°C-on egy forgó-rázó inkubátorban. Centrifugáltuk, majd kétszer mostuk a sejteket 0,3%-os KCl-ben, és az így kapott micélium-szuszpenzió (3%) szolgált inokulumként a kémiaailag definiált tenyésztő tápközeghez (40 g D-fruktóz, 1,0 g K_2HPO_4 , 25 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és 2,1 g L-glutaminsav/1000 ml ionmentes víz, pH=7,1-en).

(b) Sejtkivonat készítése

Az *S. parvulus* sejtek kivonatait 1 liter *S. parvulus*

tenyésztő tápközegből állítottuk elő. A sejteket centrifugálással (500 g-nél 5 percig) gyűjtöttük össze 4°C körül. A sejteket kétszer mostuk 0,2%-os KCl oldattal, hogy a tápközeg maradékát eltávolítsuk. Az intracelluláris extraktumot úgy kaptuk, hogy a mosott sejtpelletet 10 ml vízbe szuszpendáltuk, és 15 percig 100°C-on melegítettük, vagy a perkloridsavas eljárást alkalmaztuk [L. Inbar és A. Lapidot, (1988a)]. A felülúszót 15 000 g-nél 15 perces centrifugálással különítettük el, és csökkentett nyomás alatt 1 ml-re koncentráltuk.

(c) THP(A) és THP(B) elkülönítése *S. parvulus* sejtkivonataiból

A sejtkivonat-mintákat 4 térfogatrész 1M ecetsavval kevertük össze a Dowex 50 W kromatográfiával történő szeparálás előtt. Az oszlopot ionmentes vízzel mostuk (az oszloptérfogat ötszörösével) a szénhidrátok és poliolok eltávolítására. Az aminosavakat, THP(A)-t és THP(B)-t 3M NH₄OH-val eluáltuk. Az ammóniát teljesen elpárologtattuk, és a maradékot pH=5-re állítottuk be, és Dowex 1 anioncserélő (acetát-típusú) kromatográfiával szeparáltuk. A savas aminosavak, úgymint a glutaminsav az oszlophoz kötődve maradtak. A THP(A)-t és a THP(B)-t vízzel oldottuk le.

(d) A THP(A) és a THP(B) elkülönítése a peptidektől és proteinektől

A (c) lépésben nyert THP(A) és THP(B) elegyét 40 ml Sephadex G-25 oszlopra vittük fel. Az oszlopot vízzel mostuk. Az első frakciók tartalmazták a peptideket és az alacsony molekula-tömegű proteineket (sárga színnel), és a THP(A) és a THP(B) ezután eluálódott.

(e) A THP(A) elkülönítése a THP(B)-től

A (d) lépésben nyert THP(A)+THP(B) keverékét 4 térfogatrészes ecetsavval elegyítettük, mielőtt 70ml Dowex 50 W x 8 (NH_4^+ -forma) oszlopra felvittük. A THP(A)-t egy kis mennyiségű THP(B)-vel együtt vízzel eluáltuk. A THP(B)-t egy kis mennyiségű THP(A)-val együtt 3M ammónium-hidroxiddal szorítottuk ki. Az eljárást még egyszer megismételve a THP(A) teljesen elkülöníthető volt a THP(B)-től. A THP(B) frakciója egy kis mennyiségű alanint is tartalmazott. A második frakciót pH=2-re állítottuk be (HCl-lel), és egy 70 ml-es Dowex 1 anioncserélő (OH^- -forma) kromatográfiával választottuk el. Az oszlopot vízzel mostuk, és a THP(B)-t 150 ml 1%-os hangyasavval szorítottuk ki (az alanint 600 ml 1%-os hangyasavval eluáltuk). A tisztított THP(A) és THP(B) ^1H NMR spektrumát az 1b. illetve az 1a. ábrákon mutatjuk be. A molekulaszervezetek a 2. ábrán láthatók.

2. példa: A THP(A) és a THP(B) kristályosítása

(a) Az 1. példa szerint kapott tiszta THP(A)-t forró etanolban oldottuk fel, és az oldatot szárítóban, benzol-gőzben tároltuk, hogy kristályok alakuljanak ki. Átlátszó, hasábalakú, 0,2 x 0,1 x 0,05 mm-es kristályokat gyűjtöttünk össze a röntgen kristályszerkezet-analízishez. Trigonális ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$) kristályszerkezetet állapítottunk meg $\text{P}\bar{3}_1$ tércsoporttal. A kristályok kötéshosszát az 1. illetve a 2. táblázatban mutatjuk be. Úgy találtuk, hogy a A THP(A) sztereokémiai konfigurációja S-forma.

(b) Az 1. példa szerint nyert tiszta THP(B)-t etanolban oldottuk, és az oldathoz néhány csepp metilén-kloridot adtunk. Az oldatot hagytuk lassan párologni. Néhány nap múlva kristályok tűntek fel az oldatban. 0,4 x 0,3 x 0,2 mm-es színes, átlátszó,

hasábalakú kristályokat gyűjtöttünk össze a röntgen-kristályszerkezet-analízishez. A $C_6H_{10}N_2O_2 \cdot 2[H_2O]$ kristályszerkezet tetragonális, $P4_3$ tércsoportokkal. A kristályok kötéshosszait és kötésszögeit az 1. illetve a 2. táblázatban mutatjuk be. Ugy találtuk, hogy a THP(B) sztereokémiai konfigurációja S-forma.

1. táblázat

Kötéshosszak (Å)

THP(B)		THP(A)	
C(2)-N(1)	1.303 (4)	C(2)-N(1)	1.311 (10)
C(2')-C(2)	1.487 (4)	N(3)-C(2)	1.310 (8)
C(4)-N(3)	1.459 (4)	C(4)-N(3)	1.458 (9)
C(5)-C(4)	1.522 (4)	C(4')-C(4)	1.545 (11)
O(8)-C(4')	1.260 (3)	O(9)-C(5)	1.405 (10)
C(6)-N(1)	1.456 (4)	O(8)-C(4')	1.217 (10)
N(3)-C(2)	1.312 (4)	C(6)-N(1)	1.462 (9)
C(4')-C(4)	1.529 (5)	C(2')-C(2)	1.499 (10)
O(7)-C(4')	1.247 (4)	C(5)-C(4)	1.527 (12)
C(6)-C(5)	1.508 (5)	C(6)-C(5)	1.519 (10)
		O(7)-C(4')	1.272 (9)

2. táblázat

Kötésszögek (fok)

THP(B)		THP(A)	
C(6)-N(1)-C(2)	123.7 (3)	C(6)-N(1)-C(2)	121.5 (6)
N(3)-C(2)-N(1)	121.5 (3)	C(2')-C(2)-N(1)	118.1 (6)
C(4)-N(3)-C(2)	122.4 (3)	C(4)-N(3)-C(2)	124.2 (6)
C(5)-C(4)-N(3)	108.9 (3)	C(4')-C(4)-N(3)	113.5 (7)
O(7)-C(4')-C(4)	116.5 (3)	C(6)-C(5)-C(4)	109.4 (7)
O(8)-C(4')-O(7)	126.0 (3)	O(9)-C(5)-C(6)	108.8 (6)
C(5)-C(6)-N(1)	109.1 (3)	O(7)-C(4')-C(4)	111.9 (7)
C(2')-C(2)-C(2')	118.8 (3)	O(8)-C(4')-O(7)	127.8 (7)
N(3)-C(2)-C(2')	119.7 (3)	N(3)-C(2)-N(1)	121.7 (7)
C(4')-C(4)-N(3)	112.9 (3)	C(2')-C(2)-N(3)	120.2 (7)
C(5)-C(4)-C(4')	110.4 (3)	C(5)-C(4)-N(3)	109.5 (6)
O(8)-C(4')-C(4)	117.5 (3)	O(9)-C(5)-C(4)	111.3 (6)
C(6)-C(5)-C(4)	109.6 (2)	C(5)-C(6)-N(1)	108.6 (6)
		O(8)-C(4')-C(4)	120.2 (6)

3. példa: Az ActD kötődése oligonukleotidokhoz THP(A) és THP(B) jelenlétében - NMR-vizsgálatok

Az ActD DNS-kötésének tanulmányozása igen nagy érdeklődésre tart számot, mivel feltételezhetően ez az alapja antitumor-aktivitásának. Kézenfekvőnek tűnik, hogy a fenoxazon-gyűrűhöz kapcsolódó peptidláncok felelősek nagyrészt azért, hogy az ActD a DNS GpC helyeihez kötődik. A részletes megoldás érdekében szerkezet-modellező kutatásokat végeztek az ActD és a d(ATGCAT) 1:1 arányú komplexével [Lybrand és mtsai, J. Mol. Biol. 191, 495-507, (1986)].

A THP-k DNS-kötési módját ActD jelenlétében vagy hiányában vizsgáltuk ^4H NMR-spektroszkópiával. A következő okok miatt a d(ATGCAT) oligonukleotidot választottuk ehhez a vizsgálathoz: egyedi kötőhelyet tartalmaz az ActD számára, elegendően hosszú ahhoz, hogy kölcsönhatásba lépjen az ActD pentapeptid-laktonjaival, az ActD-d(ATGCAT) kinetikája elegendően lassú, és megfelelően utánozza az ActD-DNS asszociáció kinetikáját [S. C. Brown, K. Mullis, C. Levenson, R. H. Shafer, Biochemistry 23, 403 (1984); N. Zhou, T. L. James és R. H. Shafer, Biochemistry 28, 5231, (1989)]. A DNS-THP(A) és (B) komplexekkel folytatott vizsgálatok azt is jelzik, hogy a THP(A) és a THP(B) köti az oligonukleotidot, és nagymértékben megakadályozza, hogy az komplexet képezzen az ActD-vel.

(a) A THP-k kötődése a d(ATGCAT)-hoz

A szabad d(ATGCAT)-ban és a d(ATGCAT) THP(A)-val és THP(B)-vel alkotott komplexében a nem-kicserélhető protonok kémiai eltolódásának összehasonlítását mutatja be a 3. táblázat.

A hexamerhez THP(A)-t és THP(B)-t adva a guanozin H8 (GH8) jele 7,94 ppm-nél mutatott egy nagymértékű, alacsonyabb pályára történő kémiai eltolódást (20 MHz), az adenzin (terminális) H8 protonjai alacsonyabb pálya felé mozdultak 10 MHz-nél, míg az összes többi alap-aromás protonok csak kis változást mutattak.

(b) A THP-k kötődése az ActD-d(ATGCAT) komplexhez THP(B)-t adva az ActD-d(ATGCAT) komplexhez (0,64 ActD per hexamer molarányban) a GH8 protonok kémiai eltolódása alacsonyabb pálya felé történt 0,018 ppm-nél, míg az ActD-hexamer komplex adenzin (belső) H2 protonja 7,99 ppm-nél változatlan maradt (3b. ábra). Ha THP(A)-t adtunk a komplexhez, a GH8 protonok egy további alacsonyabb pálya felé történő eltolódása volt megfigyelhető (3c. ábra). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a THP-k megkötik a szabad oligonukleotidokat még ActD jelenlétében is.

(c) Az ActD kötődése a d(ATGCAT)-hoz

Az ActD kötődését a szabad oligonukleotidokhoz és az oligonukleotid-THP komplexhez H NMR titrálósos technikával vizsgáltuk meg. A hexamerhez 0,16 mólekvalens mennyiségben ActD-t adva komplex új protoncsúcsait figyelhetjük meg (4b. ábra), és a csúcsok intenzitása növekedett az 1:1 ActD-d(ATGCAT) arány eléréséig (4a., b., c., d., e. ábra). A szabad hexamer és az ActD-hez kötött hexamer jeleinek arányait a 4. táblázat mutatja be.

(d) Az ActD kötődése a d(ATGCAT)-THP-k komplexéhez

Ha 0,16 mólekvalens mennyiségben ActD-t adtunk a hexamer-THP-k komplexhez, az ActD-hexamer komplexnél nem figyelhetünk meg új protoncsúcsokat (4b'. ábra), 0,32 mólekvalens ActD hozzáadásakor pedig az ActD-hexamer komplexnek csak egy pro-

toncsúcsa volt detektálható 8,03 ppm-nél (4c'. - ábra). Csak amikor 0,48 mólekivivalens ActD-t adtunk a hexamer-THP-khez, akkor lehetett megkülönböztetni az ActD-hexamer új protoncsúcsait, ahogy ez a 4d'. , e'. ábrákon látható. Az ActD-hexamer két rezonanciája elveszett, az ActD-hexamer komplex adenozin (belső) H2 jele 7,99 ppm-nél nem detektálható a THP-k-hexamer komplex GH8-ának erős rezonanciája miatt 7,98 ppm-nél, míg az ActD-hexamer komplex adenozin (terminális) H2 rezonanciáját elfedte a THP(B) NH protonjának ezzel egybeeső rezonanciája 7,88 ppm-nél. Az ActD-d(ATGCAT) egyensúlyi kötési tulajdonságai a THP-k jelenlétében és hiányában (4. táblázat) a szabad hexamer és az ActD-kötött hexamer protoncsúcs-területeinek arányából vezethetők le. Mivel az ActD hexamerhez történő kötésének alacsony értékei miatt igen nehéz volt a pontos kötési adatok megállapítása, a kötési állandókat nem sikerült meghatározni. Viszont az egyensúlyi mérések (4. ábra és 4. táblázat) demonstrálják a THP-k potenciális aktivitását a DNS ActD-beékelődés elleni védelmében, mely valószínűleg kompetitív mechanizmussal megy végbe.

3. táblázat

A d(ATGCAT) és a d(ATGCAT)-THP(A)+THP(B) nem kicserélhető protonjainak alap-proton kémiai eltolódása (ppm)

Megjelölés	d(ATGCAT)	THP(A)+THP(B)-d(ATGCAT)	Különbség
	81	82	81-82
A ₁ ⁸	8.330	8.330	0.000
A ₂ ⁸	8.186	8.203	+0.017
G ⁸	7.944	7.984	+0.040
THP(A)		7.913	0.000
A ₁ ²	7.908	7.908	0.000
THP(B)		7.881	
A ₂ ²	7.844	7.849	+0.005
C ⁸	7.368	7.376	+0.008
T ₁ ⁸	7.356	7.356	0.000
T ₂ ⁸	7.251	7.256	+0.005

Adenozin (belső) H8 (Ai^8); adenozin (terminális) H8 (At^8);
 guanozin H8 (G^8); adenozin (belső) H2 (Ai^2); adenozin
 (terminális) H2 (At^2); citozin H6 (C^6); timin (belső) H6 (Ti^6)
 és timin (terminális) H6 (Tt^6).

4. táblázat

Az ActD egyensúlyi kötődése a d(ATGCAT)-hoz THP-k
 jelenlétében és hiányában

ActD/d(ATGCAT) mólaránya	d(ATGCAT) (szabad/kötött) ^a	d(ATGCAT)-THP-k (szabad/kötött) ^a
0,16	4,9	n.m.
0,32	1,7	3,5
0,48	0,8	2,7
0,64	0,4	1,3

(a) A szabad hexamer Ai^6 (két proton/2) : kötött ActD-hexamer Ai^2
 (egy proton) protoncsúcs területi aránya.

n.m. - nincs meghatározva

4. példa: In vitro transzkripció vizsgálatok ActD jelenlétében; a THP(A) + THP(B) védőhatása

(a) A transzkripció gátlása ActD-vel

Azt, hogy az ActD DNS-hez történő kötődése okozza az RNS polimeráz transzkripció gátlását T. R. Kadesch és M. J. Chamberlin [J. Biol. Chem. 257, 5286 (1982)] által leírt rendszert alkalmazva tanulmányoztuk, amelynél az emlős sejtekből tisztított polimerázok, úgymint az RNS polimeráz I, II és a HeLa sejtekből származó RNS polimeráz II képesek hatékonyan és specifikusan

átírni a meghatározott dCMP-végű DNS-templátokat. Az alkalmazott dCMP-végű DNS-rendszer lehetővé teszi a polimeráz-protein transzkripció reakciójának kvantitatív tanulmányozását más proteinfaktorok jelenléte nélkül, és így ez a rendszer alkalmas arra, hogy analizáljuk a DNS-kötő szerek közvetlen hatását a transzkripció folyamataira, és a THP(A) és THP(B) védő hatását az ActD jelenlétében történő transzkripciónál.

A DNS-dependens RNS polimeráz I-t, II-t, III-t (pol I, pol II, illetve pol III) HeLa sejtekből tisztítottuk Hodo és Blatti által leírt módszer [Biochem. 16, 2344 (1977)] módosított eljárásával.

A templát-DNS-eket PstI restrikciós enzimmal linearizáltuk 3' túlnyúló végeket létrehozva, és terminális transzferáz alkalmazásával (Boehringer Mannheim) mindkét véget dCTP farokkal egészítettük ki. Etanolos kicsapást követően a dCMP-farokkal rendelkező DNS-eket egy második restrikciós enzimmal hasítottuk, és a kiválasztott farkazott fragmenst agaróz gélen tisztítottuk, ahogy azt T. R. Kadesch és M. J. Chamberlin leírta [J. Biol. Chem. 257, 5286 (1982)]. A transzkripció reakciókeveréket 30°C-on 10 percig 15 µl transzkripció pufferben inkubáltuk, mely 70 mM Tris-HCl-t (pH=7,9), 0,1 M NH₄Cl-t, 6mM MgCl₂-t, 5mM spermidint, 10% glicerint, 0,15 mM ditiotreitolt, 0,6µg dCMP-farokkal rendelkező templátot és 0,5µl HeLa RNS polimerázt (3 egység) tartalmazott. Ezután 4,3 mM ATP-t, GTP-t és CTP-t, 170 µM UTP-t, 20 µCi [α -³²P] UTP-t tartalmazó "pulse"-puffert (3,5 µl) adtunk a transzkripció reakciókeverékhez, és 20 másodpercig inkubáltuk. A transzkripció lánchosszabbító (elongációs) szakaszát 1,5 µl "chase"-puffer hozzáadásával indítottuk el, amely 7mM UTP-t

tartalmazott 0,06 µg ActD jelenlétében vagy hiányában. A transzkripciós elongációt 10 percig folytattuk, és proteináz K puffer (0,6% SDS, 25 mM Tris pH=7,9, 25 mM EDTA végső koncentráció), 200 µg/ml proteináz K és 30 µg tRNS hozzáadásával állítottuk le, és 25 percig 65°C-on inkubáltuk. A mintát etanollal kicsaptuk, és a pelletet terhelő-pufferbe (90% formamid, 0,5 x Tris-borát puffer) reszuszpendáltuk, és 6%-os poliakrilamid-gélen elektroforetizáljuk. A gél-autogrammot molekuláris dinamika számláló denzitométerrel analizáltuk, hogy meghatározzuk a sávok relatív intenzitásait. (A nukleotid-trifoszfátokat és a tRNS-t a Sigmától vásároltuk, a proteináz K-t a Boehringer Mannheimtól, és az [α - 32 P] CTP-t (400 Ci/mmól) az Amersham Internationaltól, Egyesült Királyság, szereztük be.)

Különböző ActD koncentrációnál a HeLa sejtekből származó három RNS polimeráz érzékenységét tisztított polimerázokat és a pol I-nél 225 bp hosszúságú, a pol II-nél és pol III-nél 420 bp hosszúságú dCMP-farkazott templátot alkalmazva határoztuk meg. Azt vártuk, hogy templátokkal egy 225 nukleotidos illetve 420 nukleotidosnál nagyobb transzkriptumot kapunk, mivel az RNS-polimeráz az egyszálú farok-kettőszálú duplex egyedi illeszkedési helyénél kezdi a transzkripciót. Mindegyik kísérletnél a "pulse-chase" eljárást alkalmaztuk.

A három polimeráz ActD-vel történt transzkripció gátlásának mintázatát az 5. táblázatban foglaljuk össze, ami jelzi, hogy az enzimek is érzékenyek az ActD-re. Mikor 1 µg/ml ActD-t adunk a "chase"-reakció-keverékhez, csak 10-20%-ban fennmaradó transzkripció fordul elő, még 3-5 µg/ml koncentrációnál csak 0,1-3%-ban fennmaradó transzkripciót mértünk.

Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy az ActD gátlás függ a reakciókeverék DNS-koncentrációjától.

5. táblázat

A fennmaradó transzkripció százalékos aránya ActD jelenlétében

RNS	Aktinomicin-D				
	µg/ml				
polimeráz	0	1	3	4	5
I	100	16			3
II	100	22		3	3
III	100	13	3		0,1

(b) Az ActD gátolt transzkripció újraindítása THP(A)-val és THP(B)-vel

Az assayt olyan ActD koncentrációnál hajtottuk végre, amelyenél a transzkripció gátlása meghaladta a 97%-ot; vagyis az ActD-t 3µg/mg koncentrációban alkalmaztuk. Ugy gondoltuk, hogy a THP(A)+THP(B)-ből az ActD koncentrációjánál magasabb koncentrációra van szükség a DNS-hez történő kötődésének megakadályozására, mivel feltételeztük, hogy azok általánosan védik a DNS-t, és nem csak a d(GpC) bázispárnál (bp), az ActD koncentráció pedig arányos a DNS (GpC) tartalmával. Amint az az 5. ábra 2., 6., 10. sávjaiból és a 6. táblázatból látható, ezekben a kísérletekben a THP(A) és a THP(B) önmagában nem gátolta a transzkripciós reakciókat. Sem a THP(A) sem a THP(B) egymagában nem hat az ActD transzkripciógátlására. (Amint az az 5. ábrán a 3-5, 7-9 sávoknál

és a 6. táblázatban látható.) Viszont ha a THP(A)-t és a THP(B)-t együttesen adtuk 1:1 arányban, a hatásuk drámai volt. 200 μ M koncentrációnál, 2,5 μ M ActD jelenlétében, mely önmagában 97%-ban gátolja a transzkripciót, a transzkripció 75%-a volt visszanyerhető. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a THP(A) és a THP(B) kombinációja szinergetikus DNS-védő hatást fejt ki az ActD DNS-kötésével szemben. A fentebb leírt körülmények azt mutatják, hogy a transzkripció gátlása (97%) 1 molekula ActD per 30 bp által jön létre, mivel a DNS-ActD komplex forma 1:10 arányt igényel. 75%-os transzkripcióhoz 80 molekula THP(A)+THP(B) szükséges minden egyes ActD molekulához, vagyis egy pár THP(A)+THP(B) per bp arány. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a THP(A)+THP(B) szerepet játszik a DNS védelmében az ActD kötésével szemben, és lehetővé teszi a transzkripció visszaállítását ActD jelenlétében.

6. Táblázat

A fennmaradó transzkripció mértéke ActD és THP(A) és THP(B) jelenlétében

Sorszám		THP	ActD [3μg/ml]	%	
		μg/ml	μM	[2,5 μM] transzkripció	
2	THP (A)	60	400	-	100
3	THP (A)	10	66	+	0,2
4	THP (A)	30	200	+	0,5
5	THP (A)	60	400	+	1,5
6	THP (B)	60	400	-	100
7	THP (B)	10	66	+	1,0
8	THP (B)	30	200	+	2,7
9	THP (B)	60	400	+	5,1
10	THP (A+B) (1:1)	60	400	-	100
11	THP (A+B) (1:1)	10	66	+	4,6
12	THP (A+B) (1:1)	30	200	+	75,0
13c	THP (A+B) (1:1)	0	0	+	0,2

5. példa: Sejtnövekedés és kémiai szerrel történő kezelés:
Az adriamicin DNS-szintézis gátlásának visszafordulása a THP-k hatására

HL60 sejteket mikrotitráló lemezekben (Nunc) RPMI tápközegben (Gibco) növesztettünk, mely 10% főtális borjúsérumot (Biological Laboratories - Bet Haemek) tartalmazott. A sejteket a tápközegbe szuszpendáltuk 2×10^5 koncentrációban, és 100 μ l-es alikvotokban a lemez üregeibe diszpergáltuk. 20 órás, 37°C-on történő inkubálás után a sejteket THP-kkel (100 μ g/ml) és növekvő koncentrációban, ahogy azt a 6. ábrán jelöltük, adriamicinnel kezeltük. 24 óra eltelte után [3 H] timidint adtunk hozzá (1 μ Ci/Üreg, 120 μ l) 3 órás időtartamra. A timidin-beépülést 25 μ l 20%-os triklórecetsavval (TCA) állítottuk le, és a lemezeket 4°C-ra helyeztük egy északára. A TCA precipitátumokat 10%-os TCA-val (100 μ l) mostuk, 100 μ l 1N NaOH-ba szolubilizáltuk, és a számláláshoz üvegcsövekbe tettük, melyek 3ml, toluén:Lumax (Lumac, Hollandia) 3:2 arányú keverékéből álló szcintillációs oldatot tartalmaztak. Az assay-nél három párhuzamost hajtottuk végre. Amint az a 6. ábrán látható, mikor a HL60 sejteket 0,01-0,02 μ g/ml koncentrációjú adriamicinnel kezeltük, a [3 H] beépülés 30-40%-ban gátlódott. THP-k hozzáadása a 100 μ l/ml végső koncentrációnál visszafordította az adriamicin gátló hatását, és így az adriamicin jelenléte (0,01-0,02 μ g/ml) ellenére a [3 H] timidin beépülés nagyon hatékony, 107-93% volt. Ezek az eredmények ismételten jelzik, hogy a THP(k) megvédi a DNS-t a károsító kémiai szerektől.

6. példa: Teljes HeLa-sejtkivonatot (WCE) alkalmazó in

vitro transzkripció: Az aktinomicin D transzkripció-gátlásának visszafordulása THP-k hatására

A WCE-t J. L. Manley módszere szerint állítottuk elő [B. D. Hames és S. J. Higgins (szerk.), " Transcription and Translation: A Practical Approach", IRL Press, Whashington D. C., 71 (1984)]. 20 µl reakcióelegy 10 µl WCE-t, 1 µg DNS-t, 4 mM kreatin-foszfátot, 500 µM ATP-t, GTP-t, UTP-t, 50 µM CTP-t, 20 µCi [α - P] CTP-t tartalmazott, és a transzkripciót 30°C-on hajtottuk végre. A reakcióelegyet a nukleotidkeverék hozzáadása előtt 20 percig előinkubáltuk, majd 3 perccel a radioaktív nukleotidok hozzáadása után ("pulse"-lépés) 10 mM jelöletlen CTP-t tartalmazó "chase"-keveréket adtunk hozzá, és a transzkripciót további 20 percig folytattuk. A reakciót leállítottuk, majd az RNS-t a 4. példa szerint analizáltuk.

Egy előzetes kísérletben az aktinomicin D transzkripció-gátlását a HeLa-WCE rendszerben ellenőriztük. 0,4 µg/ml koncentrációt alkalmaztunk, amely körülbelül 80%-os gátlást eredményezett. A 7. ábrán bemutatott kísérletben világosan látható, hogy az ActD önmagában 0,4 µg/µl koncentrációnál a transzkripciós reakciót 80%-ban gátolja (D és C sáv összehasonlítása). A THP-k alacsony koncentrációban, 20 µg/ml-ig, történő hozzáadása nem hat a reakcióra, 100-200 µg/ml THP-koncentrációnál újrakezdődik a transzkripció, és eléri a kontroll 40-65%-át. Ez a kísérlet azt mutatja, hogy a THP-k (A+B) visszaszorítják a transzkripció ActD általi gátlódását, az aktinomicin D okozta 20%-ra lecsökkent transzkripciót körülbelül 25-45%-kal megemelve.

Ezek az eredmények továbbá azt jelzik, hogy a THP-k megvédik a DNS-t azoktól a kémiai anyagoktól, amelyek kötődnek

hozzá. Így a THP-k a DNS-kötő szerek gátló hatásának visszaszorítását okozzák, és lehetővé teszik a polimerázok hatékony nukleinsav-szintézisét a kémiai szerek jelenléte ellenére is.

7. példa: A THP-k DNS-védő hatása a restrikciós enzimek emésztésével szemben

A THP-k és a DNS közötti funkcionális kölcsönhatásnak további bizonyítékaul szolgál az, hogy úgy találtuk, hogy a THP(A) és a THP(B) keveréke és a THP(A) önmagában is képes egy plazmid-DNS (pGEM10, Promega) védelmére a restrikciós endonukleázok (EcoRI, AvaI és DraI) hasításával szemben. A THP-k kölcsönhatásban állnak a DNS-sel, és hatékonyan (10^{-4} M-nél) megvédik a restrikciós enzimek által felismert hasítóhelyeket. Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

Az emésztési elegyhez THP-eket adtunk a 7. táblázatban jelzett végkoncentrációban. A pGEM10 1 µg-ját 0,2-1µM enzimmal hasítottuk 3 órán át 20 µl pufferban, ahogy azt a gyártó javasolta (New England Biolabs). Az inkubációs idő eltelte után 5 µl 75% glicerint, 3% brómfenolkéket és 10 mM EDTA-t tartalmazó megállító puffert adtunk hozzá, és a reakciókeverék 12 µl-ét 1%-os agaróz géltre vittük. A gél etídium-bromiddal (0,5 µg/ml) festettük, UV-fénnyel láthatóvá tettük és lefotóztuk. A fényképeken a sávok relatív intenzitását molekuláris dinamika számláló denzitometriával elemeztük.

A restrikciós endonukleázok emésztésével szembeni védelemhez szükséges THP(A) + THP(B) minimális mennyisége 25 µg/ml és 100 µg/ml határok között található, míg 150-től 250 µg/ml-ig terjed a teljes gátláshoz szükséges mennyisége. THP(A)

és THP(B) jelenlétében AvaI-gyel és DraI-gyel végzett összehasonlító vizsgálatából úgy tűnik, hogy az AvaI aktivitás négyszer érzékenyebb a THP-k gátló hatásával szemben. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a THP-k nagy affinitással rendelkeznek az AvaI helyek GC-maradékaikhoz, összehasonlítva az affinitásukat a DraI helyek AT maradékaival (lásd 7. táblázat). Az endonukleáz-hasítással szembeni DNS-védelemhez szükséges THP(A)+THP(B) koncentráció hasonló a DNS-hez kötődő aktinomycin D és disztamicin A mennyiségéhez, amint azt korábban már leírták. [V. V. Nosikov, E. A. Braga, A. Karlishev, A. L. Zushe és D. L. Polianovsky, Nucl. Acids Res. 3, 2293-2301 (1976); V. V. Nosikov és B. Sain, Nucl. Acids Res. 4, 2263-2273 (1977)]

Figyelemreméltó, hogy míg a THP-k a DNS-t megvédik a restrikciós enzimek hasításával szemben, sem a THP(A) sem a THP(B) sem együttesen nincsenek hatással az RNS polimeráz aktivitására. Ez a különbség valószínűleg a kétféle enzim kötődési módjából eredhet. Az RNS polimeráz a kétszálú DNS-hez kötődik, és megkeresi a promóter helyet oly módon, hogy átmeneti hidrogénkötéseket létesít a szabadonálló hidrogén-donor és a bázispárok akceptor csoportjai között, míg az EcoRI endonukleáz a palindrómás célhelyet ismeri fel, a DNS foszfátgerincének elektrosztatikus vonzása által, a bázispárok szétválasztása nélkül.

7. Táblázat

THP-k általi DNS-védő a restrikciós enzimekkel szemben

Restrikciós endonukleáz	Restrikciós hely	Helyek	THP(A)		THP(A)+(B)		THP(A)*:	
			száma	gátolás	gátolás	gátolás	THP(A)+(B)	THP(A)+THP(B)
			részeleg	teljes	részeleg	teljes	arány	
			µg/ml	mM	µg/ml	mM	µg/ml	mM
ECOR I	5'-GAATTC	1	100	0,66	1000	6,6	100	0,66
	3'-CTTAAG						250	1,66
Ava I	5'-CCCGGG	1	25	0,166	300	1,98	25	0,166
	3'-GGGGC						150	0,99
Dra I	5'-TTTAA	3	100	0,66	300	1,98	100	0,66
	3'-AAATT						150	0,99

8. példa: THP(A) izolálása és tisztítása *S. clavuligerus* sejtkivonataiból

(a) Növesztés tenyésztőkultúrában: A *S. clavuligerus* (NRRL 3585) hasonló körülmények között növesztjük, mint a *S. parvulus*t, ahogy azt az 1.(a) példában fentebb leírtuk.

A *S. clavuligerus* spórák szuszpenzióját 20%-os glicerinben tároltuk -20°C -on. A tenyészetet 100 μl spóraszuszpenzióval oltottuk be, és két napig növesztettük forgó-rázó inkubátorban (210 ford./perc) kémiaailag definiált tápközegben, mely 0,1% NH_4Cl -lel és 0,1% élesztő kivonattal volt kiegészítve. Centrifugálás és 0,9%-os NaCl -lel történő 2x-es mosás után a vegetatív micélium szuszpenziója (5%) szolgált inokulumként egy kémiaailag definiált tenyésztő közeghez. A növesztő tápközeg tartalmazott: 1,0% glicerint, 0,2% L-aszparagint, 0,06% Mg SO_4 -t, 0,35% K_2HPO_4 -t és 0,68 % KH_2PO_4 -t és 2 ml nyomelemsókat tartalmazó törzsoldatot literenként. A nyomelemsók törzsoldata 100 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -t, 100mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -t, 100 mg $\text{ZnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -t és 100 mg CaCl_2 -t tartalmazott 100ml vízben. A sejteket 30°C -on 240 ford./perc-nél egy forgó-rázó inkubátorban 250 ml-es Erlenmeyer lombikban tenyésztettük, amely 50 ml tápközeget tartalmazott. A THP(A) intracellulárisan felhalmozódott, amikor NaCl -t adtunk az alap-tápközegbe 0,025-0,5M mennyiségben. A THP(A) nyomnyi mennyisége (8. ábra) volt megtalálható kezdetben ^{13}C NMR-rel mérve (9. ábra) a *S. clavuligerus* sejtekben, amikor 0,05% M NaCl -ben tenyésztettük, és határozottan megnövekedett 400 $\mu\text{mol/g}$ száraztömeg-re az intracelluláris tartályokban, és koncentrációja majdnem olyan magas lett, mint a 3M NaCl -ben növesztett halofil baktériumokban. Tehát a THP(A) és

a THP(B) szintézisének mechanizmusa az ActD-termelő *Streptomyces* fajokban az aktinomicin szintézisre adott válasz, és a THP(A) a β -laktám-termelő *S. clavuligerus*-ban a sótartalom változására adott válasz.

A *S. clavuligerus* képes 0,5 M NaCl-t elviselni folyékony minimál tápközegben. A tápközeg sótartalmának 0,05 M-ról 0,5 M-ra történő növekedése hatással volt a növekedési rátára, míg egy egyenletes szintnél ugyanazt az értéket kaptuk, mint az alaptápközegnél. Az antibiotikum-termelés rendkívül érzékeny a tápközeg sótartalmára, és teljesen gátlódik 0,25 M NaCl-nél. Természetes abundancia C NMR-rel tanulmányozott anyagcsereválasz feltárta, hogy a THP(A) 10-szeresére megnövekedett (összehasonlítva az alaptápközeggel), és a trehalóz felgyülemlett, míg az intracelluláris glutamin szintje lecsökkent (8. és 9. ábra). Az intracelluláris THP-k maximális akkumulációja a növekedés féllogaritmikus fázisában figyelhető meg, és ez arányos az NaCl-koncentráció növekedésével (400 μ mol/száraz sejttömeg THP(A) 0,5 M NaCl-nél). A THP(A) a tenyésztés 86. órája után (késői log fázis) emésztődik el.

(b) Sejtkivonatok előállítása

A *S. clavuligerus* sejtek sejtkivonatát 1 liter *S. clavuligerus* tenyészkultúrájából állítottuk elő. A sejteket centrifugálással (500 g-nél 5 percig) körülbelül 4°C-on összegyűjtöttük, és kétszer mostuk 0,2% KCl-oldattal, hogy eltávolítsuk a tápközeg fennmaradó részét. Az intracelluláris extraktumokat a mosott sejtpellet 10 ml vízbe történő szuszpendálásával és 15 percig 100°C-ra történő hevítésével kaptuk. A felülúszót 15 perces 15 000 x g-n történő centrifugálással elkülönítettük, és

csökkentett nyomás alatt 1 ml-re koncentráltuk.

(c) A THP(A) elkülönítése *S. clavuligerus* sejtkivonatából
A sejtextraktum-mintákat 4 térfogat 1 M ecetsavval elegyítettük a Dowex 50 W-vel történő kromatografáláshoz. Az oszlopot ionmentes vízzel mostuk (az oszloptérfogat ötszörös mennyiségével) a szénhidrátok és a poliolok eltávolítására. A glutamátot és a THP(A)-t 3 M NH OH-val eluáltuk. Az ammóniát teljesen elpárologtattuk, és a maradékot pH=5-re beállítva Dowex 1 anioncserés (acetát-forma), kromatográfiával különítettük el. A glutaminsav az anioncserélő-oszlophoz kötődve maradt, míg a THP(A)-t vízzel eluáltuk.

(d) THP(A) kristályosítása

A fentebb nyert tiszta THP(A)-t forró metanolban oldottuk, és az oldatot desszikatorban hagytuk benzén-gőz mellett kristályosodni. A kristályok 7 nap múlva jelentek meg. Az átlátszó, prizma-alakú 0,2 x 0,1 x 0,05 mm-es kristályokat összegyűjtöttük a röntgensugaras szerkezet-analízishez.

9. példa: THP(A) izolálása és tisztítása *S. griseus* sejtkivonatból

Streptomyces griseus (ATCC 10137) agar-tápközegen (YM) tenyésztettük, mely 1% malátakivonatot, 0,4% élesztőkivonatot, 0,001% CaCl -t, 2% baktoagart és 1 ml nyomelem-sókat tartalmazó törzsoldatot tartalmazott literenként. A fermentációs tápközeg (FM) a következőket tartalmazta: 1,0% glicerin, 0,2% L-aszparagin, 0,06% MgSO₄, 2,9% NaCl, 0,35% K₂HPO₄, 0,68% KH₂PO₄, és 1 ml nyomelemsókat tartalmazó törzsoldat literenként. A nyomelemsó törzsoldat 100 mg FeSO₄ x 7H₂O-t, 100 mg CoCl -t tartalmazott 100

ml vízben. A csíráztató tápközeg (SM) az FM-hez képest további 0,15 élesztőkivonatot és 0,1% NH_4Cl -t tartalmazott.

Az inokulum előállítására a törzseket, mint spóráképző kultúrát YM agar lapokon tároltuk szobahőmérsékleten. A csíráztató tápközeg (200 ml 1 literes Erlenmeyer-lombikban) 1 ml szuszpenzióval oltottuk be, melyet a lemezről 5 ml sóoldattal mostuk le steril körülmények között. A sejteket 30°C -on 210 fordulat/perc-nél forgó-rázó inkubátorban 36 órán át tenyésztettük (végső $\text{OD}_{540} = 3,1$).

Fermentáció. A csírákultúrából a sejteket 15 000 g-s centrifugálással gyűjtöttük össze, sóoldattal mostuk és a sejt-pelleteket szövethomogenizátorban sóoldatban homogenizáltuk. Végül ez a szuszpenzió szolgált az 1 liter FM tápközeg inokulumaként az 5 literes Erlenmeyer-lombikban ($\text{OD}_{540} = 0,400$). A sejteket 30°C -on tenyésztettük, és 210 fordulat/perc-nél forgó-rázó inkubátorban 38 órán át tenyésztettük (végső $\text{OD}_{540} = 1,9$). A micéliumot centrifugálással összegyűjtöttük és mostuk a THP(A) izolálásához, amelyet a fenti 8. példa-szerint hajtottunk végre. A *S. griseus* képes 1500 mg THP(A)-t/ 10 l, 0,5M NaCl-t tartalmazó tenyészközeg felhalmozni, mely sokkal több, mint amit a *S. clavuligerus*sal kaptunk hasonló körülmények között. A 0,5 M NaCl-t tartalmazó tápközegben tenyésztett *S. griseus* párosítatlan proton ^{13}C NMR-spektrumát mutatjuk be a 10. ábrán, és a termelt THP(A)-t mutatjuk be a 11. ábrán tisztítás után.

Szabadalmi igénypontok

1. Gyógyszerkészítmény, mely aktív alkotórészként legalább egy, a 2-metil-4-karboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin [THP(A)], egy sója, 5-étere vagy 5-észtere és a 2-metil-4-karboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin [THP(B)] vagy egy sója közül kiválasztott tetrahidropirimidin-származékot és egy gyógyászati-lag elfogadható hordozót tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, mely 2-metil-4-karboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidint [THP(A)] tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, mely 2-metil-4-karboxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin-t [THP(B)] tartalmaz.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény, mely THP(A)-t és THP(B)-t tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, mely a THP(A)-t és a THP(B)-t ekvimoláris mennyiségben tartalmazza.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény a nem-tumoros szövetekben a DNS védelmére a DNS-kötő szerek károsításával szemben.

7. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény egy antitumor-antibiotikum toxikus hatásainak csökkentésére a rák-kemoterápiában.

8. A 7. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, ahol az antitumor-antibiotikum aktinomicin D.

9. THP(A), THP(B) vagy ezek kombinációjának alkalmazása a nem-tumoros szövetekben a DNS védelmére a DNS-kötő szerek károsításával szemben.

10. THP(A), THP(B) vagy ezek kombinációjának alkalmazása a rák-kemoterápiában egy antitumor-antibiotikum toxikus hatásainak csökkentésére.

11. Eljárás a DNS védelmére nem-tumoros szövetekben egy DNS-kötő szer károsításával szemben egy olyan betegben, akit az említett DNS-kötő szerrel kezelnek, mely eljárás az említett betegnek az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti készítmény hatásos mennyiségének beadását foglalja magában.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, ahol a DNS-kötő szer egy antitumor-antibiotikum.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, ahol az antitumor-antibiotikum aktinomicin D vagy adriamicin.

14. Eljárás egy antitumor-antibiotikum toxikus hatásainak csökkentésére egy rákos betegben, akit az említett antitumor-antibiotikummal kezelnek, mely eljárás a betegnek az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti készítmény hatásos mennyiségének beadását foglalja magában.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol az antitumor-antibiotikum aktinomicin D.

16. Eljárás THP(A) és a THP(B) izolálására és tisztítására egy aktinomicin D termelő *Streptomyces* mikroorganizmus sejtkivonatából, mely eljárás a következő lépésekből áll:

(a) a mikroorganizmus tenyésztése megfelelő tenyésztő tápközegben,

- (b) a sejtek összegyűjtése és sejtkivonat készítése a mosott sejtekből,
- (c) a THP(A) és THP(B) tetrahidropirimidin-származékok elkülönítése a kísérő szénhidrátoktól, polioloktól, aminosavaktól, peptidektől és proteinektől oszlopkromatográfiás szeparációs lépésekkel,
- (d) a THP(A)-t és a THP(B)-tartalmazó oldat ioncserés oszlopkromatografálása, és
- (e) a THP(A) és THP(B) eluálása különböző oldószerekkel lényegében tiszta THP(A)-t és THP(B)-t nyerve.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, ahol a *Streptomyces* törzs *S. parvulus*.

18. A 16. vagy a 17. igénypont szerinti eljárás, melynél a (d) lépésben az ioncsrelő oszlopkromatografálást egy Dowex 50 W (NH_4^+ -forma) oszlopon hajtjuk végre, és az (e) lépésben a THP(A)-t vízzel és a THP(B)-t 3 M ammónium-hidroxiddal eluáljuk.

19. Eljárás THP(A) izolálására és tisztítására kismértékű sóstressz körülményei alatt álló, talajból izolált *Streptomyces* mikroorganizmus sejtkivonatából, mely eljárás a következő lépésekből áll:

- (a) a mikroorganizmus tenyésztése egy megfelelő tenyésztő tápközegben 0,25-0,5 M NaCl-ben,
- (b) a sejtek összegyűjtése és sejtkivonat készítése a mosott sejtekből,
- (c) a THP(A) elkülönítése a kísérő szénhidrátoktól, aminosavaktól és proteinektől néhány oszlopkromatográfiás szeparációs lépéssel,
- (d) a THP(A)-t tartalmazó oldat ioncserés oszlopkromatografálása, és

(e) a THP(A) eluálása vízzel, lényegében tiszta THP(A)-t nyerve.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, ahol a mikroorganizmus *S. clavuligerus* vagy *S. griseus*.

21. Lényegében tiszta 2-metil-4-karboxi-5-hidroxi-3,4,5,6-tetrahidropirimidin, sói, 5-éterei és 5-észterei.

A meghatalmazott

P. Szabó
P. Szabó dr.

Magyarországi Árvízügyi
és Vízgazdálkodási Szakszolgálat
Magyarországi Árvízügyi Szakszolgálat
1051 Budapest, Dózsa György u. 10.
Tel: 111 2 03, Fax: 153-3664

39 leírás oldal

11 ábra oldal

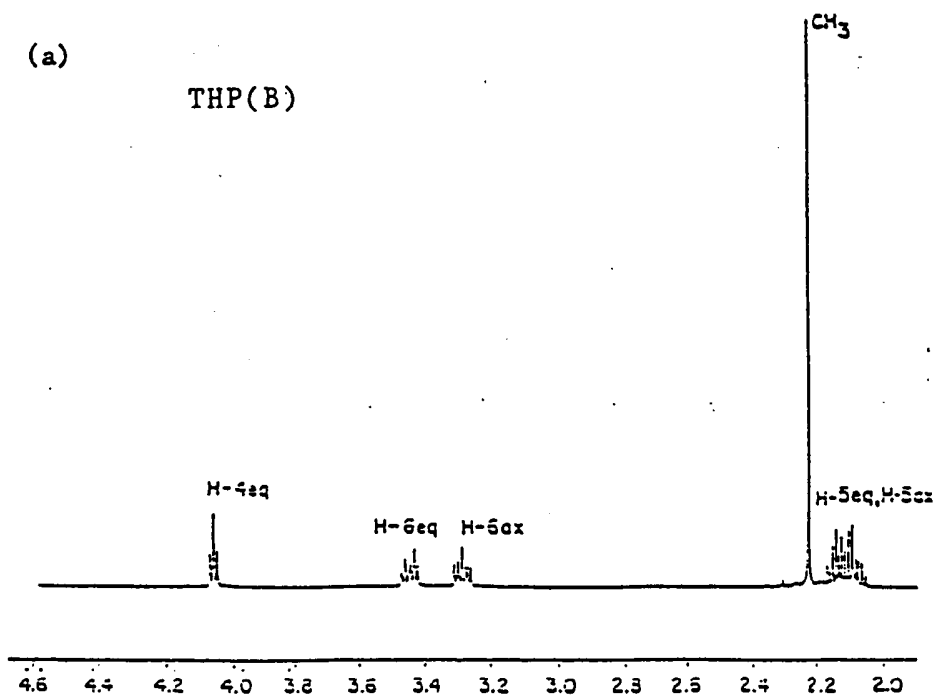
50 oldal

jellemező ábra Ø

Zemur

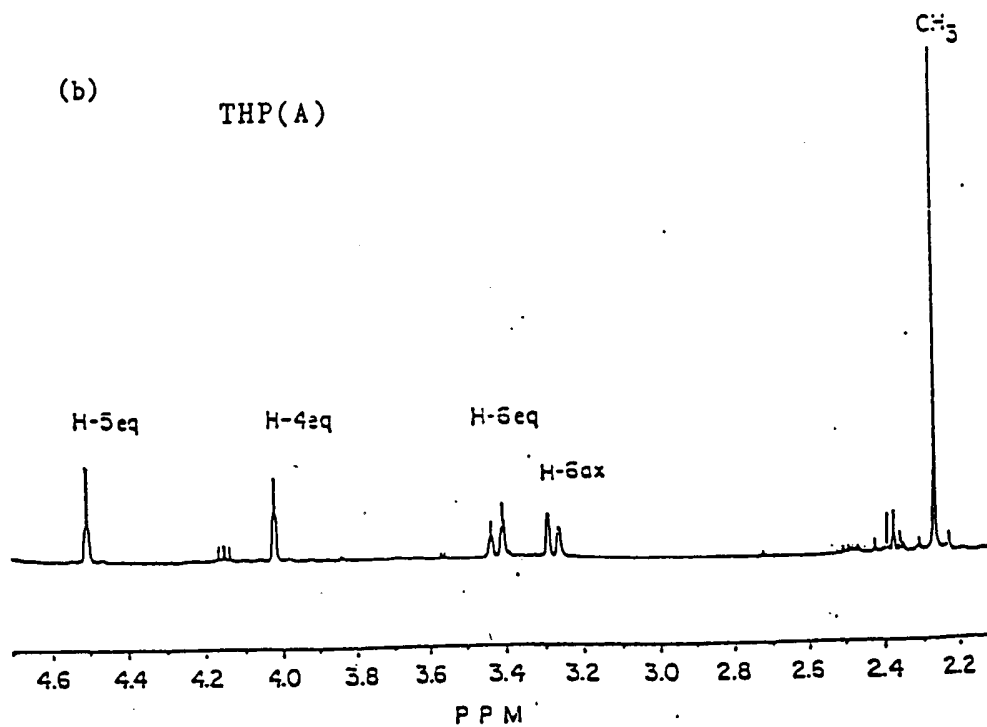
(a)

THP(B)



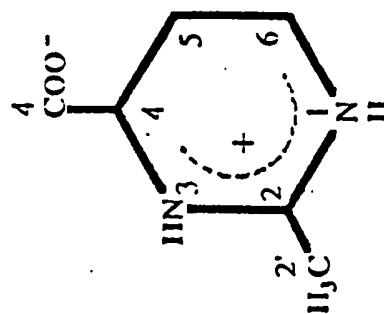
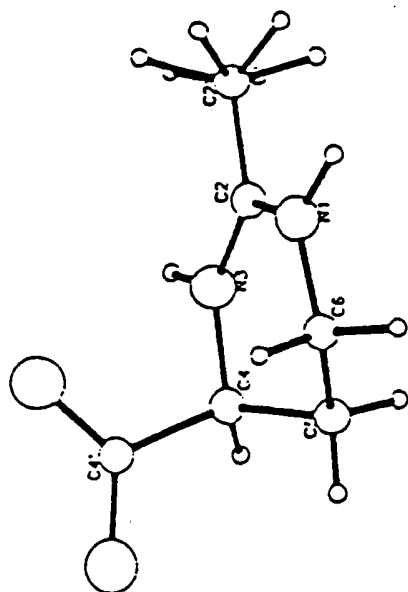
(b)

THP(A)

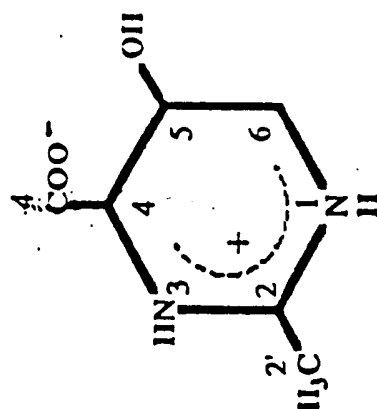
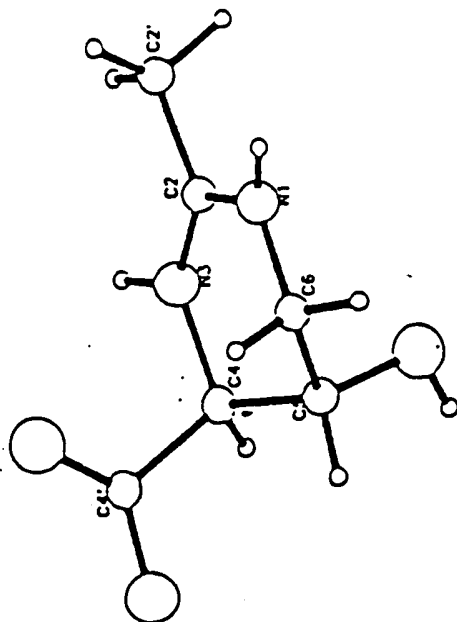


1. ábra

Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664



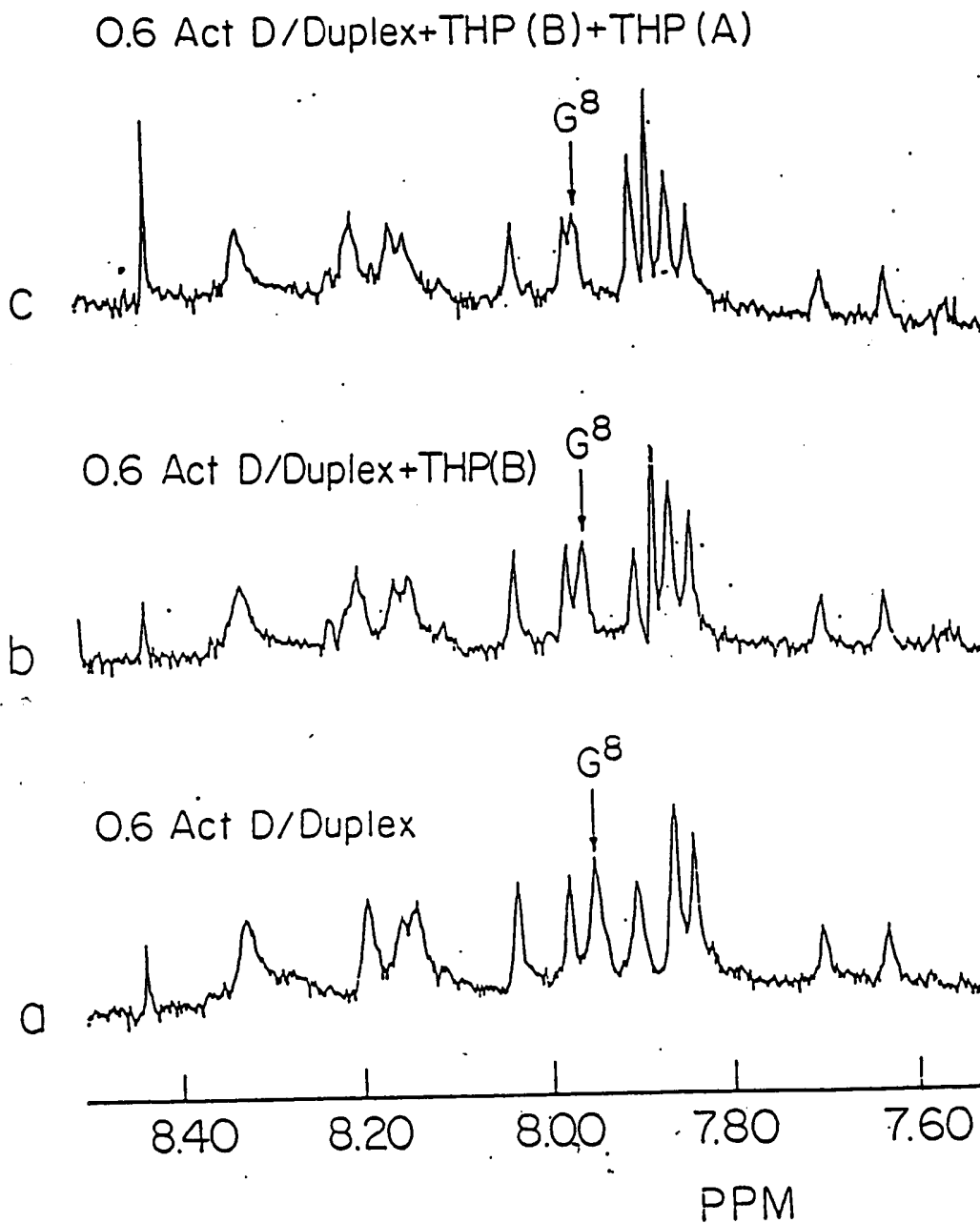
THP (B)



THP (A)

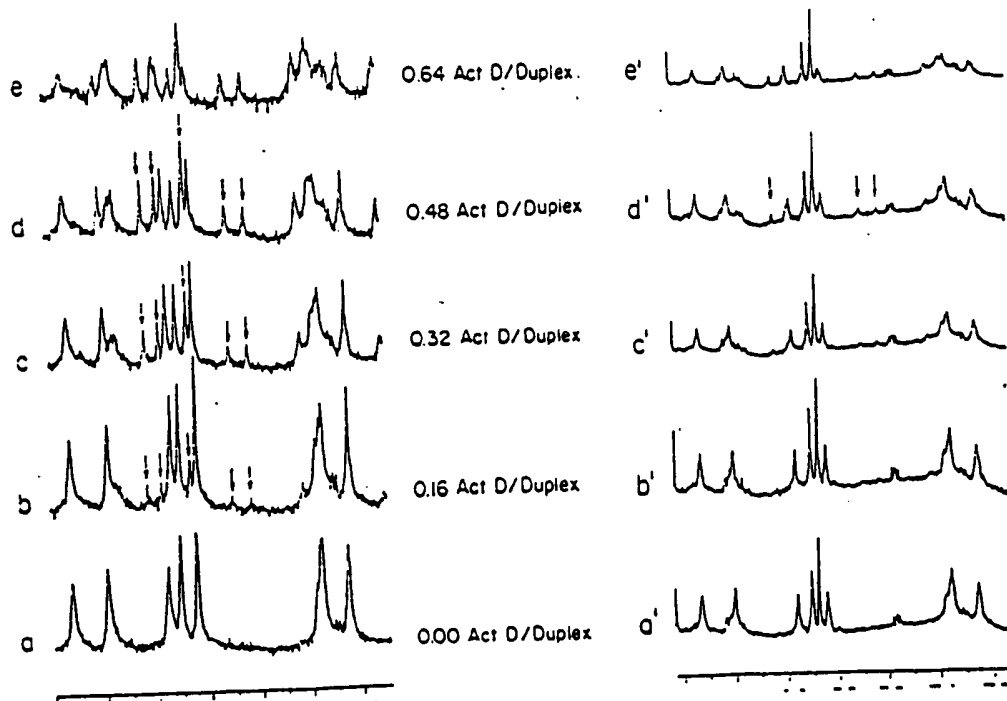
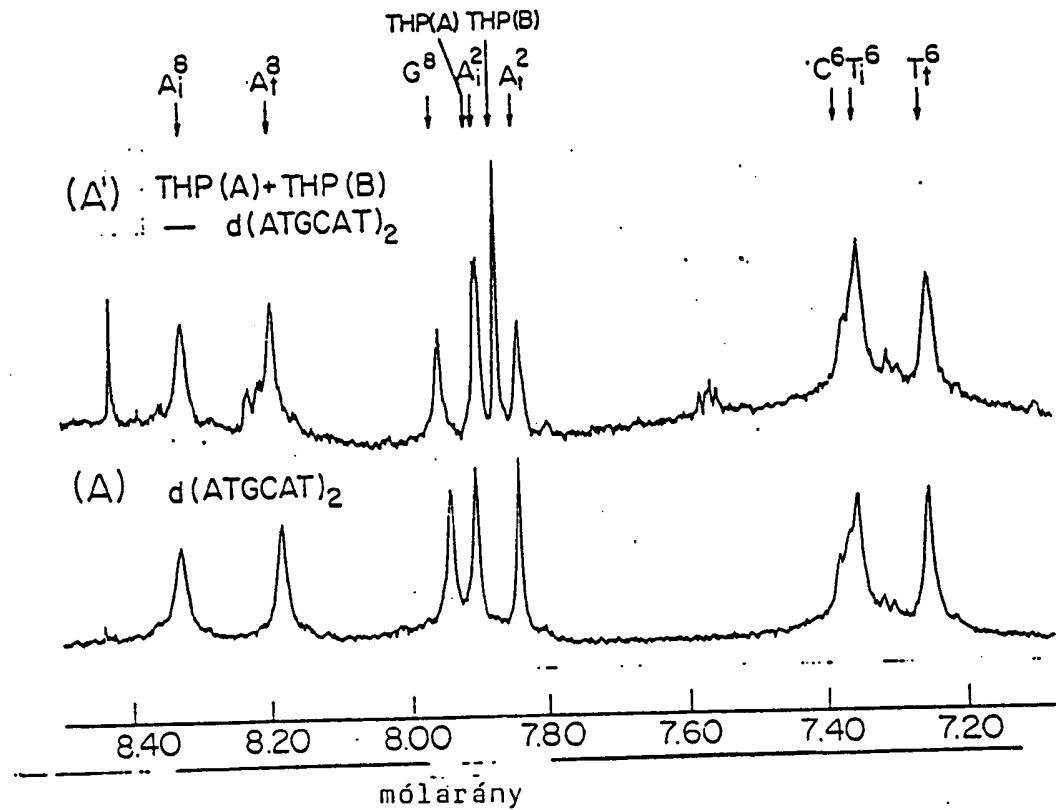
2. ábra

Parruch Szabó dr.
szabószabó dr.
az S.B. (S. B.) (S. B.) (S. B.) (S. B.) (S. B.)
Szabószabó (Szabószabó)
H-1051 Budapest, Dalszabó u. 10.
Tel: 153-3733. Fax: 153-3664

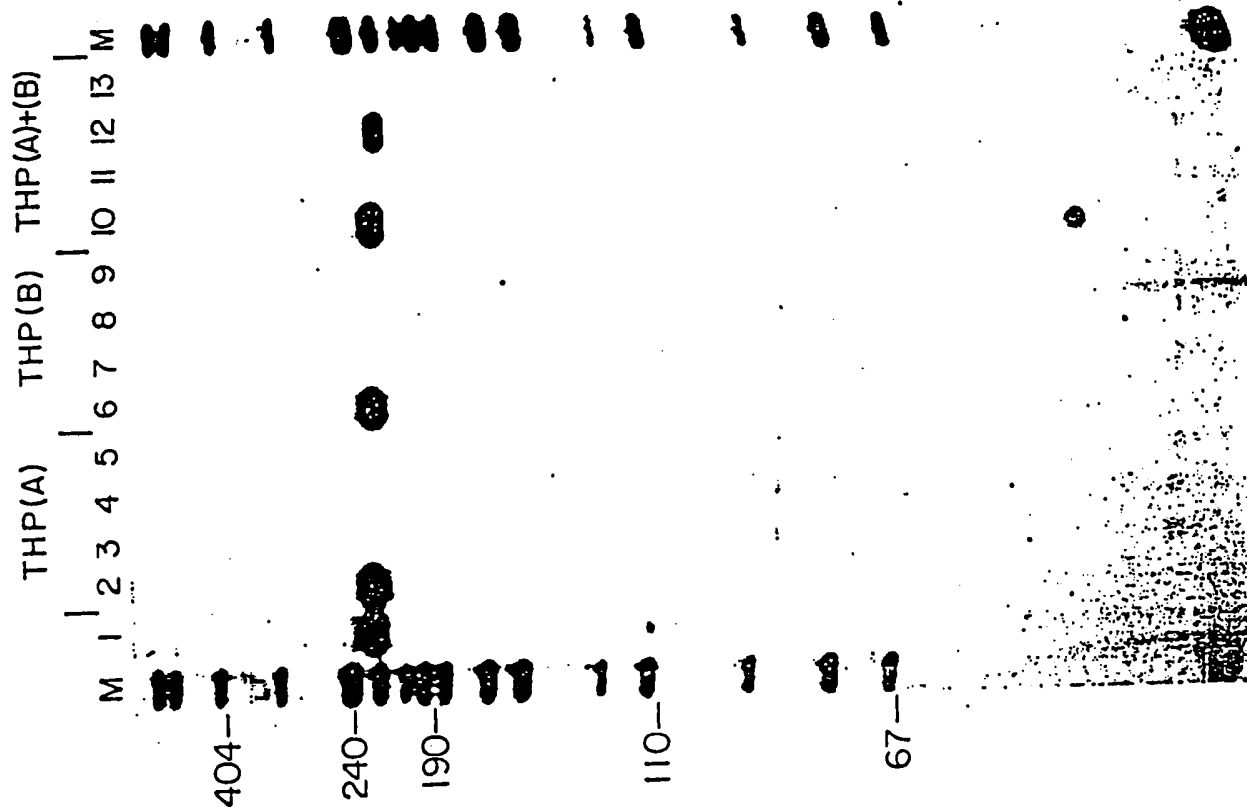


3. ábra

Parragh Gabriella dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & I. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Irodájánál
H-1061 Budapest, Dózsa György u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3464

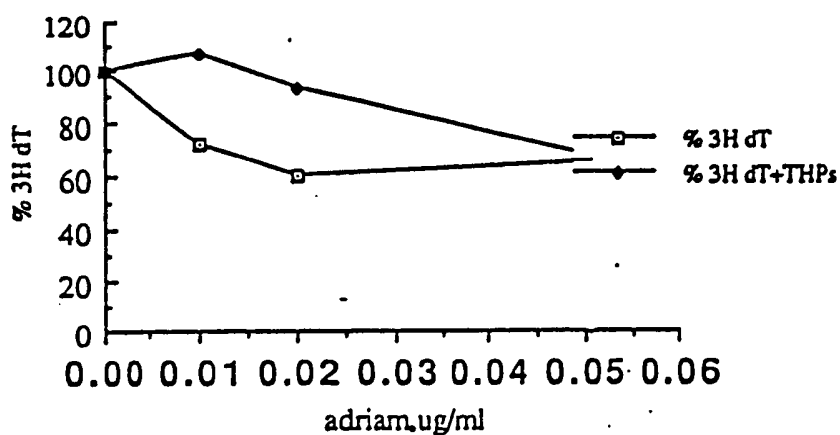


4. ábra.



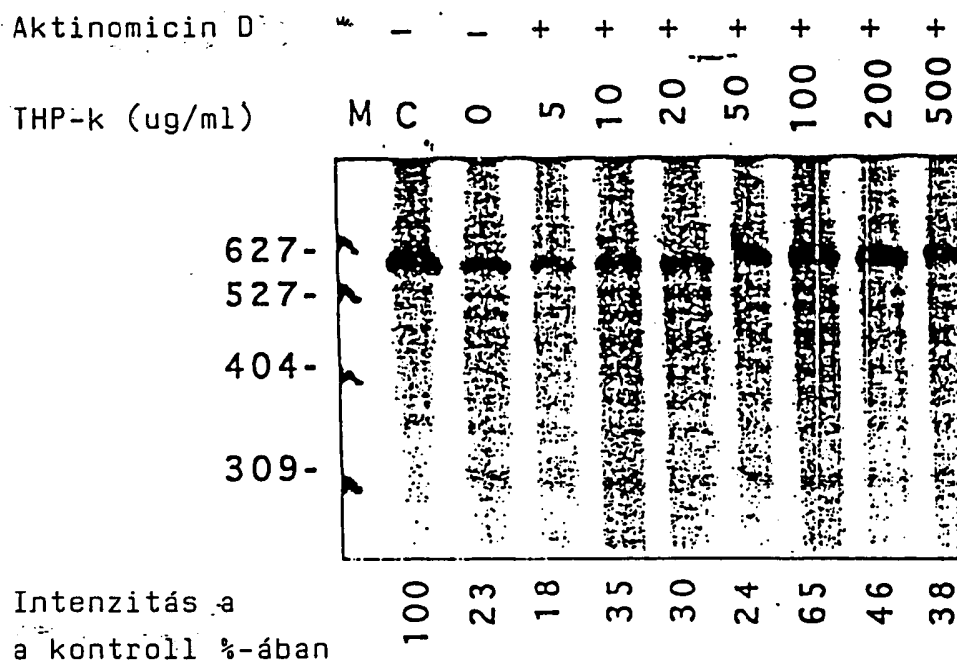
5. ábra

P. Székelyné dr.
 Fűrész Gáborné dr.
 szabadalmi ügyvivő
 az O.H.G. & H. Patentesi Nemzetközi
 Társaságtól (Toda) rajta
 B-1061 Budapest, Dalszentkereszt u. 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664



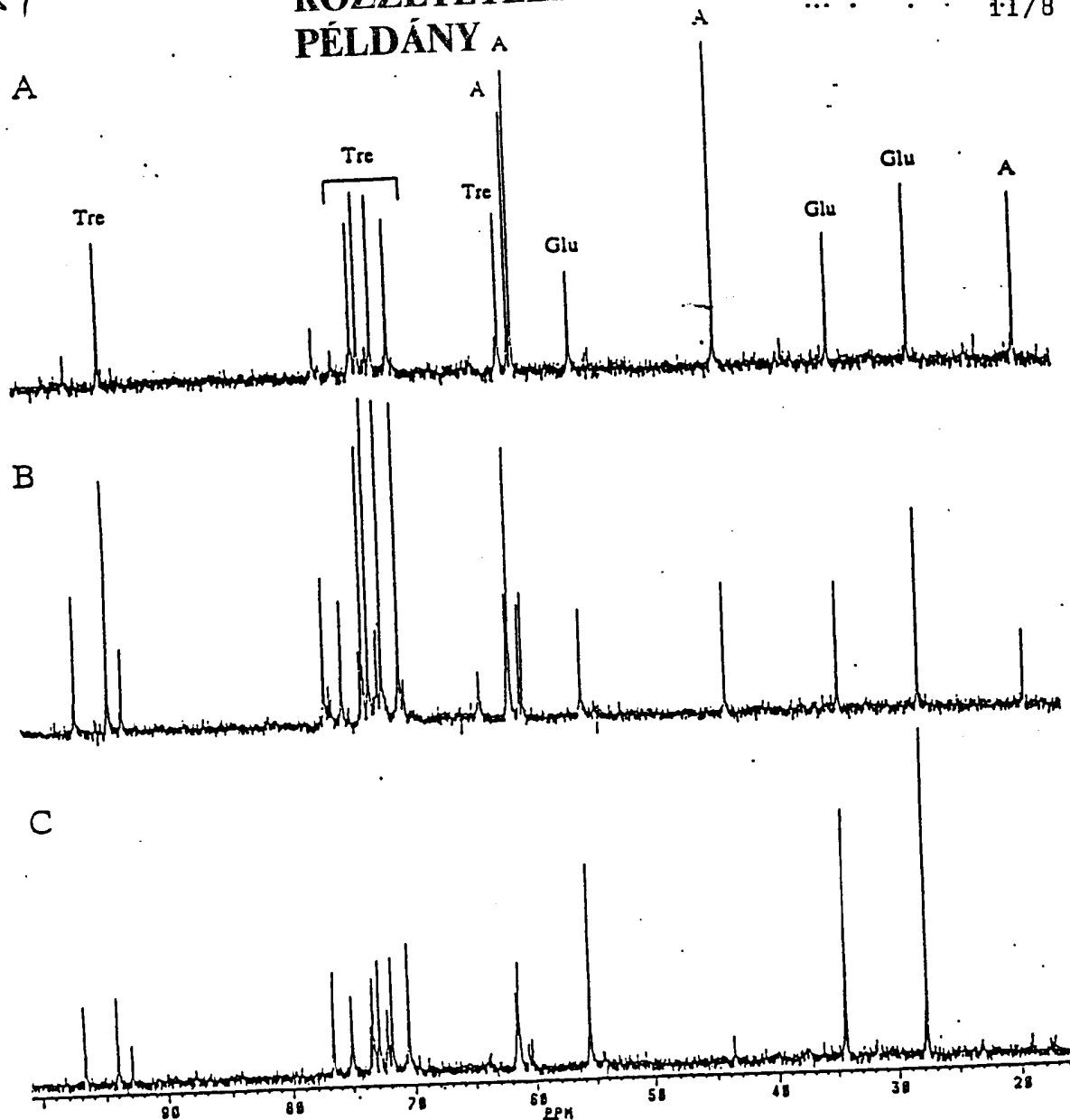
	adriam. ug/ml	% 3H dT	% 3H dT+THPs
1	0.000	100.000	100.000
2	0.010	72.000	107.000
3	0.020	60.000	93.000
4	0.050	65.000	68.000

6. ábra



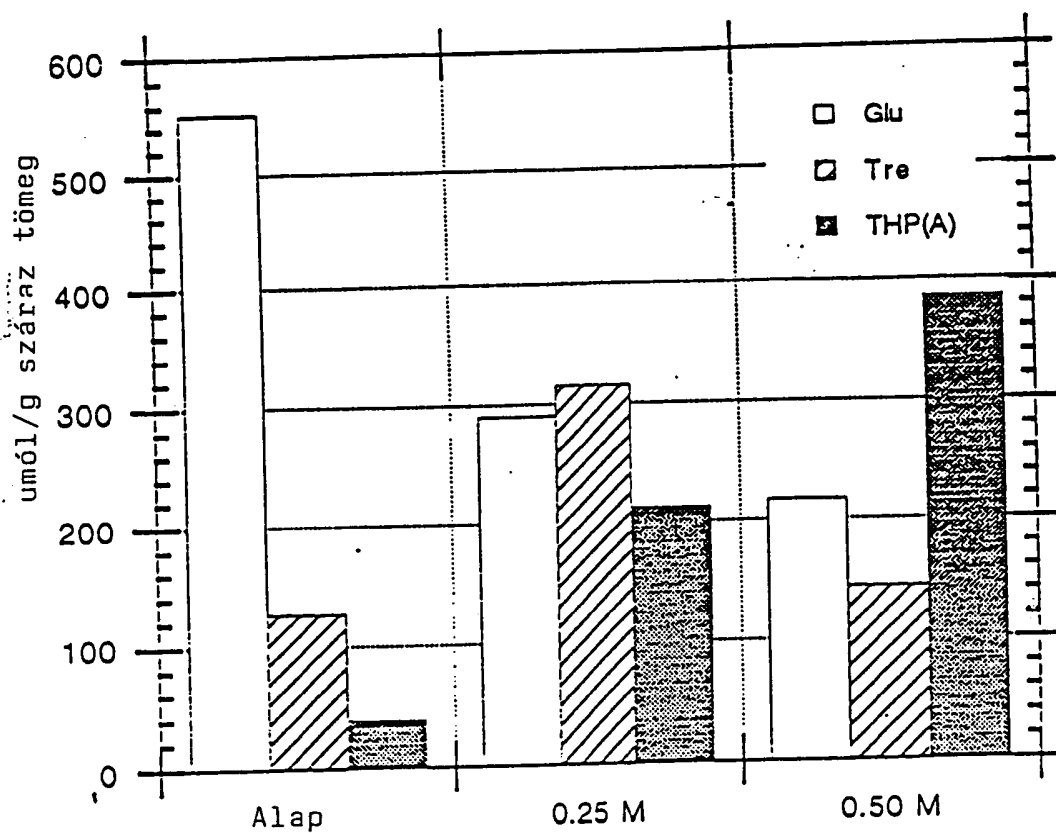
7. ábra

Parragh Csaba dr.
 Parragh Csaba dr.
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.C. & I. Budapesti Nemzetközi
 Szabadalmiroda tagja
 H-1061 Budapest, Dalszentivány u. 10.
 Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664



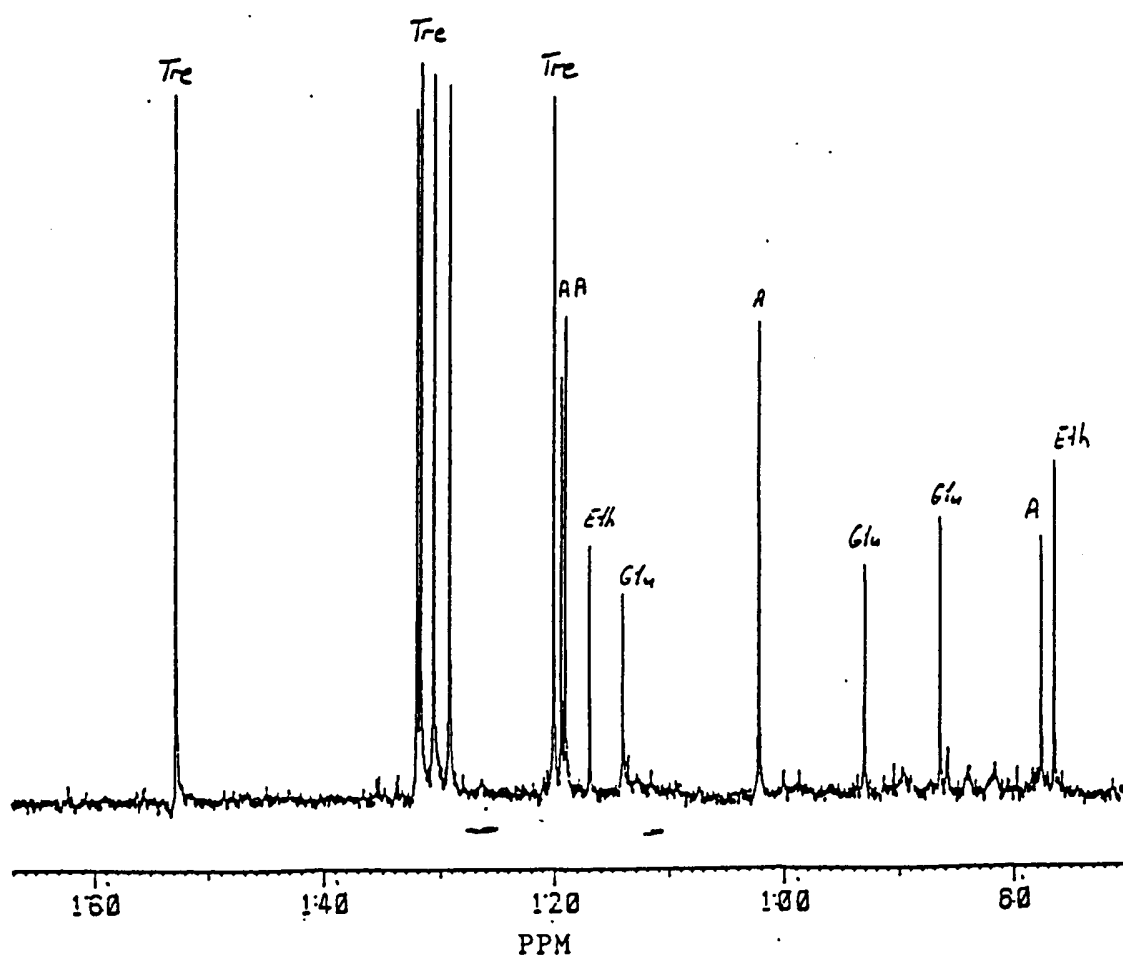
8. ábra

Parragh Csaba dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Patentes Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1051 Budapest, Dalgabaz u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664



9. ábra

Parragh György
Parragh György dr.
szabadalmi ügyvéd
az S.B.C. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Irodában
H-1061 Budapest, Dacsinkácz u. 10.
Telefon: 153-3723, Fax: 153-3664



10. ábra

Farrach Károlyné dr.
szakértői ügyvivő
a 1996. évi V. törvény (Nemzetközi
Szakértői Irányelv)
1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Tel: 153-3733, Fax: 153-3664

11. ábra

