



H U 0 0 0 2 2 1 2 7 6 B 1

(19) Országkód

HU

MAGYAR
KÖZTÁRSASÁGMAGYAR
SZABADALMI
HIVATALSZABADALMI
LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 276 B1

- (21) A bejelentés ügyszáma: P 96 01138
(22) A bejelentés napja: 1994. 10. 27.
(30) Elsőbbségi adatok:
08/146,638 1993. 11. 01. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 94/12302
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/12599

(51) Int. Cl.⁷

C 07 D 491/16

C 07 D 491/22

C 12 P 17/18

A 01 N 43/90

A 61 K 31/40

- (40) A közzététel napja: 1997. 03. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2002. 09. 30.

(72) Feltalálók:

Dombrowski, Anne W., Brunswick, New Jersey (US)
Endris, Richard G., Martinsville, New Jersey (US)
Helms, Gregory L., Fanwood, New Jersey (US)
Hensens, Otto D., Red Bank, New Jersey (US)
Ondeyka, John G., Fanwood, New Jersey (US)
Ostlind, Dan A., Watchung, New Jersey (US)
Polishook, Jon D., Scotch Plains, New Jersey (US)
Zink, Deborah L., Manalapan, New Jersey (US)

(73) Szabadalmaz:

MERCK & Co. Inc., Rahway, New Jersey (US)

(74) Képviselő:

Török Ferenc, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy
Iroda Kft., Budapest

(54)

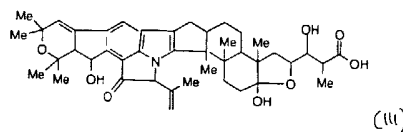
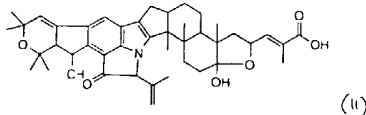
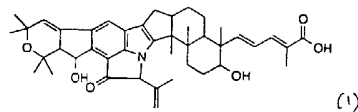
Policiklusos parazitaellenes szerek, eljárás és törzs a vegyületek
előállítására és alkalmazásuk

KIVONAT

A találmány elsődleges tárgyát az (I), (II) és (III) képletű vegyületek képezik. A vegyületek nagyon hatásos ektoparazitaellenes, parazitaellenes és inszekticid szerek.

A találmány további tárgyát ezen vegyületek előállítására szolgáló eljárás képezi, melynek során egy szénforrást, nitrogénforrást és nyomelemforrást tartalmazó közegben egy *Nodulisporium* sp. MF-5954 termelő törzset (ATCC 74245) fermentálnak, és a vegyületeket elkülönítik.

A találmány vonatkozik továbbá a fenti vegyületeket tartalmazó készítményre és az előállítás során alkalmazott tenyésztetre is.



HU 221 276 B1

A találmány új, (I), (II), (III) képletű vegyületekre vonatkozik, amelyek a *Nodulisporium* sp. törzs fermentálásával állíthatók elő. A vegyületek nagyon hatásos ektoparazitaellenes, parazitaellenes és inszekticid szerek.

Vannak jól ismert parazitaellenes szerek, ilyenek például a 4 310 519 és 4 199 569 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett avermektinek. Azonban az ilyen avermektin vegyületek, noha a külső és belső parazitákkal szemben hatásos szerek, szerkezetileg nagyon jelentősen eltérnek a jelen találmány szerinti vegyületektől. Az avermektinek makrociklusos szerek, amelyeket aktinomicetésekből izoláltak, nincsenek kapcsolatban a jelen találmány szerinti policiklusos gomba eredetű metabolitokkal. de Jesus és munkatársai [J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 697–701 (1984)] közleményükben olyan fungális metabolitokat írnak le, amelyeket jantitremekként azonosítanak policiklusos szerkezettel, azonban a jelen találmány szerinti vegyületek néhány szerkezeti eleme hiányzik belőlük.

A jelen találmány új parazitaellenes szerek és ektoparaziticid szerek előállítására vonatkozik. Így a találmány egyik tárgya ilyen új vegyületek rendelkezésre bocsátása. A találmány egy másik tárgya új eljárás ilyen vegyületek előállítására. Egy további tárgy az ilyen vegyületek előállításához használt mikroorganizmusok és az ilyen termelésre alkalmas fermentációs körülmények leírása. A találmány egy még további tárgyát készítmények leírása és a találmány szerinti vegyületeket parazitaellenes szerekként alkalmazó eljárások képezik. A találmány további tárgyai az alábbi leírás olvasásakor válnak nyilvánvalóvá.

Az 1., 2. és 3. ábrán az 1., 2. és 3. vegyület proton magmágneses rezonanciaspektruma látható. Az ábrán több rezonanciacsúcsot „X” jellel láttunk el. Ezek a csúcsok a jelen levő oldószertől származnak, és nem jellemzőek a vegyületek szerkezetére.

Az 1. ábra az 1. vegyület magmágneses rezonanciaspektruma, amelyet 500 MHz-en CD_2Cl_2 oldószemben Varian Unity 500 NMR-spektrométerben vettünk fel 25 °C-on. A kémiai eltolódásokat ppm egységben adjuk meg a TMS-re mint 0 ppm értékre vonatkoztatva, a δ 5,32 oldószercsúcsot használva belső standardként. Csak a meghatározó csúcsokat adjuk meg.

A 2. ábra a 2. vegyület magmágneses rezonanciaspektruma, amelyet 400 MHz-en CD_2Cl_2 oldószemben Varian Unity 400 NMR-spektrométerben vettünk fel 25 °C-on. A kémiai eltolódásokat ppm egységben adjuk meg a TMS-re mint 0 ppm értékre vonatkoztatva, a δ 5,32 oldószercsúcsot használva belső standardként. Csak a meghatározó csúcsokat adjuk, említjük.

A 3. ábra a 3. vegyület magmágneses rezonanciaspektruma, amelyet 300 MHz-en $CDCl_3$ oldószemben Varian XL300 NMR-spektrométerben vettünk fel környezeti hőmérsékleten. A kémiai eltolódásokat ppm egységben adjuk meg a TMS-re mint 0 ppm értékre vonatkoztatva, a δ 7,24 oldószercsúcsot használva belső standardként. Csak a meghatározó csúcsokat említjük.

A jelen találmány egyedi szerkezetű új vegyületekre vonatkozik. A találmány kiterjed a jelen vegyületek új,

a *Nodulisporium* sp. vagy egy mutánsának fermentációs közegében történő előállítására alkalmas eljárására is.

A találmány szerinti vegyületek szerkezete az (I), (II), illetve (III) képlettel jellemezhető.

Ezek a szerkezeti képletek bizonyos helyzetekben nem mutatnak meghatározott sztereokémiát és más helyzetekben meghatározott sztereokémiát mutatnak, és a jelen találmány úgy értendő, hogy minden ilyen sztereoizomert magában foglal. Közelebbről, a különböző aszimmetriacentrumoknál a sztereoizomerek α - vagy β -helyzetbe irányulhatnak, ami a molekula általános síkja alatt, illetve fölött elhelyezkedő szubsztituenteket jelent.

A jelen találmány szerinti vegyületeket elsősorban paraziták, például ízeltlábú paraziták, így kullancsok, tetvek, bolhák, és más, háziállatokban és szárnyasokban előforduló csípő rovarok, így *Tenophalides*, *Ixodes*, *Psoroptes*, *Lucilia* és *Hemotobia* által okozott betegségek kezelésére és/vagy megelőzésére és kezelésére alkalmazzuk. A vegyületek más állatokban, így emberekben előforduló parazitabetegségek kezelésében is hatásosak. A legjobb eredmény eléréséhez alkalmazott optimális mennyiség természetesen a kezelendő állat fajtától, és a parazitafertőzés típusától és súlyosságától függ. Az új vegyületeinkkel általában jó eredményeket érhetünk el körülbelül 0,001 és körülbelül 100 mg/kg állattesttömeg közötti mennyiség, az ilyen teljes dózis egy alkalommal vagy osztott dózisban történő beadásával aránylag rövid idő, például 1–5 nap alatt. A jelen találmány szerinti vegyületek alkalmazásával kiválóan irtathatjuk az ilyen parazitákat, ha az állatnak a vegyület körülbelül 0,025 és körülbelül 50 mg/testtömeg kg közötti mennyiségét egyetlen dózisban beadjuk. Ismételt kezelést akkor végzünk, ha az újrafertőzés elleni küzdelem miatt erre szükség van, és ez a parazita fajtától és az alkalmazott állattartási módszerektől függ. Azokat a módszereket, amelyek ezen anyagok állatoknak történő beadására szolgálnak, az állatgyógyászati szakemberek ismerik.

A jelen vegyület hatásos háztartásban előforduló kártevők, így csótány (svábbogár), *Blattella* sp., hangyák, *Solenopsis ruhamoly*, *Tineola* sp., múzeumbogár, *Attagenus* sp. és a házilégy *Musca domestica* esetében is.

A jelen találmány szerinti vegyületek tárolt magvak rovarkártevőivel, így a *Tribolium* sp., *Tenebrio* sp. ellen, és a mezőgazdasági növények kártevőivel, például a szövőlepkével (*Tetranychus* sp.), levéltetvekkel, *Acyrtiosiphon* vándor egyenesszárnyúakkal, így sásakakkal, és a kifejeletlen állapotban levő, növényiszöveteken élő rovarokkal szemben is használhatók. A vegyületek nematocidokként is alkalmazhatók talaj nematódák és növényi élősködők, így *Meloidogyne* sp. irtására, ami a mezőgazdaság területén jelentős lehet.

A jelen vegyületeket orálisan dózisegység alakjában, így kapszula, bólusz vagy tableta formájában, vagy folyékony alakban, ami általában a hatóanyag vizet, szuszpendálószerrel, például bentonittal és nedvesítőszerekkel vagy hasonló segédanyaggal készült oldata, szuszpenziója vagy diszperziója. Általában a folyékony

szerek habzástgátló anyagot is tartalmaznak. A folyékony készítmények általában körülbelül 0,001 és körülbelül 1,0 tömeg% közötti mennyiségű, előnyösen körülbelül 0,01 és körülbelül 0,1 tömeg% közötti mennyiségű hatóanyagot foglalnak magukba. A kapszulák és bóluszkok a hatóanyagot hordozóval, vivőanyaggal, így keményítővel, talkummal, magnézium-sztearáttal vagy dikalcium-foszfáttal együtt tartalmazzák.

Ahol a jelen találmány szerinti vegyületeket száraz, szilárd dózis formában kívánjuk adagolni, a találmány szerinti vegyület kívánt mennyiségét tartalmazó kapszulákat, bóluszkokat vagy tablettákat alkalmazunk. Ezeket a dózisformákat úgy készítjük, hogy a hatóanyagot alkalmas, finom eloszlású hígítóanyaggal, töltőanyaggal, szétteszt elősegítő szerrel és/vagy kötőanyagokkal, így keményítővel, laktózzal, talkummal, magnézium-sztearáttal, növényi gumikkal és hasonlókkal bensőségesen és egyenletesen elkeverjük. Az ilyen egységdózis-készítmények tág határok között változhatnak teljes tömegük és parazitaellenesszer-tartalmuk tekintetében olyan tényezők függvényében, mint a kezelendő állat típusa, a fertőzés súlyossága és típusa és a gazdaállat tömege.

Amennyiben a jelen találmány szerinti vegyületeket állati takarmánnyal kívánjuk adagolni, azokat a takarmányban bensőségesen diszpergáljuk, vagy topdresszingsként használjuk vagy szemcséket készítünk, amelyeket a kész takarmányhoz adunk vagy adott esetben külön etetünk. Más esetben a találmány szerinti parazitaellenes vegyületeket parenterálisan, így intraruminális, intramuszkuláris, intratracheális vagy subkután injekció formájában adagolhatjuk, ekkor a hatóanyagot folyékony hordozóban oldjuk vagy szuszpendáljuk. Parenterális beadásra a hatóanyagot megfelelően egy elfogadható vivőanyaggal, előnyösen növényi olajjal, így földimogyoró-olajjal, gyapotmagolajjal és hasonlóval keverjük. Más parenterális vivőanyagokat, így szolketált, glicerint, formolt alkalmazó szerves készítményeket és vizes parenterális készítményeket szintén használunk. A jelen találmány szerinti vegyületeket a parenterális készítményben oldjuk vagy szuszpendáljuk adagolás céljára; az ilyen készítmények a találmány szerinti vegyületet általában körülbelül 0,55 és körülbelül 5 tömeg% közötti mennyiségben tartalmazzák.

Amikor az itt leírt vegyületeket az állati takarmány komponenseként vagy az ivóvízben oldva vagy szuszpendálva adagoljuk, akkor olyan készítményeket állítunk elő, amelyekben a hatásos vegyületeket egy közömbös hordozóval vagy hígítóanyaggal bensőségesen elkeverjük. A közömbös hordozó olyan anyagot jelent, amely nem reagál a parazitaellenes szerrel, és amely biztonsággal adható az állatoknak. A takarmánnyal történő adagolás esetén a hordozó előnyösen olyan vagy olyan lehet, amely az állat napi takarmányadagjának egy komponense.

Megfelelő készítmények többek között a takarmánypremixek vagy -kiegészítők, amelyekben a jelen találmány szerinti vegyületek aránylag nagy mennyiségben vannak jelen, és amelyek alkalmasak az

állat közvetlen takarmányozására, vagy a takarmányhoz adhatók közvetlenül vagy egy közbelső hígítási vagy keverési lépés után. Jellemző hordozók vagy hígítóanyagok, amelyek az ilyen készítményekhez megfelelnek, többek között a szárított törköly, kukoricaliszt, citrusliszt, fermentációs maradékok, őrölt kagylóhéj, búzaderce, oldható melasz, tengericső-őrlemény, ehető babőrlemény, szójadara, tört mészke és hasonló. A jelen találmány szerinti vegyületeket bensőségesen összekeverjük a hordozóval például aprítással, keveréssel, őrléssel vagy koptatással. A körülbelül 0,005% és körülbelül 2,0 tömeg% közötti mennyiségű jelen találmány szerinti vegyületet tartalmazó készítmények különösen megfelelő takarmánypremixek. A takarmánykiegészítők, amelyeket közvetlenül az állatnak adunk, körülbelül 0,0002% és körülbelül 0,3 tömeg% közötti mennyiségű találmány szerinti vegyületet foglalnak magukban.

Az ilyen kiegészítőket az állati takarmányhoz olyan mennyiségben adjuk, hogy a kész takarmányban a hatóanyag koncentrációja a parazitaetlegések kezelésére és szabályozására kívánatosnak megfeleljen. Noha a jelen találmány szerinti vegyületek kívánatos koncentrációja az előzőekben említett tényezőktől, valamint az alkalmazott vegyülettől függően változik, a találmány szerinti vegyületeket általában körülbelül 0,001 és körülbelül 0,2 tömeg% közötti mennyiségben alkalmazzuk a takarmányban a kívánt parazitaellenes hatás elérése érdekében.

Emellett, ahol a vegyületet az állati takarmányhoz adjuk, a fermentációból származó szárított micéliumot is használhatjuk. A micélium az aktivitás nagyobb részét tartalmazza, és mivel a micéliumban az aktivitás szintje meghatározható, a micéliumot közvetlenül adhatjuk az állati takarmányhoz.

A jelen találmány szerinti vegyületek olyan mezőgazdasági kártevők irtására is használhatók, amelyek a termésre növekedés közben vagy tárolás során fejtik ki káros hatásukat. A vegyületeket ismert módszerekkel, például spray, por, emulzió formájában visszük fel a növényben levő vagy raktározott terményre az ilyen mezőgazdasági kártevőktől való védelem céljából.

A jelen találmány szerinti vegyületek parazitaellenes hatását orálisan, takarmányban adagolva határozhatjuk meg, az egyes vegyületek egy mintáját, az ilyen vegyületek keverékét, egy tömény extraktumot és hasonlókat olyan egérnek adunk be, amelyet három nappal korábban egy megfelelő élősködővel megfertőztünk. A kezelés megkezdésétől számított 11., 12. és 13. napon az egér ürülékét peték tekintetében megvizsgáljuk, majd a következő napon az egeret megöljük, és a vékonybél proximális részében jelen levő férgeket megszámoljuk. Egy vegyületet akkor tekintünk hatásosnak, ha a peték és férgek száma jelentősen csökken a fertőzött, kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva.

A jelen találmány szerinti új vegyületeket egy, a *Nodulisporium* gombanemzetséghez tartozó törzs fermentálásával állítjuk elő. Egy ilyen tenyészetet elhelyeztünk a Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey tenyészetgyűjteményében, MF-5954 azonosító szám-

mal. Az MF-5954 egy termelő törzsét az American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852) állandó gyűjteményébe letétbe helyeztünk, és ez a 74245 hozzáférési számot kapta. A letétbehelyezés 1993. szeptember 21-én történt a mikroorganizmusok szabadalmi eljárás céljára történő letétbehelyezésének nemzetközi elismerésére vonatkozó Budapesti Egyezménynek megfelelően.

A *Nodulisporium* sp. MF-5954 morfológiai és tenyésztési jellemzői a következők:

Az MF-5954-t (L-954 967-et termel) mint JP337-et, egy endofita gombaként izoláltuk fás növényi szövetből Bills és Polishook (1991) felületsterilizációs módszerével. A következő leírásban a zárójelben levő színmegnevezések Ridgway-től (1912) származnak.

Kukoricaliszt agaron (Difco) 6 nap elteltével 25 °C-on, 50% relatív nedvesség jelenlétében és 12 órás fluoreszcens fény fotoperiódus alkalmazása mellett a telep átmérője eléri a 42 mm-t. A telepszőnyeg lesüllyedve nő, a felülete nemezzszerűen tömörített, szintelen mindennűt; váladék és oldható pigment nincs jelen; a fonák szintelen; édes aromás szag érezhető.

Zabliszt agaron (Difco) a telep 6 nap után, ugyanolyan körülmények között 42 mm átmérőjű. A telepszőnyeg helyenként gyapotszerűen tömörödik, a telep közepe sárgásbarna (Mars Yellow, Raw Sienna), a széle felé világos sárgásbarna (Light Orange Yellow, Antimony Yellow); a szél teljes, fehér; váladék, szag és oldható pigment nincs jelen; a fonák világosbarna.

Burgonyaszacharóz agaron (Singleton és munkatársai, 1992) a telep átmérője 6 nap után, azonos körülmények között eléri a 42 mm-t. A telepszőnyeg helyenként gyapotszerűen tömörödik, vörösbarna (Light Russet-Vinaceous) színű a telep közepén, a széléig áttetszővé halványul, a szél rosszul fejlett; váladék, szag és oldható pigment nincs jelen; a fonák vörösbarna (Dark Vinaceous).

37 °C-on, kukoricaliszt agaron és sötétben a telep átmérője 6 nap alatt eléri a 82 mm-t; a telepszőnyeg mindenütt gyapotszerű, kivéve az inokulálási pontot, ahol a telepszőnyeg összetömörödött, fehér; a szél teljes, fehér; váladék és oldható pigment nincs jelen; a fonák szintelen; édes aromás szag érezhető.

A hifák áttetszőtől világos barnáig változnak, harántirányú falakkal szétválasztottak (szeptáltak), vékony falúak, 2,5–3,5 µm szélesek. A konidioforok egyfonalassak, kiállóak, 150–400 × 3,0–4,0 µm méretűek, penicillinszerűen elágazóak, áttetszőtől világosbarna színűig változnak, harántirányú falakkal elválasztottak, vékony falúak, simától enyhén érdesen át szemölcsösig változó felületűek, esetenként olajzöld, gömbölyű kiemelkedésekkel (2,5 µm átmérő). A konidiogén sejtek holoblasztikusak, terminálisak, 16–24 × 1,5–2,0 µm méretűek, finoman érdestől szemölcsösig változnak, hengeresek, a csúcson szabálytalanok. A konidiumok tojás alakútól hosszúkás elliptikus alakúig változnak csonkolt kapcsolódási ponttal, 4,1–5,7 × 1,6–2,5 µm méretűek, áttetszőek, nem szeptáltak, vékony falúak, a konidiogén sejt csúcán áltengelyesen termelődnek, csúcsirányú nyalábot alkotva a denticaliákon.

Az MF-5954-et a *Nodulisporium* gombanemzetségben (Hyphomycetes, Deuteromycotina) helyeztük el. Ennek a nemzetségnek a kulcstaxonómiai jellemzői közé tartoznak az egyfonalass konidioforok, amelyek jellemzően elágazóak, és az, hogy a konidium termelése áltengelyes. Emellett, a konidiumokat tartó területek terminálisak vagy interkalárisak és csomósak a konidiumtermelés következtében (Jong and Rogers, 1972). Ezek a jellemzők megkülönböztetik a *Nodulisporium* nemzetséget más hasonló gombáktól, így a *Geniculosporium*tól, a *Xylocadium*tól és az *Ustilina*tól. Ezek a nemzetségek sok xilariaszerű (Ascomycotina) gomba, így *Hypoxylon*, *Xylaria*, *Rosellinia* ivartalan (anamorf) állapotai.

A legtöbb *Nodulisporium* izolátumtól eltérően az MF-5954 jól nő 37 °C-on, de tenyészetben nem mutat semmilyen más megkülönböztető jellemzőt, amely alapján ismert fajtákhoz lenne sorolható. Ezért *Nodulisporium* sp.-nek nevezzük.

Idézett irodalom

1. Bills G. F. and Polishook J. D. 1991. „Microfungi from *Carpinus caroliniana*”, Can. J. Bot. 69(7): 1477–1482.
2. Jong S. C. and Rogers J. D. 1972. „Illustrations and descriptions of conidial states of some *Hypoxylon* species” Wash. State Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 71. 51 p.
3. Ridgway R. 1912. Color standards and color nomenclature. Pub. by the author, Washington, D. C. 43p. + 53 példaul
4. Singleton L. L., Mihail J. D. and Rush C. M. (Eds). 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi, appendix A, p. 247, APS Press, St. Paul, Minnesota.

A jelen találmány szerinti vegyületeket megfelelő szilárd vagy vizes táptalaj aerob fermentációjával állítjuk elő a későbbiekben leírt körülmények között, egy *Nodulisporium* sp. termelő törzsszel. Ezen policiklusos vegyületek előállításának eljárásában való alkalmazásra sok antibiotikus anyag termelésére használt vizes és szilárd táptalaj megfelelő.

Az ilyen táptalajok a mikroorganizmus által asszimilálható szén- és nitrogénforrást, és általában kis mennyiségben szervesen sokat tartalmaznak. Emellett a fermentációs közeg a mikroorganizmusok növekedéséhez és a kívánt vegyületek termeléséhez szükséges fémek nyomait is magukban foglalhatják. Ezek általában elegható koncentrációban vannak jelen a komplex szén- és nitrogénforrásokban, amelyeket tápanyagforrásként használhatunk, de ezeket természetesen külön is a közeghez adhatjuk, amennyiben kívánjuk.

Általában a szénhidrátok, így a cukrok, például a glükóz, szacharóz, maltóz, laktóz, dextrin, cerelóz, kukoricaliszt, zabliszt és hasonlók, és a keményítők megfelelő asszimilálható szénforrások a táptalajban. A közegben használt szénforrás pontos mennyisége részben a közeg más komponenseitől függ, de általában úgy találjuk, hogy 1 és 150 g/liter közötti szénhidrát-

mennyiség a közegben kielégítő. Ezeket a szénforrásokat külön-külön, vagy néhány ilyen szénforrást kombinálva is használhatunk ugyanabban a táptalajban.

Különféle nitrogénforrásokat, például az élesztőhidrolizátumokat, élesztőautolizátumokat, élesztősejteket, paradicsompürét, kukoricalisztet, zablisztet, szójalisztet, kazeinhidrolizátumokat, élesztőextraktumokat, kukoricaáztató leveket, oldható desztillációs maradékokat, gyapotmaglisztet, húsextraktumot és hasonlókat, a *Nodulisporium* sp. könnyen asszimilálja a jelen vegyületek termelése során. A különféle nitrogénforrásokat önmagukban vagy kombinációban 1–5 g/liter mennyiségben használhatjuk a táptalajban.

A tápláló szervesen sók között, amelyeket a tenyészközegbe foglalunk, azok a szokásos sók találhatók, amelyek nátrium-, kálium-, magnézium-, ammónium-, kalcium-, foszfát-, szulfát-, klorid-, karbonát- és hasonló ionokat eredményeznek. Ide tartoznak a nyomelemek, így a vas, cink, mangán, réz, bór, molibdén is.

Meg kell jegyeznünk, hogy az alábbiakban és a példákban leírt táptalajok az alkalmazható táptalajok széles körének bemutatására szolgálnak, és nem korlátozó jellegűek.

A következő táptalajpéldák alkalmasak a *Nodulisporium* sp. MF–5954, ATCC 74245 törzseinek növesztésére:

Ferde táptalaj összetétele

Élesztőextraktum	4 g
Malátaextraktum	10 g
Glükóz	4 g
Bacto Agar	20 g
Desztillált víz	1000 ml
pH 7,0	

Oltó- és termelőtáptalaj összetétele

Oltótáptalaj

Komponens	g/l
Élesztőextraktum	4,0
Malátaextraktum	8,0
Glükóz	4,0
Junlon	1,5

A táptalajt desztillált vízzel készítjük, a pH-t sterilizálás előtt 7,0-re állítjuk, és belőle 250 ml-es nemcsiszolatos Erlenmeyer-lombikokba 50–50 ml-t töltünk. A lombikokat vattával zárjuk le. A sterilizálást 121 °C-on 20 percig végezzük.

Termelőtáptalaj

A) termelőtáptalaj

1. Szilárd rész:

1250 ml vermikulitot 4 literes forgólombikba mérünk. A lombikot latexszel dugjuk be; 60 percig autoklávnban, plusz 30 percig szárazon sterilizzük.

2. Folyadék rész:

Komponens	g/l
Glükóz	150,0
Karbamid	4,0
NZ amin A) típus	4,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25
KCl	0,25

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,9
CaCO ₃	16,5

A táptalajt desztillált vízzel készítjük (a pH-t nem állítjuk be). 1 literes Erlenmeyer-lombikokba 425–425 ml-t töltünk. A lombikokat vattával bedugjuk, és a táptalajt 121 °C-on 15 percig sterilizzük.

B) Termelőtáptalaj

Komponens	g/l
Glicerín	75,0
Glükóz	10,0
Ardamin PH	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
Szójaliszt	5,0
Paradicsompüré	5,0
Nátrium-citrát	2,0

A táptalajt desztillált vízzel készítjük, a pH-t sterilizálás előtt 7,0-re állítjuk. A táptalaj 50 ml-es részleteit 250 ml-es Erlenmeyer-lombikokba öntjük. A lombikokat vattával lezárjuk, és 121 °C-on 20 percig autoklávozzuk.

A fermentációt *Nodulisporium* sp. alkalmazásával körülbelül 20 és körülbelül 40 °C közötti hőmérsékleten végezhetjük. Optimális eredmények elérése érdekében a legelőnyösebb ezeket a fermentációkat körülbelül 22 és körülbelül 36 °C közötti hőmérsékleten vezetni. A körülbelül 22 °C és körülbelül 27 °C közötti hőmérséklet a legelőnyösebb. A táptalajnak a jelen találmány szerinti vegyületek előállítására alkalmas pH-ja körülbelül 6,5 és körülbelül 8,0 között változhat, a körülbelül 6,8 és körülbelül 7,3 közötti pH-tartomány előnyös.

Kis mennyiségek alkalmazásával a fermentációkat kényelmesen úgy végezzük, hogy a táptalaj megfelelő mennyiségeit lombikba helyezzük ismert steril módszerek alkalmazásával, a lombikot beoltjuk a *Nodulisporium* sp. spóráival vagy vegetatív sejtenyészetével, a lombikot vattával lazán bedugjuk, és hagyjuk a fermentációt lejártszódni állandó, körülbelül 25 °C-os szobahőmérsékleten forgó rázólabdikban, 95–300 fordulatszám mellett, körülbelül 7–35 napon át. Nagyobb mennyiséggel végzett munkánál előnyös a fermentációt olyan megfelelő tankokban végezni, amelyek keverővel és a fermentációs közeg levegőztetésére alkalmas szerkezettel vannak ellátva. A tápközeget a tankban állítjuk elő, és sterilizálás után a *Nodulisporium* sp. vegetatív sejtenyészetével oltjuk be. A fermentációt 7–25 napon át folytatjuk, miközben a táptalajt keverjük és/vagy levegőztetjük körülbelül 22–27 °C-on. A levegőztetés mértéke több tényezőtől, így a fermentor méretétől, a keverés sebességétől és hasonlóktól függ. Általában a nagyobb méretű fermentációkat körülbelül 95–300 fordulatszámmal keverjük és körülbelül 50–500 liter/perc levegőt bocsátunk át rajtuk.

A teljes fermentléből a találmány szerinti vegyületek elválasztását és a vegyület kinyerését oldószeres extrakcióval és kromatográfiás frakcionálás alkalmazásával végezzük, amihez különféle kromatográfiás eljárásokat és oldószerrendszereket használunk.

A találmány szerinti vegyületek vízben kevésbé oldódnak, de szerves oldószerekben oldhatók. Ezt a tulaj-

donságot jól kihasználhatjuk a vegyületeknek a fermentáléból való kinyerésére. Így az egyik kinyerési módszernek megfelelően az egész fermentáléhoz megközelítőleg azonos térfogatú szerves oldószert adunk. Noha bármely szerves oldószert alkalmazható, előnyös vízzel nem elegyedő oldószert, például etil-acetátot, metiléndikloridot, kloroformot és hasonlókat alkalmazni. Általában több extrakció kívánatos a maximális hozam eléréséhez. Az oldószert a találmány szerinti vegyületek mellett más anyagokat is kivon, amelyeknek nincs a találmány szerinti vegyületekhez hasonló parazitaellenes hatása. Ha az oldószert vízzel nem elegyedő, a réteget elválasztjuk, és az oldószert csökkentett nyomáson lepároljuk. A maradékot kromatográfiás oszlopra visszük, amely előnyösen szilikagél tartalmaz. Az oszlop visszatartja a kívánt terméket, és mellette még valamennyi szennyezőt, de a szennyezés nagy részét, különösen a nempoláros szennyezéseket átengedi. Az oszlopot enyhén poláris szerves oldószerezrel, így metiléndikloriddal vagy kloroformmal mossuk a szennyezések további eltávolítására, és azután az metiléndiklorid vagy kloroform és egy másik szerves oldószert elegyével mossuk, ezen oldószerek közül az acetont, metanol és etanol előnyös. Az oldószert lepároljuk, és a maradékot oszlopkromatográfiás, vékonyréteg-kromatográfiás, preparatív vékonyréteg-kromatográfiás, nagynyomású folyadékkromatográfiás és hasonló eljárásokkal, közegeként szilikagél, alumínium-oxidot, ioncsereelőgyantát, dextrán gél és hasonlókat, eluálószerként különféle oldószereket vagy oldószert-kombinációkat alkalmazva tovább kromatografáljuk. A vékonyréteg-, a nagynyomású folyadék- és a preparatív vékonyréteg-kromatográfiát a jelen vegyületek jelenlétének kimutatására és a vegyületek elkülönítésére is használhatjuk.

A fenti, valamint más, a szakember által ismert módszerek segítségével tisztított anyagösszetételt kapunk, amely a találmány szerinti vegyületet tartalmazza. A kívánt vegyület jelenlétét a különféle kromatográfiás frakciók biológiai aktivitásának vagy fizikai-kémiai jellemzőinek analízisével határozzuk meg. Mindkét vegyületet meghatároztuk a különféle spektrális jellemzőinek, közelebről a magmágneses rezonancia-, tömeg-, ultrahő- és infravörös spektrumának részletes analízisével.

1. példa

1. Tenyésztés

Az MF-5954-et ferde agarra kaptuk, és FVMs (fagyasztott vegetatív micélium) előállítására használtuk fel. A ferde agar egy részét aszeptikus körülmények között az A) oltótáptálajra vittük (50 ml, 250 ml-es nemcsiszolatos Erlenmeyer-lombik). Ezt egy 50,8 mm löketű forgó rázógépen 220 fordulatszámmal 3 napon át 25 °C-on és 85% relatív nedvességtartalom mellett inkubáltuk biomassza előállítására. A biomassza részleteit glicerint tartalmazó steril fiolákba vittük át, és lefagyasztottuk (FVMs). Ezeket 10–15% glicerinvégkoncentráció mellett –75 °C-on tároltuk. Másodlagos FVMs-t primer FVM-ből állítottunk elő oly módon, hogy a felengedett primer FVM-ből 1,0 ml-t oltó-

táptálajba vittünk, majd 2-3 napon át 25 °C-on, 220 fordulatszám mellett inkubáltunk, azután a fentiek szerint lefagyasztottunk.

2. Oltás

Egy fagyasztott fiolát (FVM) szobahőmérsékletre felengedtünk, és az MF-5954 oltótenyészetének beoltására használtunk 0,5–1,0 ml/oltótáptálaj mennyiségben. Ezeket forgó rázógépen (220 fordulatszám) 2-3 napon át 25 °C-on, 85% relatív nedvesség mellett növesztettük. Néha egy második fokozatú oltást is használtunk. Ennek kifejlesztésére a fentebb leírt első oltó fokozatú tenyészetből 1 ml-t 30 ml friss oltótáptálajjal hígítottunk, és 24–30 órán át 25 °C-on, 220 fordulatszám és 85% relatív nedvesség mellett inkubáltunk.

3. Termelés

Az A) termőtáptálaj összetételét tekintve egy szilárd szubsztrát fermentációs közeg. Az oltótenyészet egy 18–24 ml-es részletét 425 ml A termelő táptálajra vittük. Ezt a lombikot élénken forgattuk, hogy a biomassza diszpergálódjon. Az edény tartalmát egy 4 literes forgó tenyésztésre alkalmas edénybe öntöttük, amely 1250 cm³ nagy szemcseméretű vermikulitot tartalmazott. A forgólombik tartalmát ráztuk/kevertük a homogén oltás és fedés biztosítására. A forgólombikokat vízszintesen inkubáltuk, körülbelül 4 fordulat/perc sebességgel forgatva egy Wheaton-forgókészüléken, 22–25 °C-on, 50–75% relatív nedvességtartalom mellett 19–28 napon át. Így a fermentációs közegben egy szekunder metabolitot kaptunk.

Számos folyékony közegget megvizsgáltunk a jelen vegyületek termelése szempontjából annak érdekében, hogy a fermentáció léptéke egészen nagy tartályokig könnyen növelhető legyen. Termelést a vizsgált folyékony táptálajok közül csak kevés esetében tudtunk kimutatni. Egy B) folyékony termelőtáptálajt használtunk. Az oltótenyészeteket a fentiek szerint inokuláltuk, és 220 fordulatszám mellett forgó rázógépen 3 napon át 25 °C-on és 85% relatív nedvesség jelenlétében növesztettük. Az oltótenyészet 1 ml-et használtuk az egyes termelőlombikok inokulálására, amelyek 50 ml táptálajt (2% inokulum) tartalmaztak. A lombikokat 220 fordulatszámú forgó rázógépen 21–28 napig 25 °C-on, 50% relatív nedvességtartalom jelenlétében inkubáltuk.

A két termelési módszer lényegében azonos az előállított termék mennyisége szempontjából. Azonban a második módszernek [B) folyékony termelő táptálaj] az az előnye, hogy léptéke kevert tartályokig növelhető, így alkalmazásával nagy mennyiségek állíthatók elő. A szilárd termelési eljárás [A) közeg tartalmazó forgólombikok] esetében nehéz a léptéket növelni.

Nagyobb edényeket (22 literes tankokat) szintén használtunk a jelen találmány szerinti vegyületeknek ebből a tenyészetből történő előállítására.

2. példa

Tisztítás és előzetes jellemzés

Tizenkét 2 literes forgólombikot, amely a 21 napig növesztett tenyészetet tartalmazta, 650 ml metil-etilketonnal extraháltunk 4-4 órán át forgó gépen, 100-as fordulatszámmal. Az extraktumokat szűrtük, és egyesí-

tettük, majd vákuumban szárazra pároltuk. 8 g maradékot kaptunk, amelyet 20 ml metilén-dikloridban oldottunk, és 800 ml szilikagélből (E. Merck) metilén-diklorid és metanol 95:5 térfogatarányú elegyével készült oszlopra vittük. A következő oldószerkeverégekkel 1-1 oszloptérfogatnyit használtunk eluálószerként: metilén-diklorid:metanol=95:5, 9:1, 3:1, 1:1 és metanol. 40 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, a biológiai úton (*Lucilia*) meghatározott aktivitás nagyobb részét az 51-55-ös frakciók tartalmzták. A frakciókat egyesítettük és vákuumban szárazra pároltuk, így 200 mg anyagot kaptunk. Ezt a mintát 8,5 ml metanolban oldottuk, és metanollal készült Sephadex LH20 oszlopra (Pharmacia) vittük, 13 ml-es frakciókat gyűjtöttünk 6,5 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Az aktivitást a meghatározás szerint a 41-50. frakciók tartalmzták. Ezeket bepároltuk, és megszáritottuk, így 90 mg anyagot kaptunk. Ezt az anyagot 0,5 ml metanolban oldottuk, és két részletben Eka Nobel C-18 HPLC-oszlopra (9,6 mm×250 mm) injektáltuk, az elúciót szobahőmérsékleten végeztük 4 ml/perc átfolyási sebesség mellett, és 270 nm-en követtük. Az alkalmazott oldószerrendszer acetonitril:0,1% trifluor-ecetsavat tartalmazó víz=70:30 összetételű volt. A hatásos anyagot az első alkalommal a 26-27. frakcióban, a második alkalommal a 27-28. frakciókban különítettük el. A vegyület tisztaságát analitikai HPLC-vizsgálattal bizonyítottuk: Eka-Nobel oszlop (4,6×250 mm C-18), átfolyási sebesség 1 ml/perc és 40 °C, valamint vékonyréteg-kromatográfiás eljárással több különböző oldószerrendszerben. Az egyesített frakciókat vákuumban bepároltuk, és metilén-dikloridba extraháltuk, majd szárítottuk, így 4,8 mg tiszta vegyületet (1. vegyület) kaptunk.

A szilikagél oszlopról eluálódó későbbi frakciók biológiailag szintén aktívak voltak; ezeket egyesítettük és vákuumban szárazra pároltuk. A visszamaradó 1,4 g szilárd anyag, miután több alkalommal metanollal mostuk, az 1. vegyülethez hasonló UV-spektrumot mutató komponenseket tartalmazott. Ezt a spektroszkópiás tulajdonságot használtuk fel a további tisztítási lépéseknél az anyag követésére és a biológiai aktivitást végül a tiszta vegyületekre vonatkozóan bizonyítottuk. Így az 500 mg tömegű anyagot tartalmazó metanolos oldatot 250 ml Sephadex LH-20-ból metanollal készült oszlopon frakcionáltuk. A tömeg nagy része ezekben az egyesített frakciókban volt. Az anyagot megszáritottuk és 3 ml metanolban újra oldottuk, majd 1 ml-es részleteket preparatív Zorbax C-18 oszlopra (22,5 mm×250 mm) injektáltunk szobahőmérsékleten, acetonitril: víz (0,1% trifluor-ecetsav)=80:20 térfogatarányú oldószerrendszert használtunk 8 ml/perc átfolyási sebesség mellett, a detektálás 270 nm-en történt, és 8 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Mindhárom frakcionálásból a 29. frakciót választottuk ki, ezeket egyesítettük, így kaptuk a 2. vegyületet, és a 21-22. frakciók tartalmzták a 3. vegyületet. Mindkét oldatot bepároltuk, és etil-acetáttal extraháltuk, majd vízzel mostuk és szárítottuk. A 2. vegyületet 1,8 mg, a 3. vegyületet 1,0 mg mennyiségben különítettük el. Mindkét vegyületet az 1. vegyülethez hasonlóan NMR- és tömegspektroszkópiás úton vizsgáltuk.

A gyors-atombombázásos (FAB) tömegspektromokat JEOL HX110 tömegspektrométeren vettük fel. A FAB spektrumot ditiotreit: ditioeritrit=20:80 mátrix alkalmazásával készítettük. Az egzakt tömegméréseket nagy felbontással, ultramark 1960 (Fomblin) referenciavegyülettel végeztük. A kritikus nagy felbontású adatokat az alábbiakban adjuk meg.

1. vegyület

Talált	Számított	Összegképlet	Meghatározás
680,3891	680,3951	$C_{43}H_{53}NO_6 + H$	M+H
662,3790	662,3845	$C_{43}H_{51}NO_5 + H$	680-H ₂ O

2. vegyület

Talált	Számított	Összegképlet	Meghatározás
695,3806	695,3822	$C_{43}H_{53}NO_7$	M ⁺

¹³C-NMR-adatok

A ¹³C-NMR-spektrumokat CD₂Cl₂-ben vettük fel 100 és 125 MHz-en Varian Unity 400, illetve 500 NMR spektrométerekkel, 25 °C-on. A kémiai eltolódásokat ppm-ben adjuk meg a tetrametilszilánra (TMS) mint 0 ppm-re vonatkoztatva, az oldószer 53,8 ppm-es csúcsát használtuk belső standardként.

1. vegyület (125 MHz): 198,0, 172,6, 162,0, 154,7, 154,6, 140,8, 140,0, 138,4, 135,9, 134,0, 125,9, 125,1, 122,7, 122,0, 121,8, 117,5*, 116,7, 113,1, 76,8, 76,4*, 75,3, 73,9, 72,6, 58,2, 56,1, 48,0, 47,8, 45,2, 39,1, 32,3, 32,0, 30,1, 29,9, 27,7, 26,0, 25,7, 24,7, 23,5, 19,6, 18,1*, 15,1, 12,6, 11,2 ppm.

A 43 darab szén összhangban van a nagy felbontású FAB-tömegspektrumból levezetett $C_{43}H_{53}NO_6$ molekula-összegképlettel.

2. vegyület (100 MHz): 198,1, 172,0, 162,0, 154,8, 147,1, 140,1, 138,3, 135,9, 134,0, 126,8, 122,6, 122,0, 121,8, 117,8*, 116,7, 113,2, 106,9, 76,6*, 75,3, 73,9, 73,3, 72,7, 58,2, 55,5, 49,6, 48,1, 44,5, 41,3, 39,5, 32,0, 30,4, 30,1, 30,0, 29,9, 27,8, 26,0, 24,8, 23,4, 18,0*, 17,7, 16,7, 15,3, 12,5 ppm.

A 43 darab szén összhangban van a nagy felbontású FAB-tömegspektrumból levezetett $C_{43}H_{53}NO_7$ molekula-összegképlettel.

A *-gal jelzett szénatomok széles rezonanciát mutatnak.

¹H-NMR-adatok

Az ¹H-NMR-spektrumokat 300, 400 vagy 500 MHz-es spektrométerekkel vettük fel. A kémiai eltolódásokat a TMS-hez mint 0 ppm-hez viszonyítva ppm-ben adjuk meg, az oldószer csúcsait használjuk belső standardként.

1. vegyület (lásd az 1. ábrát) (500 MHz): δ 0,96 (3H, s), 1,07 (3H, s), 1,12 (3H, s), 1,14 (3H, s), 1,31 (3H, s), 1,33 (3H, s), 1,42 (3H, s), ~1,46 (3H, széles s), 1,96 (3H, d, J=1 Hz), 2,32 (1H, dd, J=11,14 Hz), 2,75 (1H, dd, J=6,5 Hz, 14 Hz), 2,81 (1H, dd, J=3 Hz, 6,0 Hz),

2,85 (1H, m), 3,43 (1H, m), 4,96 (1H, széles s), 5,09 (1H, s), 5,20 (1H, széles s), 5,22 (1H, d, J=6,0 Hz), 5,95 (1H, d, J=15 Hz), 6,06 (1H, d, J=3 Hz), 6,40 (1H, dd, J=11 Hz, 15 Hz), 7,33 (1H, széles d, J~11 Hz), 7,71 (1H, s).

2. *vegyület* (lásd a 2. ábrát) (440 MHz): δ 0,95 (3H, s), 1,07 (3H, s), 1,122 (3H, s), 1,126 (3H, s), 1,31 (3H, s), 1,34 (3H, s), 1,42 (6H, s), 1,73 (1H, dd, J=9,5 Hz, 12,5 Hz), 1,86 (3H, d, J=1,5 Hz), 2,34 (1H, széles dd, J=7,5 Hz, 12,5 Hz), 2,36 (1H, dd, J=11 Hz, 14 Hz), 2,78 (1H, dd, J=6,5 Hz, 14 Hz), 2,81 (1H, dd, J=3 Hz, 6,5 Hz), 2,93 (1H, m), 4,88 (H, széles q, J~8 Hz), 5,00 (1H, széles s), 5,10 (1H, s), 5,20 (1H, dq, J~1 Hz), 5,21

(1H, d, J=6,5 Hz), 6,06 (1H, d, J=3 Hz), 6,93 (1H, dq, J=8 Hz, 1,5 Hz), 7,72 (1H, s).

3. *vegyület* (lásd a 3. ábrát) (300 MHz): δ 0,91 (3H, s), 1,05 (3H, s), 1,09 (3H, s), 1,11 (3H, d, J~7,5 Hz), 1,13 (3H, s), 1,33 (3H, s), 1,34 (3H, s), 1,47 (3H, s), 2,30 (1H, dd, J=10,5 Hz, 13,5 Hz), 2,72 (1H, dd, J=6,5 Hz, 13,5 Hz), 2,87 (1H, dd, J=3 Hz, 6,0 Hz), 4,00 (1H, dd, J=2,5 Hz, 10,5 Hz), 4,58 (1H, m), 5,02 (1H, széles s), 5,07 (1H, s), 5,17 (1H, széles s), 5,23 (1H, d, J=6,0 Hz), 6,02 (1H, d, J=3 Hz), 7,67 (1H, s).

Rövidítések: s=szingulett, d=dublett, q=kvartett, m=multipllett, J= ^1H - ^1H kapcsolási állandó Hertzben ($\pm 0,5$ Hz, ~≈megközelítőleg).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I), (II) vagy (III) képletű vegyület.

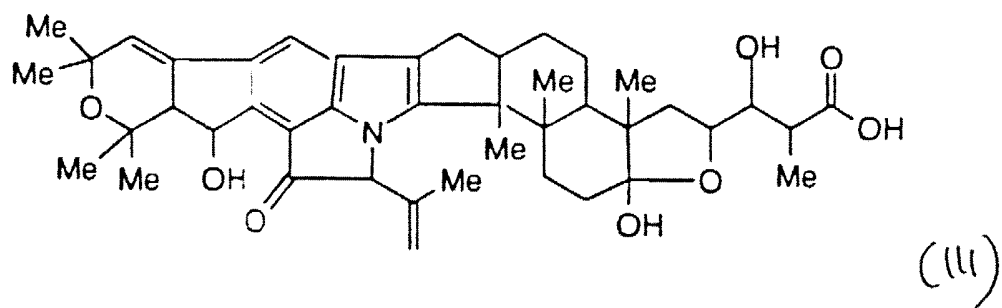
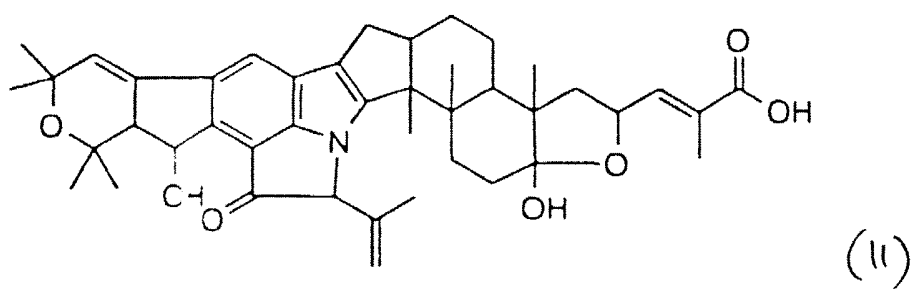
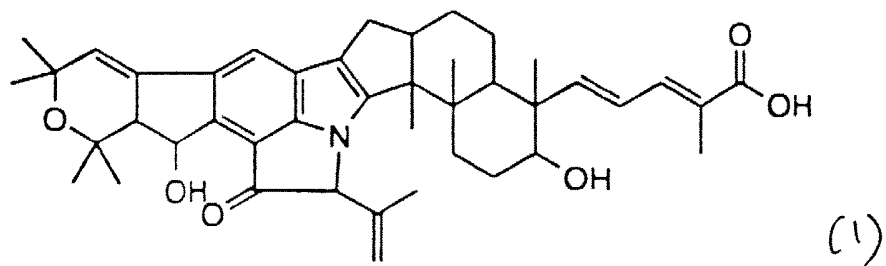
2. Eljárás egy 1. igénypont szerinti vegyület előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy szénforrást, nitrogénforrást és nyomelemforrást tartalmazó közegben egy *Nodulisporium* sp. MF-5954 (ATCC 74245) termelő törzset fermentálunk, és a vegyületeket elkülönítjük.

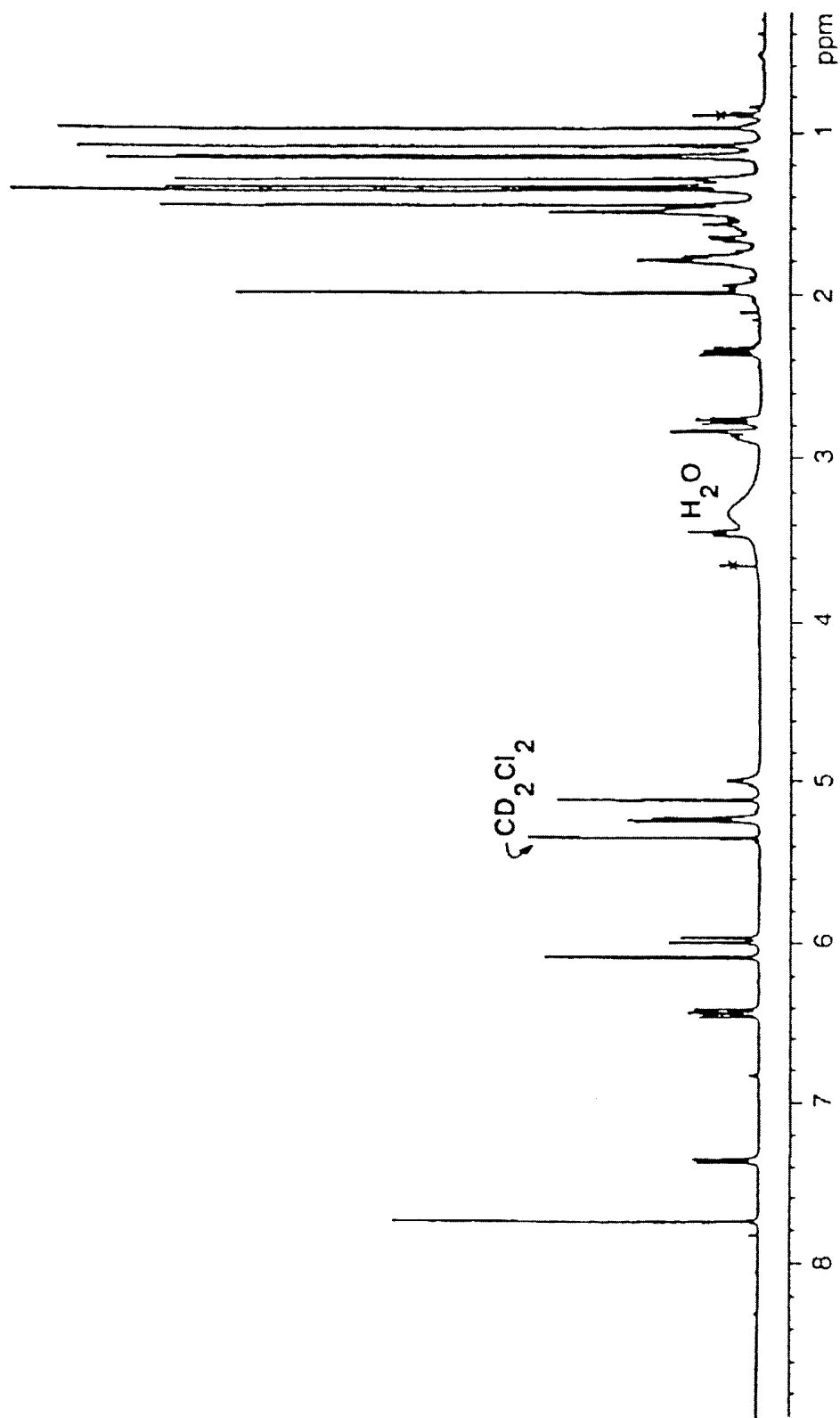
3. Készítmény állatok parazitafertőzésének kezelésére, amely közömbös hordozót és egy 1. igénypont szerinti vegyületet tartalmaz.

4. Eljárás növények vagy növénytermékek parazitafertőzésének kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti vegyület hatásos mennyiségét a növényre, vagy a termesztés helyén a talajra visszük fel.

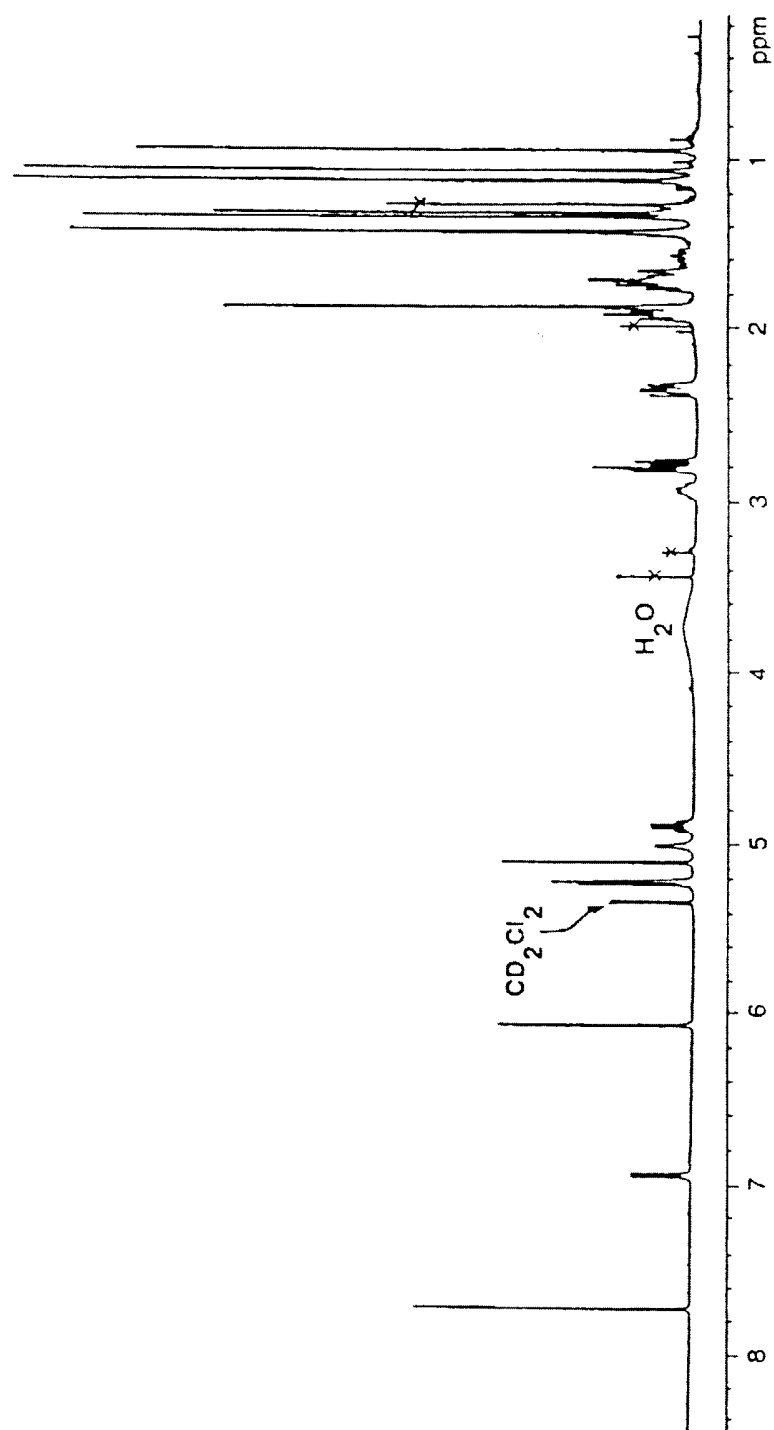
5. Készítmény növények parazitafertőzéseinek kezelésére, amely közömbös hordozót és egy 1. igénypont szerinti vegyületet tartalmaz.

6. Biológiaiilag tiszta *Nodulisporium* sp. MF-5954 tenyészet, amely 1. igénypont szerinti vegyületeket képes előállítani.





1. ábra



2. ábra

