

P02000897

73.334/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY
P02000897

Az



KIVONAT

A *PSEUDOMONAS SYRINGAE*-BŐL IZOLÁLT GOMBAELLENES
SZEREK

A találmány tárgya egy izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja, azzal jellemezve, hogy a depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxil-csoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

Federán

P02000897

J.G. & E.
Nemzetközi
Szakmai Tanács
H-1082 József Attila utca 112.
Tel.: 31-20-411, Fax: 31-24-023

73.334/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A2

~~A~~ PSEUDOMONAS SYRINGAE-BŐL IZOLÁLT GOMBAELLENES SZEREK

A TALÁLMÁNY TÁRGYA

A jelen találmány a *P. syringae* depsidekapeptidekre, az ilyen peptidek előállítására, és ezen peptidek gombaellenes alkalmazásának eljárására vonatkozik.

A TALÁLMÁNY HÁTTERE

A gombás fertőzések jelentős mértékben okoznak betegségeket, az életminőség romlását, az emberi halálozás növekedését, különösen az immunbetegségben szenvedő betegek esetében. A gombás fertőzések gyakorisága az emberek körében az elmúlt 20 évben nagy mértékben nőtt. Ennek oka részben a legyengült immunrendszerrel vagy szervátültetésekkel, rák kemoterápiával, AIDS-el, korral és más rendellenességekkel vagy állapottal rendelkező betegek számának növekedése. Az ilyen betegek hajlamosak a patogén gombák általi támadásra, amelyek nagymértékben elterjedtek a földkerekségen. Ezeket a patogéneket nehéz kezelni, mert a jelenleg elérhető gombaellenes szerek egy része nagyon toxikus, vagy csak gátolja a gombás fertőzéseket. Például a poliének rendelkeznek fungicid hatással, de toxikusak, míg az azolok kevésbé toxikusak, de csak fungisztatikus hatással rendelkeznek. Sokkal fontosabb az a tény, hogy a legújabb kutatások és közlemények szerint a *Candida* törzsei rezisztensek az azolokra és poliénekre, amely tény komolyan

limitálja ezen vegyületek *Candida* törzsek elleni terápiás alkalmazását.

A *Pseudomonas syringae* a gombaellenes szerek és antibiotikumok különböző osztályait termeli, mint a pseudomycinek, syringomycinek, syringotoxinok, és syringostatinok, amelyek szerkezetükre nézve lipodepsinonapeptidek. A *P. syringae* természetes törzsei és transposon generált mutánsai termelik ezeket a lipodepsinonapeptideket. Néhány pseudomycint, syringomycint és más lipodepsipeptid gombaellenes szert izoláltak, kémiai szerkezetüket azonosították, és igazolták azok széles spektrumú gombaellenes hatását, beleértve az aktivitást néhány, az emberre és növényre patogén gomba ellen. A pseudomycinek, syringomycinek, syringotoxinok, és syringostatinok szerkezetüket tekintve a gombaellenes hatású vegyületek külön családját alkotják.

Eddig egyetlen *P. syringae* lipodepsinonapeptidet sem forgalmaztak gyógyszerként. A nem kívánatos mellékhatások, formulázási, méretnövelési és egyéb fejlesztési problémák akadályozták meg eddig a *P. syringae* lipodepsinonapeptidek alkalmazásba vételét az állatokat, embereket és növényeket érintő gombás fertőzések teljes skálájával szemben. Továbbra is fennáll a szükségessége egy olyan gombaellenes szer alkalmazásának, amely kezelni képes az olyan fertőzéseket, amelyeket a jelenleg forgalomban lévő készítményekkel kezelni nem tudunk az állatok, emberek vagy növények gombás fertőzése esetén.

A TALÁLTMÁNY ÖSSZEFOGLALÁSA

A jelen találmány tárgya a *P. syringae* által termelt depositekapeptid, amely a ritkábban előforduló aminosavakat, a homoszerint (Hse), a dehidro-amino-vajsavat (Dhb) és a

dehidro-alanint (Dha) tartalmazza, amely utóbbi a depsidekapeptid gyűrű része. Közelebbről, a *P. syringae* depsidekapeptid tartalmaz egy arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidro-alanin aminosavakból álló depsidekapeptid gyűrűt, és tartalmaz továbbá egy lakton gyűrűt, amely az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxil-csoportjából képződött. A *P. syringae* törzsből izolált depsidekapeptid egy lipodepsidekapeptid, egy lipofil egységhez kapcsolódó ciklusos peptid. Tipikusan a lipofil egység egy zsírsav egység, amely a treonin amino-csoportjához kapcsolódik savamid kötéssel. Előnyösen a zsírsav egység a n-dodekánsav. A lipodepsidekapeptid az (I) képletű vegyület, ahol R jelentése egy lipofil egység. A lipofil egység tartalmaz 9-15 szénatomos alkil-, 9-15 szénatomos hidroxi-alkil-, 9-15 szénatomos dihidroxi-alkil-, 9-15 szénatomos alkenil-, 9-15 szénatomos hidroxi-alkenil-, vagy 9-15 szénatomos dihidroxi-alkenil-csoportot. Előnyösen a lipofil egység 11 szénatomos alkilcsoport. Az alkil-, hidroxi-alkil-, dihidroxi-alkil-, alkenil-, hidroxi-alkenil- vagy dihidroxi-alkenil-csoportok lehetnek egyenes vagy elágazó szénláncúak. Előnyösen a depsidekapeptid gyűrű aminosav szekvenciája: treonin – -alanin – treonin – glutamin – homoszerin – dehidro-amino-vajsav – alanin – dehidro-alanin – treonin – arginin, amelyet „25-B1 decapeptidnek”, vagy

„Thr-Ala-Thr-Gln-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Thr-Arg” (SEQ, azonosító szám :1) nevezünk.

Az itt használt „25-B1 decapeptid A gombaellenes szer” kifejezés jelentése egy specifikus depsidekapeptid, amely a fenti szekvenciát [SEQ, azonosító szám :1, R jelentése egyenes láncú 11 szénatomos alkilcsoport, (azaz $R = -(CH_2)_{10}CH_3$)] jelenti.

A találmány tárgya továbbá eljárás a *P. syringae* depsidekapeptid alkalmazására a gomba aktivitás gátlásában,

vagy a betegek gombás fertőzése tüneteinek igény szerinti csökkentésében. Az ilyen eljárások képesek a gomba elpusztítására, a gombás fertőzés súlyosságának csökkentésére, a láz csillapítására, és a beteg általános közérzetének javítására. Következésképpen, a *P. syringae* depsidekapeptidek alkalmazhatók gyógyszerkészítmény előállítására a betegek fent leírt tüneteik kezelésében. A találmány eljárásai és készítményei hatékonyak az olyan gombákkal szemben, mint a *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, vagy *Histoplasma capsulatum*.

A találmány tárgya továbbá mikroorganizmus alkalmazása gombaellenes szer, mint a fent leírt *P. syringae* depsidekapeptid és 25-B1 decapeptid termelése eljárásában. Az eljárás lényege a *Pseudomonas syringae* tenyésztése három vagy kevesebb aminosavat tartalmazó közegben, és az eljárás során egy vagy több *P. syringae* depsidekapeptidet nyerünk ki a kultúrából. Az egyik megoldás szerint a *P. syringae* kultúra egy olyan közegben szaporodik, amely glicint, egy lipidet, és burgonya terméket vagy ezek kombinációit tartalmazza, 4-6,5 pH értéken, amíg egy vagy több *P. syringae* depsidekapeptid képződik legalább 10 ÷g/ml koncentrációban. Ezen túlmenően a találmány *P. syringae* depsidekapeptideket szolgáltat a fent leírt módon.

A találmány tárgya továbbá eljárás gombák növekedésének kezelésére és megelőzésére növényekben, amelynek során a gombát egy vagy több fent leírt *P. syringae* depsidekapeptiddel kezeljük.

A TALÁLMÁNY RÉSZLETES LEÍRÁSA

Lipodepsidekapeptid gombaellenes szerek

Az itt használt „lipodepsidekapeptid gombaellenes szer” kifejezés jelentése egy gombaellenes szer, amely egy lakton csoport által bezárt ciklusos decapeptid gyűrűt és egy hozzá kapcsolódó hidrofób csoportot, egy zsírsav egységet tartalmaz. A lipodepsidekapeptid gombaellenes szereket a *Pseudomonas syringae* termeli. E vegyületcsalád egy reprezentatív képviselőjét a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szert megtisztítottuk, és szerkezetét meghatároztuk. Az itt használt „*P. syringae* lipo-depsidekapeptid” kifejezés jelentése egy lipodepsidekapeptid gombaellenes szer, amelyet a *P. syringae* termel, és a fermentlé 25-B1 decapeptid A gombaellenes szert és rokon szerkezetű analogonokat tartalmaz.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptidek jellegzetes szerkezeti sajátosságokkal rendelkeznek. Például, ezen gombaellenes szerek tartalmazzák a természetben ritkán előforduló homoszerin (Hse) aminosavat, a dehidro-amino-vajsavat (Dhb) és a dehidro-alanint (Dha) mint a depsidekapeptid gyűrű részeit. Minden egyes *P. syringae* lipodepsidekapeptidben az arginin rész karboxil-csoportja az N-terminális treonin hidroxil-csoportjával laktont képez, amely bezárja lipodepsidekapeptid gyűrűt. A *P. syringae* lipodepsidekapeptid depsidekapeptid gyűrűjének szekvenciája az alábbi:

Thr-Xaa-Xbb-Xcc-Hse-Dhb-Xdd-Dha-Xee-Arg

amelyben mindegyik Xaa, Xbb, Xcc, Xdd és Xee természetben előforduló aminosavat jelent. A pseudomycin természetes anyagoktól eltérően a jelen találmány lipodepsidekapeptidjei nem tartalmazzák klór-treonint, amely gyaníthatóan okozója a pseudomycin tartalmú gyógyszerészeti készítmények injekció formájában történő beadásakor keletkező irritációnak.

A depsidekapeptid gyűrű egy lipofil részhez kapcsolódik, amely jelen esetben egy zsírsav egység, amely egy savamid kötéssel keresztül kapcsolódik az N-terminális treonin amino-

csoportjával. A zsírsav egység általában 10, 12, 14 vagy 16 szénatomot és tipikusan 0, 1 vagy 2 hidroxilcsoportot tartalmaz. A zsírsav szénlánc lehet egyenes vagy elágazó, és tartalmazhat egy vagy több kettőskötést. Előnyösen a zsírsav egység n-

-dekánsav, egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített n-dekánsav, n-dodekánsav, egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített n-dodekánsav, n-tetradekánsav, egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített n-tetradekánsav részt tartalmaz.

25-B1 dekapeptid gombaellenes szerek

Az itt használt „25-B1 gombaellenes szer” kifejezés a gombaellenes anyagok családjának olyan tagját jelenti, amelyet a *Pseudomonas syringae* baktérium tenyészetéből izoláltak. A 25-

-B1 dekapeptid gombaellenes szer a *P. syringae* lipodepsidekapeptid. Pontosabban, a 25-B1 dekapeptid gombaellenes anyag egy olyan *P. syringae* lipodepsidekapeptid, amely depsidekapeptid gyűrűt tartalmaz, és amelynek aminosav szekvenciája a következő:

Thr-Ala-Thr-Gln-Hse-Dhb-Ala-Dha-Thr-Arg” (SEQ, azonosító szám :1)

Minden egyes 25-B1 dekapeptid gombaellenes szer ugyanazon ciklusos peptid gyűrűrendszerrel rendelkezik, de különböznek a gyűrűhöz kapcsolódó hidrofób oldallánc szerkezetében. A 25-B1 dekapeptid gombaellenes szer tartalmaz egy 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyagot. A 25-B1 dekapeptid gombaellenes anyag tartalmaz egy zsírsav részt, amely savamid kötésen keresztül kapcsolódik az N-terminális



treonin amino-csoportjával. A 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag zsírsav egysége egy n-dodekánsav rész.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptidek biológiai aktivitása

A *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes szer többirányú biológiai aktivitással rendelkezik, beleértve a gombaölő hatást, különböző gombák, a növényi és állati patogének aktivitásának gátlását. Különösen a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag egy aktív antimikotikum, amely hatékony olyan gombák ellen, amelyek a legyengült immunrendszerű egyedeknél okoznak fertőzéseket. Ezek a gombák például a *Cryptococcus neoformans*, a *Histoplasma capsulatum*, és a *Candida*, beleértve a *Candida parapsilosis* és *Candida albicans* különböző fajait.

A *Pseudomonas syringae*

A *Pseudomonas syringae* az olyan baktériumok széles skáláját tartalmazza, amelyek általában növényekhez kapcsolódnak. Néhány *Pseudomonas syringae* növényi patogén, míg a többi egyed csak gyengén patogén vagy szaprofita. A *Pseudomonas syringae* különböző izolátumai egy vagy több citotoxikus anyagot termelnek, amelyek segítik a baktérium túlélését olyan idegen környezetben, ahol gombákkal és egyéb baktériumokkal élnek együtt. A *Pseudomonas syringae* által termelt citotoxikus anyagok olyan gombaellenes anyagok, mint a *Pseudomonas syringae* lipodepsidekapeptidek, beleértve a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyagot, a pseudomycineket, syringomycineket, syringotoxinokat, és syringostatinokat.

A *Pseudomonas syringae* izolált törzsei, amelyek egy vagy több pseudomycint, syringomycint, syringotoxint, és syringostatint termelnek jól ismertek az irodalomban jártas szakemberek számára. Az MSU 174 vad típusú törzs és a transposon mutációval generált törzs egy mutánsát az MSU 16H (ATCC 67028) jelű anyagot leírták az 1996 november 19.-én közzétett, 5,576,298 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban; G. Strobel és munkatársai a „Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity” J. Gen. Microbiology **137**, 2857-2865 (1991); és Lamb és munkatársai „Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6447-6451 (1987). A *P. Syringae* különböző törzsei szaporításának eljárását és azok felhasználását a gombaellenes szerek, mint a pseudomycinek előállítására Matthew D. Hilton és munkatársai szintén leírták a PCT/US00/08728 számú amerikai egyesült államokbeli találmányi bejelentésben, „*Pseudomonas syringae* Pseudomycin termelése” címmel. A leírás és annak hivatkozásai teljes terjedelmükben referenciaként beépülnek e találmányba.

A *P. syringae* törzseit, amelyek alkalmasak egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes szer előállítására, izolálhatjuk olyan növényi környezetből, mint az árpa, a citrus és az orgona, továbbá az erdők aljnövényzetéből, a földből, vízből és levegőből. A találmány tárgya egy törzs, egy izolátum, és a *P. syringae* biológiai úton tisztított kultúrája, amely egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag, termel, nagyobb mint 10 ñg/ml mennyiségben, előnyösen legalább 10 ñg/ml - 50 ñg/ml mennyiségben. Előnyösen a mikroorganizmus biológiai úton tisztított kultúrája a *P. syringae*, MSU 16H, 25-B1, 67H1, 7H9-1



törzsek, vagy a pseudomycint termelő mutáns, variáns, izolátum, vagy e törzsek rekombinánsa. Az MSU 16H kultúrát a Montana Állami Egyetemen (Bozeman, Montana, USA) tették letétbe, és megrendelhető az American Type Culture Collection-től (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA) az ATCC 67028 számon.

A *P. syringae* törzseit, amelyek alkalmasak egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szer előállítására, izolálhatjuk olyan növényi környezetből, mint az árpa, a citrus és az orgona, továbbá az erdők aljnövényzetéből, a földből, vízből és levegőből. Egy előnyös törzset növényből izolálunk. A *P. syringae* ezen környezetből vett izolátumait vad típusú izolátumnak nevezzük. Az itt használt „vad típusú” kifejezés egy domináns genotípust jelent, amely a természetben fordul elő a *P. syringae* normál populációjában (azaz a *P. syringae* olyan törzsei vagy izolátumai, amelyek a természetben fordulnak elő, és nem laboratóriumi manipuláció termékei). A más organizmusokhoz hasonlóan az e találmányban alkalmazott termelő kultúrák, a *P. syringae* törzsek jellemzői, mint az MSU 174, az MSU 16H, az MSU 206, a 25-B1 és 7H9, időben változnak. Így e törzsek utódait, azaz rekombinánsait, mutánsait és variánsait megkaphatjuk, előállíthatjuk az irodalomban szakemberek számára jól ismert módszerekkel.

A *P. syringae* mutáns törzsei szintén alkalmasak egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid termelésére, mint például a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag. Az itt használt „mutáns” kifejezés egy olyan gyorsan öröklődő változást jelent a törzs fenotípusában, amely lehet spontán, vagy ismert mutagén anyagok által indukált, beleértve a besugárzást, vagy a különböző kémiai anyagok által okozott indukálást. A jelen találmány *P. syringae* mutánsát előállíthatjuk a mutagén ágensek széles választékát használva, beleértve a besugárzást,



mint az ultraibolya sugárzás, röntgensugárzás; a kémiai mutagén anyagokat, a kötőhely specifikus mutagéneket, és a transposon mediált mutagenézist. A kémiai mutagén anyagok példái az etil-metil-

-szulfonát (EMS), a diepoxi-oktán, az N-metil-N-nitro-N'-nitrózó-guanin (NTG) és a salétromossav.

A *P. syringae* alkalmas egy vagy több lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szer előállítására. A jelen találmány szerint a termelés generálható a baktériumnak egy mutagén ágens olyan hatékony mennyiségével, amely elégséges mutánsok termelésére, amelyek egy vagy több lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag túltermelését idézik elő, vagy amelyek egy vagy több lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot termelnek előnyös szaporodási körülmények között. Miközben a felhasználandó mutagén ágens típusa és mennyisége változhat, egy előnyösen alkalmazott módszer a szériában hígított NTG mintegy 1-100 ñg/ml koncentráció tartományban. A találmány előnyös mutánsai azok, amelyek túltermelik a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot, előnyösen legalább 10 ñg/ml –50 ñg/ml mennyiségben.

A környezeti izolátumokat, a mutáns törzseket, és más kívánatos *P. syringae* törzseket szelektálhatjuk a növekedési szokás, a növekedési médium, a tápanyagforrás, a szénforrás, a növekedési feltételek és az aminosav igények kívánt jellemzői szerint. Előnyösen, a *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szert termelő *P. syringae* törzset a minimum táptalajon történő növekedés alapján szelektáltuk. Az előnyös törzsek mutatják az egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szert termelő *P. syringae* törzs jellemzőit, amikor azok egy glicint, továbbá adott esetben lipidet, burgonya terméket vagy mindkettőt tartalmazó táptalajon növekednek.

Rekombináns törzseket fejleszthetünk a *P. syringae* törzsek transzformálásával, az irodalomból a szakemberek által jól ismert eljárásokkal. A rekombináns technológiák használatával a *P. syringae* törzseket transzformálni lehet a gén termékek egy nagy részének expresszáálásával, azon túl, hogy ezek a törzsek antibiotikumokat termelnek. Például a törzseket transzformálhatjuk egy rekombináns vektorral, amely rezisztenssé teszi a törzset olyan antibiotikummal szemben, amelyre érzékeny volt. Az így nyert transzformátumok nemcsak *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot termelnek, hanem rezisztenciát átadó enzimet is, amely megengedi a transzformált sejtek szelekcióját a vad típusú törzsektől. Továbbá, hasonló technikákat használva, jelenlegi törzseinket módosíthatjuk az endogén lipodepsidekapeptid bioszintézis génnek többszörös kópiája bevezetésével, amelyek révén magasabb lipodepsidekapeptid termelést érhetünk el. Az utódok, azaz a *P. syringae* törzsek, a 25-B1, 67H1 és 7H9-1, természetes és indukált variánsai, mutánsai és rekombinánsai, amelyek megőrzik a lipodepsidekapeptid termelés képességét és jellemzőit, is e találmány részét képezik.

A *Pseudomonas syringae* szaporodása

Az itt leírt „vizes táptalaj” kifejezés jelentése egy vizes közegű összetétel, amely szervetlen vegyületeket és szerves vegyületeket és azok sóit tartalmazza, amelyek szükségesek a jelen találmányban használt baktériumok szaporodásához. Az előnyös táptalaj tartalmazza a három vagy kevesebb aminosav, előnyösen glutaminsav, glicin, hisztidin, vagy azok kombinációinak optimális mennyiségét. Egy megoldás szerint a táptalaj összetétele megfelelő mennyiségű glicin, és adott esetben egy vagy több burgonyakeményítő és egy lipid. A

glicint ajánlhatjuk egyedül, vagy mint az aminosav keverék egyikét hidrolizált fehérje formájában. A megfelelő lipidek magukban foglalják a szójaolajat, zsírsavakat és zsírsav-észtereket. A megfelelő burgonya termékek magukban foglalják a burgonya dextróz táptalajt, a burgonya dextrint, a burgonya proteint, vagy egy kereskedelemben beszerezhető pépes burgonya élelmiszeripari termékek keverékét. A táptalaj előnyös ásványi anyagai közé soroljuk a só keverékeket, amelyeket rendszeresen alkalmazunk a sejtkultúrákban és fermentációkban, mint a Czapek ásványi só, amely kálium-kloridot, magnézium-szulfátot és vas-szulfátot tartalmaz. A táptalajban alkalmazott szerves vegyületek közül előnyösen a glükózt alkalmazzuk, alkalmazhatunk továbbá adott esetben oldható keményítőt, és más hasonló szerves anyagokat. A közeg pH-ja előnyösen 4-6,5, előnyösebben 4,5-5,7, különösen előnyösen 5,2.

Bár az egyes alkotórészek mennyisége nem kritikus a baktériumok növekedése vagy a *P. syringae* lipodepsi-dekapeptid, mint a 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyag termelése szempontjából, a táptalaj komponensek bizonyos szintje ajánlatos.

A glicin előnyös mennyisége mintegy 0,1 g/l-10 g/l, előnyösebben mintegy 0,3 g/l-3 g/l, különösen előnyösen mintegy 1 g/l. A lipidek mint egy olaj, például a szójaolaj előnyös mennyisége mintegy 1 g/l-10 g/l, előnyösebben mintegy 0,5 g/l-2 g/l. A zsírsavak vagy zsírsav-észterek előnyös mennyisége mintegy 0,5-5 g/l. A burgonya termékek előnyös mennyisége magában foglal mintegy 12 g/l – 36 g/l, előnyösebben mintegy 24 g/l burgonya dextrózt, mintegy 5 g/l – 50 g/l, előnyösebben mintegy 30 g/l pépes burgonya élelmiszeripari termékek keverékét, mintegy 1 g/l – 30 g/l, előnyösebben mintegy 20 g/l burgonya dextrint, és/vagy mintegy 1 g/l – 10 g/l, előnyösebben mintegy 4 g/l burgonya proteint.



Egy előnyös táptalaj összetétel az ásványi sókra, kálium-kloridra előnyösen 0,02-2 g/l, előnyösebben 0,2 g/l, magnézium-szulfátra, előnyösen magnézium-szulfát x 7 H₂O-ra mintegy 0,02-2 g/l, előnyösebben 0,2 g/l, és vas-szulfátra, előnyösen vas-szulfát x 7 H₂O-ra mintegy 0,4-40 g/l, előnyösebben mintegy 4 g/l. Amennyiben szerepel a táptalaj összetevők között, az oldható keményítő mennyisége előnyösen mintegy 0,5-50 g/l, előnyösebben mintegy 5 g/l. A glükóz mennyisége előnyösen mintegy 2-80 g/l, előnyösebben mintegy 20 g/l.

A *P. syringae* növekedés kontrollált és szabályozott hőmérséklet és pH értéken történik. A *P. syringae* szaporodik és egy vagy több citosztatikus terméket termel mintegy 15-35 °C-on, előnyösebben 20-30 °C-on, különösen előnyösen mintegy 25 °C-on. A *P. syringae* szaporodik és egy vagy több citosztatikus terméket termel mintegy 4-9 pH értéken, előnyösen 4-6 pH értéken, különösen előnyösen mintegy 4,5-5,5 pH értéken. A *P. syringae* nem szaporodik, ha a hőmérséklet magasabb, mint 37 °C, vagy alacsonyabb, mint 10 °C, vagy amikor a pH érték magasabb, mint 9, vagy alacsonyabb, mint 4.

Eljárás *P. syringae* lipodepsidekapeptid termelésére

Egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag termelése egy vad típusú vagy mutáns *P. syringae* törzsből úgy történik, hogy a mikroorganizmust szaporítjuk keverés közben egy vizes közegben, amely három vagy kevesebb aminosav hatékony mennyiségét tartalmazza. A három, vagy kevesebb aminosav előnyösen glutaminsav, glicin, hisztidin vagy kombinációik. Egy előnyös megoldás szerint az aminosavak tartalmazzak egy glicint, és adott esetben egy vagy több burgonya terméket és egy lipidet. A fermentációt olyan körülmények között vezetjük,



amely hatékony a *P. syringae* növekedésére, és a kívánt *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelésére. A hatékony feltételek közé soroljuk a 22 °C és 27 °C közötti hőmérsékletet, és a 36-96 óra fermentációs időt. Az itt leírt körülmények között a *P. syringae* fermentlé sűrűsége mintegy 10-15 g/liter száraz anyag, és *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyagot termel, legalább 10 µg/ml koncentrációban előnyösen legalább 50 µg/ml koncentrációban.

Az oxigén koncentráció szabályozása a *P. syringae* fermentáció során, a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelése közben célszerű. Előnyösen az oxigén szintet 5-50 % telítettségen tartjuk, előnyösebben 30 % telítettségi fokon. Levegő, tiszta oxigén vagy oxigént tartalmazó gáz keverékek bekeverésével szabályozhatjuk a közeg oxigén koncentrációját. Továbbá, a keverés sebességének szabályozásával az oxigén átadás sebessége is szabályozható.

A közeg pH értékének szabályozása a *P. syringae* fermentáció során, a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelése közben ajánlatos. A közeg pH-ját célszerűen pH = 4-6 értéken tartjuk.

A *P. syringae* képes a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelésére szakaszosan, egyedi gyártás során előállítva. Azonban, a glükóz folyamatos vagy fél-folyamatos adagolása, vagy adott esetben egy sav vagy bázis, mint az ammónium-hidroxid pH szabályozás céljából történő folyamatos adagolása növeli a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelését. A *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelését tovább növelhetjük egy folyamatos

fermentációval, amelynek során a glükózt, és adott esetben a savat vagy bázist, mint az ammónium-hidroxidot a pH állítására automatikusan adagoljuk. A pH értéket előnyösen 5-5,4 között előnyösebben 5,5,2 értékek között tartjuk.

A *P. syringae* törzs választása befolyásolhatja az itt leírt módon előállított *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag mennyiségét és eloszlását. Például a 25-B1 törzs képes csaknem kizárólag a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag termelésére.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptid ciklusos dekaeptid vázát előállíthatjuk a lipofil egység eltávolításával, például dezaci-lezéssel. A hasításos és dezacilezési módszerek, továbbá a dezaciláz enzimek alkalmazása jól ismert a szakemberek számára.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptid, formulázása és gombaellenes hatása

A *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag *in vitro* és *in vivo* gombaellenes hatást mutat és hasznos mind a szisztémás gombás fertőzések, mind a gombás bőrfertőzések elleni küzdelemben. Ennek megfelelően a jelen találmány egy eljárást szolgáltat a gombás megbetegedések gátlására, magában foglalva gombának a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyaggal vagy egy gyógyszerészetileg elfogadható sójával történő kezelését. Egy előnyös eljárás során gátoljuk különböző gombák, mint a *Cryptococcus neoformans*, a *Histoplasma capsulatum*, és a *Candida*, beleértve a *Candida parapsilosis* és *Candida albicans* növekedését vagy aktivitását. Az itt használt, a parazita vagy gomba a találmány egy vegyületével történő „kezelése” kifejezés jelentése egy egyesülés, találkozás, vagy nyilvánvaló

érintkezés, vagy kölcsönös érintkezés a találmány egy vegyülete, valamint a parazita vagy gomba között. Azonban a kezelés kifejezés nem utal a gátlás bármilyen mechanizmusára.

A jelen találmány továbbá szolgáltat egy eljárást a gombás fertőzés kezelésére, amely magában foglalja a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója hatékony mennyiségének adagolását a gazdaszervezet igény szerinti kezelésére. Egy előnyös eljárás tartalmazza a különböző gombák, mint a *Cryptococcus neoformans*, a *Histoplasma capsulatum*, és a *Candida*, beleértve a *Candida parapsilosis* és *Candida albicans* által okozott fertőzések kezelését. Amennyiben egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag készítményének hatékony mennyiségét adjuk, az csökkenti a gombás fertőzés súlyosságát, csökkenti a gombás fertőzéssel kapcsolatos tüneteket, és előidézheti a gombás fertőzés megszűnését.

Néhány beteg, akinek szüksége van egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot tartalmazó készítményre, a fertőzés súlyos tünetjeivel rendelkeznek, magas láza van, és nagy valószínűséggel kritikus állapot elé néz. Több gomba okozhat ilyen súlyos fertőzéseket. A *Candida spp.* például súlyos nyálkahártyai és súlyos szisztémás fertőzéseket okozhat, és a gomba rezisztens lehet az azolokra és poliénekre. Az *Aspergillus* életet veszélyeztető szisztémás fertőzéseket okoz. A *Cryptococcus* felelős az agyhártyagyulladás kialakulásáért. A komoly gombás fertőzések előfordulhatnak az immunrendszer rendellenességekkel küzdő betegek esetében, azon betegek esetében, akik szerv, vagy csontvelő átültetésen mentek át, azon rákos betegek esetében, akik kemoterápiás kezelést kaptak, akik súlyos operáción mentek keresztül, vagy HIV pozitívak. Az ilyen betegeknek a gombaellenes terápia tipikusan

egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid készítmény, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag intravénás adagolását jelenti, amelynek során néhány nap alatt a fertőzést megállíthatjuk vagy visszaszoríthatjuk.

Ami a gombaellenes aktivitást illeti, az itt használt „hatékony mennyiség” kifejezés a jelen találmány egy vegyületének azt a mennyiségét jelenti, amely képes a gombás szaporodás vagy aktivitás gátlására, vagy a gombás fertőzés szimptómáinak csökkentésére. A legtöbb gombás fertőzés szimptómáinak csökkentése magában foglalja a láz csökkentését, a normális állapotba történő visszatérést és a beteg egészségének folyamatos visszatérését. Előnyösen a szimptómákat csökkentjük a gomba megölésével a fertőzés megszüntetésére, vagy a fertőzés olyan szintre történő csökkentésével, amely a betegek által tolerálható, vagy a beteg immunrendszere képes tolerálni. Az itt használt „gátlás” kifejezés jelentése a gomba aktivitásának csökkentése, amely magában foglalja a fertőzés megállítását, elnyújtja vagy profilaktikusan elrejtja vagy megelőzi a növekedést, vagy bármilyen, a gomba jelenlétéhez kapcsolódó jellemzőt, és eredményt.

Tipikusan a készítményeket beteg egyedeknek (embereknek vagy állatoknak, beleértve az olyan emlősöket, mint macskák, lovak, szarvasmarhák és szárnyasok) adagoljuk azok szükségletétől függően, olyan hatékony mennyiségben, amely gátolja a gombás fertőzést. Az adagolt dózis változik olyan faktoroktól függően, mint a fertőzés természete és súlyossága, a beteg életkora és általános állapota, és a gombaellenes szerekkel szembeni érzékenysége. Az aktuális dózistartomány hasonlóképpen függhet ezektől a faktoroktól, és adhatjuk azokat napi egyszeri dózisban, vagy naponta többször alkalmazva. Az adagolás elhúzódhat 2-3 napig, vagy mintegy 2-3 hétig vagy hosszabb ideig. Egy tipikus napi dózis (egyszeri



vagy többszöri adagban) tartalmazza a találmány szerinti aktív vegyület mennyiségét 0,01 mg/testtömeg kg – 100 mg/testtömeg kg tartományban. Az előnyös napi dózis általában 0,1 mg/testtömeg kg – 60 mg/testtömeg kg, ideálisan 2,5 mg/testtömeg kg – 40 mg/testtömeg kg. Súlyos fertőzések esetében a vegyületet intravénás infúzió formájában, például az aktív hatóanyagot 0,01-10 mg/kg/óra mennyiségben adagoljuk.

A jelen találmány gyógyszerészeti készítményeket is ajánl, amelyek alkalmasak a találmány gombaellenes vegyületeinek adagolására. Ennek megfelelően a találmány egy gyógyszerészeti készítményt is ajánl, amely egy vagy több gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagot, hígító anyagot, segédanyagot, alkotórészt és további adalékanyagot, és egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot tartalmaz. Az aktív hatóanyag mennyisége az ilyen készítményekben 0,1-99,9 tömeg %, előnyösen 10-30 tömeg %. A „gyógyszerészetileg elfogadható” kifejezés jelentése az, hogy a segédanyagok, vivőanyagok és alkotórészek kompatibilisek a készítmény további anyagaival, és nem ártalmasak a beteg számára.

A készítmény tartalmazhat további olyan additívanyagokat, mint különböző olajok, beleértve az ásványi olajokat, állati, növényi vagy szintetikus eredetű anyagokat, például mogyoró olajat, szójaolajat, ásványi olajat, és szezámolajat. A megfelelő gyógyszerészeti segédanyagok közé soroljuk a keményítőt, cellulózt, glükózt, laktózt, a cukrot, zselatint, magnézium-sztearátot, nátrium-sztearátot, glicerín-monosztearátot, nátrium-kloridot, szárított tejport, a glicerint, propilén-glikolt, vizet és etanolt. A készítmények készítésénél alkalmazhatjuk a hagyományos eszközöket, eljárásokat, mint a sterilizálás, és a készítmények tartalmazhatnak hagyományos gyógyszerészeti additívanyagokat, mint a tartósítószer, stabilizáló anyagok, nedvesítő anyagok, vagy emulzifikáló anyagok, sók, az



ozmotikus nyomás elérésére, és pufferek. A megfelelő gyógyszerészeti segédanyagokat és azok készítését megtalálhatjuk a következő tanulmányban: Martin: „Remington Pharmaceutical Sciences”, 15th Edition; Mack Publishing Co., Easton (1975): lásd például 1405--1412 oldal és 1461-1487 oldal.

Az itt használt „gyógyszerészetileg elfogadható sók” kifejezés a fenti képletű vegyületek olyan sóit jelenti, amelyek nem toxikusak élőlények számára. A tipikus gyógyszerészetileg elfogadható sók azok a sók, amelyek a találmány vegyületeinek szervesetlen vagy szerves savval vagy szervesetlen bázissal történő reakciójával készülnek. Az ilyen sókat savaddíciós sóként, vagy bázis addíciós sóként ismerjük.

A savaddíciós sók készítéséhez általánosan használt szervesetlen savak a hidrogén-klorid, hidrogén-bromid, hidrogén-jodid, kénsav, és foszforsav, és a szerves savak, mint a p-toluol-szul-fonsav, metán-szulfonsav, oxálsav, p-bróm-fenil-szulfonsav, szénsav, borostyánkősav, citromsav, benzoésav, és ecetsav. A gyógyszerészetileg elfogadható sók példái a szulfátok, piro-szulfátok, biszulfátok, szulfitok, biszulfitok, foszfátok, mono-hidrogén-foszfátok, dihidrogén-foszfátok, metafoszfátok, piro-foszfátok, kloridok, bromidok, jodidok, acetátok, propionátok, dekanóátok, kaprilátok, akrilátok, formátok, izobutirátok, kaproátok, heptanoátok, propiolátok, oxalátok, malonátok, szukcinátok, suberátok, szebacátok, fumarátok, maleátok, butin-1,4-dioátok, hexin-1,6-dioátok, benzoátok, klór-benzoátok, metil-benzoátok, dinitro-benzoátok, hidroxibenzoátok, metoxibenzoátok, ftalátok, szulfonátok, xilol-szulfonátok, fenil-acetátok, fenil-propionátok, fenil-butirátok, citrátok, laktátok, gamma-hidroxibutirátok, glikolátok, tartarátok, metán-szulfonátok, propán-szulfonátok, naftalén-1-szulfonátok, naftalén-2-szulfonátok, és mandelátok. Előnyös gyógyszerészetileg elfogadható savaddíciós sók



szervetlen savakkal a kloridok és bromidok, szerves savakkal a maleátok és metán-szulfonátok.

Bázis addíciós sók tartalmazzák a szervetlen bázisokkal alkotott sókat, mint ammónium-hidroxiddal, alkáli- vagy alkáli földfém hidroxidokkal, karbonátokkal és bikarbonátokkal alkotott sókat. A találmány sóinak előállítására alkalmas bázisok a nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónium-hidroxid, kálium-

-karbonát, nátrium-karbonát, nátrium-bikarbonát, kálium-bikarbonát, kalcium-hidroxid és kalcium-karbonát. A kálium és nátrium sók különösen előnyösek.

Az nyilvánvaló, hogy a találmány bármilyen sójának kationja vagy anionja nem kritikus, amennyiben a só teljes egészében gyógyszerészetileg elfogadható.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot adagolhatjuk parenterálisan, például intramuszkuláris, szubkután vagy intra-peritoniális injekciót használva, alkalmazhatjuk nazálisan vagy orálisan. Ezen az adagolási módokon túlmenően a *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot alkalmazhatjuk helyileg bőr felületi fertőzések kezelésére, vagy a nyálkában gombás növekedés gátlására.

A parenterális alkalmazáshoz a készítmény tartalmaz egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptidet, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot, és egy fiziológiailag elfogadható oldószert, mint az ioncserélt vizet, a fiziológiás sóoldatot, 5 %-os dextróz oldatot és más általánosan használt oldószereket. A készítmény tartalmazhat egy ciklodextrint és/vagy egy oldódást segítő anyagot, mint a polietilén-glikol, a polipropilén-glikol, vagy más ismert szolubilizáló ágensek. A készítményeket kisserelhetjük steril porampullákban, amelyek a gombaellenes anyagot és a segédanyagokat száraz por, vagy liofilizált por formájában tartalmazzák. Alkalmazás előtt a

porampullába fiziológiailag elfogadható oldószert adunk, az anyagot feloldjuk, és az oldatot fecskendő segítségével adagoljuk a betegeknek.

A jelen gyógyszerészeti készítmények előállítására ismert eljárásokat, és ismert, könnyen hozzáférhető és elkészíthető segédanyagokat alkalmazunk. A jelen találmány készítményeinek előállításánál az aktív hatóanyagot általában összekeverjük a segédanyagokkal, vagy hígítjuk egy segédanyaggal, vagy bezárjuk egy kapszula, tasak, papír vagy más tartályformába. Amennyiben egy segédanyag hígító anyagként szolgál, az lehet szilárd, fél-szilárd, folyadék halmazállapotú, amely az aktív hatóanyagra nézve vivőanyagként, segédanyagként vagy közegként szolgál. Így a készítmények lehetnek tabletták, pirulák, porok, cukorkák, tasakok, ostyák, elixírek, szuszpenziók, emulziók, oldatok, szirupok aeroszolok (mint szilárd formák, vagy folyadék közegben a kenőcsök, például maximum 10 tömeg % aktív anyagot tartalmaznak a lágy és kemény zselatin kapszulákban, kúpokban, a steril injektálható oldatokban, vagy sterilen készített porokban.

Orális alkalmazásra az antifungális anyagot egy zselatin kapszulába töltjük, vagy tablettáformát készítünk. Az ilyen tabletták tartalmazhatnak egy kötőanyagot, egy diszpergáló vagy más megfelelő segédanyagot, a *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 decapeptid A antifungális anyag megfelelő méretű és dózisú tablettáinak kialakításához. Gyermekeknek és időseknek az antifungális vegyületet készíthetjük ízesített folyékony szuszpenzió, oldat vagy emulzió formájában. Egy előnyös orális készítmény linolénsavat, cremofor RH-60-at, és vizet, előnyösen 8 térfogat % linolénsavat, 5 térfogat % cremofor RH-60-at, 87 térfogat % steril vizet és 2,5-40 mg/ml mennyiségű *P. syringae* lipodepsidekapeptid, 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot tartalmaz.





Helyi alkalmazásra a gombaellenes anyagot formulázhatjuk száraz por formájában a bőr felszínén, vagy formulázhatjuk folyadék formában, amely vizes vagy nem-vizes közeget, például egy alkoholt vagy glikolt tartalmaz.

A *P. syringae* lipodepsidekapeptid készítmények alkalmazása

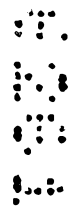
A jelen találmány tárgya továbbá egy kit, amely tartalmaz egy találmány szerinti készítményt és eljárást azok alkalmazására. A kit része lehet egy ampulla, amely a jelen találmány készítményét és a megfelelő vivőanyagot tartalmazza por, vagy oldat formájában. A kit tartalmaz továbbá használati utasításokat címke formában az ampullán, vagy egy különálló utasítás formájában az ampulla mellé helyezve a vegyületek alkalmazására és adagolására. Az utasításokat rányomtathatjuk az ampullát tartalmazó dobozra is. A használati utasítás olyan információkat tartalmaz, mint a megfelelő dózis, adagolási forma, amelynek alapján egy egészségügyi dolgozó biztonsággal végzi a szer adagolását. Egészségügyi dolgozó e területen bármilyen szakorvos, nővér, vagy technikus, akik a gyógyszereket általában beadhatják.

A jelen találmány tárgya továbbá egy gyógyszerészeti készítmény, amely egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot tartalmaz, amely alkalmas injekció útján történő beadásra. A találmány eljárása szerint az egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot alkalmazhatjuk egy készítmény vagy gyógyszer előállítására, amely alkalmas injekció útján történő beadásra. A találmány tárgya továbbá eljárás készítmények előállítására, amely egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot tartalmaz és a készítmény alkalmas orális vagy helyi alkalmazásra. Például egy folyékony vagy

szilárd készítményt előállíthatunk különböző módon, a hagyományos eljárásokat alkalmazva. A folyékony készítményeket előállíthatjuk az egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag megfelelő oldószerben történő feloldásával, például vízben, megfelelő pH értéken, amely puffereket és más adalékanyagokat is tartalmaz.

Mezőgazdasági alkalmazás

A *P. syringae* NRRL B-12050 által termelt antibiotikumok az irodalomban leírtak szerint hatékonyak a holland szilfa gombásodásának kezelésében. (lásd például a 4,342,746 és 4,277,462 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmakban leírtakat). A vad típussal összehasonlítva különösen a *P. syringae* MSU 16H mutatott magasabb fokú védelmet, amikor a szilfát *Ceratocystis ulmi* mikroorganizmussal, a holland szilfa gombásodás okozójával fertőzték (lásd például Lam és munkatársai, *Proc. Natl. Sci. USA*, 6447-6451 (1987)). A szilfákkal végzett több intenzív kísérlet igazolta azt, hogy a fák ezen gombásodása megfelelő kezeléssel megelőzhető. Így a jelen találmány lipodepsidekapeptidei alkalmazhatók a holland szilfák gombásodásának megelőző kezelésére. Ismert tény, hogy a pseudomycinek toxikusak egy sor növényi patogén gomba ellen, mint például a *Rynchosporium secalis*, a *Ceratocystis ulmi*, a *Rhizoctonia solani*, a *Sclerotinia sclerotiorum*, a *Verticillium albo-atrum*, a *Verticillium dahliae*, a *Thielaviopsis basicola*, a *Fusarium oxysporum*, és a *Fusarium culmorum* (lásd például Harrison L. és munkatársai, „Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity” *J. General Microbiology*, 7, 2857-2865 (1991). Következésképpen, egy vagy több *P. syringae*



lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag (beleértve hidrátjait, szolvátjait, és észtereit) hatékony lehet a növényi gombák (különösen a *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani* és *F. oxysporum*) kezelésében akár a fertőzést követően, akár megelőzés céljából. Általában a fertőzött növényeket úgy kezeljük, hogy a lipodepsidekapeptid vizes szuszpenzióját ráfecskendezzük a növényre. A fecskendezés eszközei, berendezései jól ismertek az irodalomban jártas szakemberek számára. A spray bármilyen formáját alkalmazhatjuk az aktív hatóanyag hatékony mennyiségének a növény felületére juttatására. A szuszpenzió tartalmazhat további, az irodalomban jártas szakember számára ismert additív anyagokat, mint szolubilizáló szerek, stabilizátorok, nedvesítő szerek és ezek kombinációi.

A növény kezelését elvégezhetjük egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid, mint a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyag száraz, szilárd készítményeivel. A száraz készítményeket felvihetjük a növény felszínére az irodalomban jártas szakember számára ismert eszközökkel, módszerekkel, mint például spray formájában, vagy egy tartályból történő kiszórással.

A találmányt jobban megérthetjük a következő példák alapján. E példákat a találmány reprezentatív szemléltetésére szántuk a találmány oltalmi köre korlátozásának szándéka nélkül.

PÉLDÁK

Biológiai anyagok letétbe helyezése

A *P. syringae* MSU 16H hivatalosan elérhető és megvásárolható az American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, USA, azonosító száma: No. ATCC 67028.

一、
 二、
 三、
 四、

A fermentlé összetétele a következő, g/liter egységben kifejezve: dextróz: 20, oldható keményítő: 5, Basic American Foods Country Style Potato Pearls burgonyapép: 30, glicin:1, magnézium-szulfát x 7 H₂O: 0,2, kálium-klorid: 0,2, vas (II)-szul-fát x 7 H₂O:0,004 csapvízben készítve. A pH értéket sterilizálás előtt 5,2-re állítottuk. A fermentációt 25 °C-on 68 órán át folytattuk. Az oldott oxigén mennyiségét 30 %-on vagy ezen érték fölött tartottuk a levegő áram és az impeller keverő fordulatszámának folyamatos állításával. A pH értéket 4,0-5,4 értékek között tartottuk szükség szerint kénsav vagy nátrium-hidroxid adagolásával.

Az új ciklusos peptid termék előállítására az egyszerű fermentációs folyamat néhány változatát dolgoztuk ki. A dextrózt folyamatosan adagolhatjuk a fermentorba 24 órával az inokulálás után 60 ml/óra mennyiségben. A dextróz adagolást folytathatjuk a fermentáció teljes folyamatában. Alternatív módon egy eljárást dolgoztunk ki, amelynek során az oldott oxigén mennyiségét 5 %-ra állítottuk 24 órával az inokulációt követően, és ezt az értéket tartottuk a fermentáció végéig. Az oldott oxigén 5 %-on tartását inert nitrogén gáz adagolásával értük el. Minden esetben a gáz adagolását egy egyszerű belemerülő csövön keresztül oldottuk meg nyitott állásban közvetlenül az alsó turbina keverő alá vezetve.

Eredmények és konklúzió

Számos fermentációs eljárás a *P. syringae*-ből 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyagot termel.

2. Példa -A 25-B1 A gombaellenes szer izolálása és tisztítása

Eljárásokat fejlesztettünk ki a *Pseudomonas syringae* törzs fermentlevében termelt lipodepsidekapeptid gombaellenes anyag, a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag izolálására és tisztítására.



Anyagok és eljárások

Az 1. példa alapján gyártott fermentlé mennyisége tipikusan 100 liter volt vágás után, amelyet egy MembraloxTM 0,45 μ m pórusméretű kerámiaszűrőn szűrtünk le. A szűrőben maradó szilárd anyagot extraháltuk 0,1 % trifluor-ecetsavat tartalmazó azonos térfogatú acetonnal 90 percen át. Az acetonos extraktumot szűrtük, és vákuumban bepárolva vizes oldatot nyertünk.

Ezt az oldatot egyesítettük az eredeti szűrlettel, és folyamatosan egy 4 liter térfogatú kromatografáló oszlopba vízben töltött AmberchromTM CG300 sd gyanta tetejére adagoltuk. Az adszorpció után az oszlopot mostuk 0,2 %-os ecetsav oldattal (pH 4-8), amíg az elfolyó oldat pH-ja elérte a 4,5 értéket, ezután mostuk 10 liter térfogatú 0,2 % ecetsavat tartalmazó 22 %-os acetonitril oldattal (pH 4,8). Ezután lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk 32 liter térfogatú 0,2 % ecetsavat tartalmazó 22-35 % acetonitril vizes oldattal, és 8 liter térfogatú 0,2 % ecetsavat tartalmazó 35 % acetonitril vizes oldattal, 400 ml/óra sebességgel. A 11-16 számú frakciókat (4,8 liter) egyesítettük, vákuumban 100 ml térfogatig bepároltuk, majd centrifugáltuk.

A felülúszót elválasztottuk és 1 liter térfogatú Amberchrom CG 300sd oszlopon kromatografáltuk lineáris gradiens elúcióval 0,2 % ecetsavat tartalmazó 22-35 % acetonitrilt tartalmazó vizes oldattal (pH 4,8), 50 ml/óra sebességgel. A 20-25. számú frakciókat egyesítettük (1,2 liter) és újra kromatografáltuk egy reverz fázisú oszlopon (NovaPak C₁₈, 6 μ m, 40x300 mm, áramlási sebesség 40 ml/perc, lineáris gradiens elúció 0,2 %

TFA-t tartalmazó 30-60 % acetonitril vizes oldattal). Így 21 mg terméket nyertünk (89 % tisztaságú, UV módszerrel vizsgálva).

Az ESIMS adatok egy lehetséges $[M+H]^+$ csúcsot mutattak 1165,7 m/z értéknél, amely különbözik a *P. syringae*-ből izolált ismert gombaellenes anyagok megfelelő értékétől. Az ^1H NMR spektrum jelei hasonlóak voltak a pseudomycin szerű lipopeptid spektrumával, azonban több mint egy anyag jelenlétét jelezték. Annak érdekében, hogy a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot szerkezet meghatározáshoz és gombaellenes hatás méréséhez megfelelő tisztasággal nyerjük, további 4 x 100 liter fermentlevet a fenti módon tisztítottunk, és ráadásul az utolsó tisztítási lépésre egy reverz fázisú oszlopkromatográfiás lépést vezettünk be [Rainin C_{18} 6 μm , 24x250 mm, lineáris gradiens elúció 0,1 % TFA-t-acetonitril-metanol elegy (8:1:1-től 4:3:3-ig) 60 percig, majd (4:3:3-től 10:45:45-ig) 30 percig]. Így 42 mg 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot nyerünk 93 % tisztasággal (UV alapján).

Eredmények és konklúzió

A többi lipodepsipeptid gombaellenes anyag tisztításánál alkalmazott HPLC módszerhez hasonló preparatív HPLC segítségével a fermentléből megfelelő tisztaságban nyertük a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyagot.

3. Példa - A 25-B1 A gombaellenes szer szerkezetének meghatározása

Tömegspektroszkópia és NMR spektroszkópia segítségével határoztuk meg a lipodepsidecapeptid gombaellenes anyag, a 25-B1 decapeptid A gombaellenes szer szerkezetét.

Módszerek és eredmények

A 25-B1 dekaeptid A gombaellenes szer összegképletét nagy felbontású FABMS módszerrel határoztuk meg, és azt $C_{52}H_{88}N_{14}O_{16}$ képletnek találtuk [m/z 1165,6581 a $C_{52}H_{89}N_{14}O_{16}$ $(M+H)^+$ képletre, $\Delta +0,9$ ppm].

Összhangban e tapasztalati képlettel a ^{13}C NMR spektrum és DEPT NMR spektrum 50 különálló rezonancia jelet mutatott, amely tartalmazott 12 karbonil szénatomot, 5 olefin szénatomot, 4 oxigént tartalmazó sp^3 szénatomot, 8 tipikus aminosav α -szén-atomot, 15 metilén szénatomot és 6 metil szénatomot. Ezek közül egy metil szénatom jele δ 16,7 ppm értéknél és egy metilén szénatom jele δ 28,9 ppm értéknél degenerált szénatomok szettjét alkotta, a tapasztalati képletből adódó 52 szénatomnak megfelelően.

Az ^1H , ^{13}C és 2D NMR (DQCOSY, TOCSY, HMQC, HMBC, és ROESY) adatok alapján meghatároztuk a 25-B1 dekaeptid A gombaellenes szer (IA) szerkezetét, és egyértelműen azonosítottuk valamennyi hidrogénatomot és szénatomot (1. Táblázat).

1. Táblázat

A 25-B1 dekaeptid A gombaellenes szer ^1H és ^{13}C NMR adatai
DMSO- d_6 -ban

Aminosav	Atomok helyzete	δ_H	δ_C
Arg	NH	8,13	-



	CO	-	170,4
	á	4,23	51,7
	â1	1,69	28,2
	â2	1,63	
	ã	1,46	24,7
	ä	3,08	40,2
	NH	7,59	-
	å	-	156,7
Thr-1	NH	7,83	-
	CO	-	169,8
	á	4,23	59,5
	â	4,00	66,4
	ã	1,08	19,7
Dha	NH	9,01	-
	CO	-	163,7
	á	-	135,3
	â1	5,86	106,4
	â2	5,61	
Ala-1	NH	7,96	-
	CO	-	171,6
	á	4,22	49,9
	â	1,31	16,7
Aminosav	Atomok helyzete	ä_H	ä_C
Dhb	NH	9,07	-
	CO	-	164,0
	á	-	130,0
	â	6,40	128,5

	α	1,61	12,9
HSer	NH	8,22	-
	CO	-	171,1
	α	4,22	51,4
	α1	1,82	34,0
	α2	1,76	
	α	3,47	57,3
Gln	NH	7,59	-
	CO	-	171,9
	α	4,31	52,0
	α1	1,90	27,9
	α2	1,73	
	α	2,11	31,1
	CO	-	173,9
	NH ₂	7,13	-
		6,72	
Thr-2	NH	7,80	-
	CO	-	169,9
	α	4,11	58,4
	α	4,11	66,0
	α	1,01	19,8
Aminosav	Atomok helyzete	α_H	α_C
Ala-2	NH	8,18	-
	CO	-	172,4
	α	4,32	48,5
	α	1,16	17,6

Thr-3	NH	7,93	-
	CO	-	168,6
	α	4,47	55,6
	α	4,94	70,5
	α	1,12	16,7
Oldallánc	CO		172,2
	2	2,08	35,1
	3	1,44	25,1
	4	1,21	28,5
	5-10	1,21	31,1; 28,9X2 28,8; 28,7; 28,6
	11	1,21	22,0
	12	0,83	13,9

A DMSO-d₆-ban 35 δ C-on mért ^1H , DQCOSY és TOCSY spektrumok adatai igazolták hét általánosan előforduló aminosav rész, két alanin, egy arginin, egy glutamin és három treonin, és 3 kevésbé általánosan előforduló aminosav, egy dehidro-alanin (Dha), egy dehidro-amino-vajsav (Dhb) és egy homoszerin spin rendszerének jelenlétét. A kevésbé általánosan előforduló aminosav részeket, nevezetesen a (Dha)-t, (Dhb)-t és homoszerint a TOCSY spektrumban észlelt keresztjelekkel határoztuk meg, amelyek eltolódása az amid protonoktól δ 9,01 (széles s), 9,07 (széles s) és 8,22 ppm-nél jelentkezik, a további protonok és szénatomok eltolódásai: δ 5,86, 5,61 (δ _C 106,4), 6,40 (δ _C 128,5), 1,61 (δ _C 12,9), 4,22 (δ _C 51,4), 1,82, 1,76 (δ _C 34,0), 3,47 (δ _C 57,3). E ^{13}C NMR spektrumnak megfelelően 8 proton kapcsolódik a telített aminosav részek α -helyzetű szénatomjaihoz, és 2 kvaterner α -helyzetű szénatom jelentkezik a telítetlen Dha és Dhb

aminosavak esetén. A 12 amid vagy észter típusú karbonil szénatom közül kilencet azonosítottunk mint 8 telített aminosav részhez kapcsolódót (kettőt a glutaminhoz), kettőt (δ 164,0 és 163,7 ppm) a Dha és Dhb-hez. A megmaradó egy karbonil szénatom a dodekanoil oldallánc része, amelyet továbbá a terminális metil-jelek, (δ_H 0,83 és δ_C 13,9), valamint a ^{13}C NMR spektrumban megjelenő 10 metilén-jel igazol (1. Táblázat).

Az összegképlet alapján a molekula 16 telítetlen kötést tartalmaz. A 10 aminosav és a dodekanoil oldallánc 15 telítetlen kötést mutat jelezvén, hogy a 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyag egy monociklusos dekapeptid. A treonin béta protonjai kémiai eltolódásának (δ_H 4,94, 4,11 és 4,00) összehasonlítása azt jelzi, hogy a δ_H 4,94 ppm-nél jelentkező proton egy karbonil-csoporthoz kapcsolódik, amely lehet észter vagy lakton. Ezáltal a 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyag depsidekapeptid szerkezetét a HMBC és ROESY adatok igazolták. Ezen adatok szintén alátámasztották az aminosav szekvenciát és a dodekanoil lánc helyzetét a 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyagban. Az arginin aminosav, mint kiindulási pont esetén egy „long range” korrelációt figyeltünk meg a HMBC spektrumban az amid proton és a szomszédos aminosav karbonil és alfa-szénatom között (lásd I. ábra), amely minden kétséget kizáróan igazolja az aminosav szekvenciát: Arg-NH/Thr-CO, Thr-NH/Dha-CO, Dha-NH/Ala-CO, Ala-NH/Dhb-CO, Dhb-NH/Hse-CO, Hse-NH/Thr-CO, Thr-NH/Ala-CO és Ala-NH/Thr-CO.

Az alaninnal szomszédos treonin NH csoport nem mutat long range korrelációt az arginin karbonil-csoportjával, ehelyett korrelációt mutat a dodekanoil oldallánc karbonil csoportjával. A Thr-NH/Arg-CO korreláció hiánya és a Thr- α -H (δ_H 4,94, δ_C 70,5)/Arg-CO egyértelműen a Thr- α -OH és Arg-COOH csoportok között kialakult észter csoportra utal. Ezen



állításokat támasztja alá a ROESY korreláció, amelyet az amid protonok és a szomszédos aminosavak α -protonjai között észleltünk (lásd II. ábra).

Megállapítások

A 25-B1 dekapeptid A gombaellenes vegyület a lipodepsi-dekapeptidek új osztályát képviseli, amely tartalmaz néhány olyan aminosav egységet, amely nem szerepel a *P. syringae* különböző izolátumai által termelt pseudomycinekből, syringomycinekből, syringotoxinokban és syringostatinokban. Az új depsipeptid 10 aminosavból áll, amely egy további különbség a pseudomicinekkel és syringomicinekkel szemben, amelyek csak 9 aminosav egységet tartalmaznak. A természetes pseudomycin termékektől eltérően az új depsipeptid nem tartalmaz klór-treonint, amely vélhetően az okozója a pseudomycin vegyületeket tartalmazó injekciós készítmények irritációt okozó mellékhatásának.

4. Példa – A 25-B1 dekapeptid antifungális A anyag gombaellenes hatása

A gombaellenes hatás mérését a National Committee for Clinical Laboratory standards előírásai alapján egy mikrotiter hígítási eljárással egy 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük. Sabouraud és dextróz táptalajokat úgy állítottuk be, hogy $2,5 \times 10^4$ conida/ml-t tartalmaztak. A tesztvegyületet feloldottuk vízben, és a tesztelést kétszeres hígításban kezdtük a legmagasabb, 20 μ g/ml koncentrációval. A lemezeket 35 °C-on 48 órán át inkubáltuk. A 2. Táblázat adatai mutatják a vegyület minimum gátló koncentrációját (MIC érték), amely teljesen gátolja a mikroorganizmus szaporodását szemben a kezeletlen kontrollal.

2. Táblázat. Az (I) képletű vegyület gombaellenes hatása

Mikroorganizmus	MIC (µg/ml)
<i>Candida albicans</i>	10
<i>C. parapsilosis</i>	10
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,25
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>20
<i>Histoplasma capsulatum</i>	20

Egy vagy több *P. syringae* lipodepsipeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag jelenlétét vagy mennyiségét a készítmény gombaellenes hatásának mérésével határozhatjuk meg. A gombaellenes hatást meghatározhatjuk in vitro a készítmény minimum gátló koncentrációjával (MIC érték), standard agar hígítási módszert, vagy egy lemez diffúziós módszert használva. Egy vagy több *P. syringae* lipodepsipeptid, mint a 25-B1 decapeptid A gombaellenes anyag preparátuma lehet a sejt kultúra, vagy egy jobban tisztított elegy extraktuma. A gombaellenes hatás tesztelésében alkalmazott egyik tipikus gomba a *Candida albicans*. A gombaellenes hatást akkor tekintjük jelentősnek, ha a készítmény 10-12 mm átmérőjű gátló zónát eredményez egy *Candida albicans* x 657 agar lemezen.

5. Példa - A *Pseudomonas syringae* izolálása, jellemzése és mutagenézise

A *P. syringae* környezeti izolátumait és mutánsait állítottuk elő és alkalmaztuk a gombaellenes szerek termelésében.

Anyagok és eljárások

Az MSU 174 és MSU 16-H törzsek izolálását és jellemzését az 1996 november 19.-én közzétett 5,576,298 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban írta le G.Strobel és munkatársai; Harrison és munkatársai a „Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity,” J. Gen. Microbiology **137**, 2857-2865 (1991); és Lamb és munkatársai „Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease,” Proc. Natl.Acad.Sci. USA **84**,6447-6451 (1987) közleményekben. Az e közleményekben idézett utalások újdonságai referenciaként beépültek e találmányba.

További törzseket származtattunk az ilyen vad típusú és transposon generált mutánsokból kémiai mutagenézissel. A mutagenézisnek alávetett törzsek magukban foglalták az MSU 174, az MSU 16H és a 25-B1 törzseket. A mutagenizálendő törzset burgonya terméket tartalmazó táptalajon szaporítottuk, azután szétosztottuk egy olyan közegbe, amely 0, 1, 2, 4, 16 vagy 32 mM 1-metil-3-nitro-1-nitrozo-guanidin (NTG vagy MNNG)

kémiai mutagén anyagot tartalmazott. Ezeket a sejteket lefagyasztottuk a jövőbeni mérésekre és szelekcióra.

A mutagenizált sejteket szelektáltuk egy vagy több *P. syringae* lipodepsipeptid, mint a 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyag kívánatos növekedési feltételei és/vagy termelése szerint. A kémiaailag mutagenizált *P. syringae* sejteket, a mutagenizált 25-B1 törzseket felolvasztottuk, és 6 sejt/ml-re hígítottuk N21SM közeggel (3. Táblázat). Ez a közeg néha egy vagy több komponenst tartalmazott a szelekcióra, mint például különböző koncentrációjú foszfátokat. Egy 50 mM



térfogatú mutagenizált sejt szuszpenziót szétosztottunk egy 96 lyukú kör alakú mikrotiter lemezen átlagosan 0,3 sejt/lyuk mennyiségben.

Tipikusan szilikon olajat adtunk mindegyik lyukba a bepárlódás minimalizálására. A lemezeket rázatás közben 6-12 napig inkubáltuk 25 °C-on.



3. Táblázat
Az N21SM médium összetétele

ALKOTÓRÉSZEK	GRAM/LITER
glukóz	20
ammónium-szulfát	0,5
nátrium-glutamát	2
L-hisztidin	2
glicin	0,5
oldható keményítő	5
KH ₂ PO ₄	0,2
Czapek ásványi só oldat	2 ml
MES puffer	9,8
PH beállítás 5,0-re	

Az inkubálás után egy aliquot részt, általában 10⁻¹-t hígítottunk sorozatban mindegyik lyukból (például 1:56, 1:196, 1:320, 1:686 és/vagy 1:1715), és értékeltük *Candida albicans* gombával szembeni aktivitásra egy folyékony mikrotiter lemez bioassay alkalmazásával. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át, és a lyukakat teszteltük *C. albicans* növekedésre. A megfelelő törzseket kiemeltük, CSM közegbe inokuláltuk (4. Táblázat) és 1-3 napig inkubáltuk 25 °C-on.



4. Táblázat
Teljes *Streptomyces* közeg (CSM)

Összetevők	Koncentráció (g/liter)
glükóz	5
maltóz	4
Difco tripton szója táptalaj	30
Difco élesztő kivonat	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2
pH beállítás nincs	

A kiválasztott törzseket tartósítottuk és inokuláltuk olyan fermentációs lombikokba, amelyek 13 ml N21SM táptalajt tartalmaztak és rázattuk mintegy 66 órán át 25 °C-on. A fermentáció során aliquot részeket vettünk ki a fermentáléból, extraháltuk 1 órán át az aliquot résszel azonos térfogatú acetonitrillel, centrifugáltuk, és a felülúszót HPLC segítségével vizsgáltuk egy vagy több, az 1-3 példában leírt *P. syringae* lipodepsi-dekapeptid, mint 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyag jelenlétére. Az egy vagy több *P. syringae* lipodepsi-dekapeptid 25-B1 dekapeptid A gombaellenes anyagot termelő törzseket újra izoláltuk, ismételt fermentációt indítottunk és előkészítettük egy nagyobb léptékű fermentáció oltóanyagaként.

Eredmények

A fenti eljárásokat használva olyan törzseket állítottunk elő, amelyek egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekapeptid 25-

-B1 dekaeptid A gombaellenes anyagot termelnek.

Konklúzió

Az itt közölt kiválasztási módszerek és kritériumok hatékonyak a *P. syringae* törzsek termelésére, amelyek a minimum közegben nőnek, és egy vagy több *P. syringae* lipodepsidekaeptid 25-B1 dekaeptid A gombaellenes anyagot termelnek.

6. Példa – A *P. syringae* lipodepsidekaeptidet tartalmazó készítmények

A következő formulázási példák a találmány lényegét illusztrálják és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

Az „aktív hatóanyag” kifejezés jelentése *P. syringae* lipodepsi-dekaeptid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója.

1. Készítmény

Kemény zselatin kapszulákat készítettünk, amelyek az alábbi alkotórészeket tartalmazzák:

Alkotórészek	Mennyiség (mg/kapszula)
aktív hatóanyag	250
szárított keményítő	200
magnézium-sztearát	10
összesen	460 mg

2. Készítmény

Tablettát készítettünk az alább felsorolt alkotórészekkel. Az anyagokat összekevertük, és tablettáztuk úgy, hogy a tabletták átlagtömege 665 mg.

Alkotórészek	Mennyiség (mg/kapszula)
aktív hatóanyag	250
mikrokristályos cellulóz	400
szilikon-dioxid	10
sztearinsav	5
összesen	665 mg

3. Készítmény

Aeroszol oldatot készítettünk, amely az alább felsorolt komponenseket tartalmazza. Az aktív hatóanyagot összekevertük etanollal, és az elegyet adtuk a hajtógáz 22 egy részéhez, lehűtöttük -30 °C-ra, és átöntöttük egy bemérő edénybe. A szükséges mennyiséget azután egy saválló acél konténerbe juttattuk, és felhígítottuk a maradék hajtógázzal. A szeleppel azután a konténert lezártuk.

Összetétel	Tömeg (g)
aktív hatóanyag	0,25
metanol	27,75
hajtógáz 22 (klór-difluor-metán)	74,00
összesen	100,00

4. Készítmény



A 60 mg hatóanyagot tartalmazó tablettákat az alább leírt módon és összetétellel készítettük:

aktív hatóanyag	60 mg
mikrokristályos cellulóz	45 mg
Polivinilpirrolidon (10%-os vizes oldat)	4 mg
nátrium-karboximetil keményítő	4,5 mg
magnézium-sztearát	0,5 mg
talkum	1 mg
összesen	150 mg

A hatóanyagot, keményítőt és cellulózt átszitáltuk egy 45 mesh (US) méretű szitán, és alaposan összekevertük. Az így készült port összekevertük polivinil-pirrolidon vizes oldatával, és átszitáltuk egy 18 mesh (US) méretű szitán. Az így készült granulát 50 °C hőmérsékleten szárítottuk, és átszitáltuk egy 18 mesh (US) méretű szitán. Előzőleg a karboximetil-cellulózt, a magnézium-sztearátot és talkumot egy 60 mesh (US) méretű szitán átszitáltuk, azután a granulához adtuk, összekevertük, majd 150 mg átlagtömegű tablettává alakítottuk.

5. Készítmény

A 80 mg hatóanyagot tartalmazó kapszulákat az alábbi módon készítettük:

aktív hatóanyag	80 mg
keményítő	59 mg
mikrokristályos cellulóz	59 mg
magnézium-sztearát	2 mg
összesen	200 mg



Az aktív hatóanyagot, a cellulózt, keményítőt és magnézium-sztearátot összekeverjük, átszitáljuk egy 45 mesh (US) méretű szitán, és 200 mg-t egy kemény zselatin kapszulába töltünk.

6. Készítmény

A 225 mg hatóanyagot tartalmazó kúpokat az alábbi módon készítettük:

aktív hatóanyag	225 mg
telített zsírsav gliceridek	2,000 mg
összesen	2,225 mg

Az aktív hatóanyagot átszitáltuk egy 60 mesh (US) méretű szitán, és szuszpendáltuk az előzőleg a szükséges minimális hővel megolvasztott telített zsírsav gliceriddel. Az elegyet azután 2 g nominális kapacitású kúpba töltöttük, és lehűlni hagytuk.

7. Készítmény

Az 50 mg hatóanyagot 5 ml dózisban tartalmazó szuszpenziót az alábbi módon készítettük:

aktív hatóanyag	50 mg
nátrium-karboximetil-cellulóz	50 mg
szirup	1,25 ml
benzoesav oldat	0,10 ml
illatanyag	q.v.
színezőanyag	q.v.
tisztított víz ad	5 ml



Az aktív hatóanyagot átszítáljuk egy 45 mesh (US) méretű szitán, és összekeverjük nátrium-karboximetil-cellulózzal és sziruppal egy jól kezelhető paszta eléréséig. Keverés közben benzoesav, illatanyag és színező anyag vizes oldatát adjuk hozzá. Végül elegendő mennyiségű vizet adunk hozzá a kívánt térfogat eléréséig.

8. Készítmény

Egy intravénás készítményt az alábbi módon állítjuk elő: ezen alkotórészek oldatát általában intravénásan adagoljuk a betegnek 1 perc alatt:

aktív hatóanyag	100 mg
izotóniás sóoldat	1,000 mg

A találmány több különböző specifikus és előnyös megvalósítását és technikai megoldását írtuk le. Azonban meg kell értenünk, hogy több variációt és módosítást végezhetünk anélkül, hogy a találmány oltalmi körét korlátoznánk.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja, azzal jellemezve, hogy a depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxil-csoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti depsidekapeptid azzal jellemezve, hogy a depsidekapeptid az alábbi szekvenciát tartalmazza:

Thr-Ala-Thr-Gln-Hse-Dhb-Ala-Dha-Thr-Arg" (SEQ, azonosító szám:1).

3. Az 1. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid *Pseudomonas syringae* lipodepsidekapeptid.

4. A 3. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid tartalmaz egy zsírsav egységet, amely a treonin amino-csoportjához amid kötéssel kapcsolódik.

5. A 4. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, azzal jellemezve, hogy a zsírsav egység egy dekánsav, egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített dekánsav,

dodekánsav, egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített dodekánsav, tetradekánsav, vagy egy vagy két hidroxilcsoporttal helyettesített tetradekánsav.

6. Az 5. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid, azzal jellemezve, hogy a zsírsav egység egy dodekánsav egység.

7. A 3. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid, azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid az (I) képletű vegyület, ahol R jelentése egy lipofil egység, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja.

8. A 7. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid, azzal jellemezve, hogy a lipofil egység 9-15 szénatomos alkil-, 9-15 szénatomos hidroxialkil-, 9-15 szénatomos dihidroxialkil-, 9-15 szénatomos alkenil-, 9-15 szénatomos hidroxialkenil-, vagy 9-15 szénatomos dihidroxialkenil-csoport.

9. A 8. igénypont szerinti *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid, azzal jellemezve, hogy a lipofil egység 9-15 szénatomos alkilcsoport.

10. A (II) képletű *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptid, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja.

11. Eljárás a gombás fertőzések gátlására, amelynek során a gombát kezeljük egy izolált *Pseudomonas syringae* depsi-dekapeptiddel, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sójával, észterével vagy hidrátjával, ahol a depsi-dekapeptid

arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gomba *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* vagy *Histoplasma capsulatum*.

13. Eljárás a gombás fertőzések csökkentésére a beteg szükséglete szerinti mértékben, amelynek során a beteget egy olyan készítménnyel kezeljük, amely egy izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptidet, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóját, észterét vagy hidrátját tartalmazza, ahol az említett depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, amelynek során a tünetek enyhítésével a gombás fertőzés súlyosságát csökkentjük.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gombás fertőzést *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* vagy *Histoplasma capsulatum* okozza.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, amelynek során az izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptidet parenterálisan adagoljuk naponta 1-3 alkalommal mintegy 0,1-5 mg/kg mennyiségben.

17. A 13. igénypont szerinti eljárás, amelynek során az említett

tünet enyhítésével a láz csökkenését, és a beteg általános állapotának javulását érjük el.

18. Izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja használata, a gombás fertőzés kezelésére alkalmas készítmény előállításában, ahol az említett depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

19. A 18. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a gombás fertőzés *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* vagy *Histoplasma capsulatum* által okozott fertőzés.

20. Eljárás egy vagy több *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid előállítására, amelynek során a *Pseudomonas syringae* szaporítását végezzük olyan táptalajon, amely három vagy kevesebb aminosavat tartalmaz pH = 4-6,5 értékek közötti tartományban addig, amíg egy vagy több *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid képződik legalább 10 ÷g/ml koncentrációban ; és az említett kultúrából egy vagy több *Pseudomonas syringae* depsidekapeptidet, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóját, észterét vagy hidrátját izoláljuk.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az aminosavként glutaminsavat, glicint, hisztidint vagy azok kombinációját alkalmazzuk

22. A 21 igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az aminosavként glicint alkalmazunk.



23. A 22. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a táptalaj komponensként oldható keményítőt, élesztőkivonatot azok kombinációját és egy lipidet alkalmazunk.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy táptalaj komponensként egy burgonya készítményt, és szójaolajat, zsírsavakat és zsírsav-észtereket tartalmazó lipidet alkalmazunk.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a burgonya készítményként burgonya dextróz táptalajt, burgonya pürét, burgonya dextringet, burgonya fehérjét vagy azok kombinációját alkalmazzuk.

26. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fermentáció alatt az oldott oxigén koncentrációját 5-30 % között tartjuk.

27. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fermentáció során a glükózt, az ammónium-hidroxidot vagy azok kombinációját folyamatosan adagoljuk.

28. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a termelt *Pseudomonas syringae* depositekapeptid, egy izolált *Pseudomonas syringae* depositekapeptid, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere vagy hidrátja, ahol az említett depositekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depositekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

29. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* olyan törzset tartalmaz, amely MSU 16H, MSU 174 vagy MSU 206 törzsekből származik.

30. A 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* MSU 16H, törzset, 25-B1 törzset, 67H1 törzset vagy 7H9-1 törzset alkalmazzuk.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a *Pseudomonas syringae* 25-B1 törzset alkalmazzuk.

32. *Pseudomonas syringae* depsidekapeptid vagy gyógyszerészetileg elfogadható sója, észtere, hidrátja azzal jellemezve, hogy a 20. igénypont szerinti eljárással készült depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

33. Eljárás a gombás szaporodás kezelésére vagy megelőzésére egy növényben vagy növényen egy izolált *Pseudomonas syringae* depsidekapeptiddel vagy gyógyszerészetileg elfogadható sójval, észterével, vagy hidrátjával azzal jellemezve, hogy a depsidekapeptid arginin, treonin, homoszerin, dehidro-amino-vajsav és dehidroalaninból álló depsidekapeptid gyűrűt, és egy az arginin karboxil-csoportjából és a treonin hidroxilcsoportjából képződő lakton gyűrűt tartalmaz.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gomba *Rhynchosporium secalis*, *Ceratocystis ulmi*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium albo-*

atrum, *Verticillum dahliae*, *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum* vagy *Fusarium culmorum*.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a gomba *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillum albo-atrum* vagy *Fusarium oxysporum*.

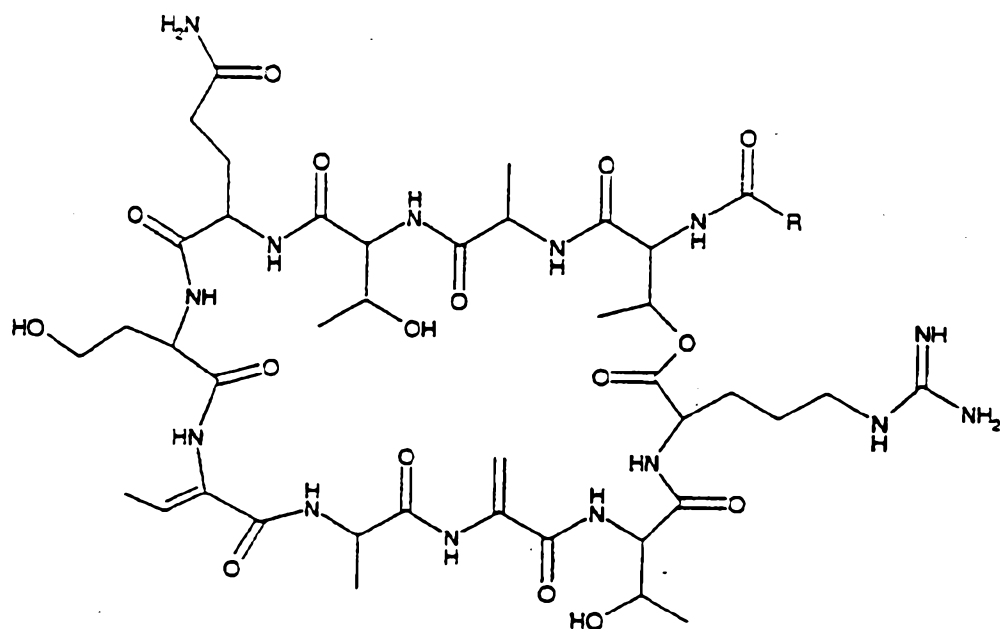
A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

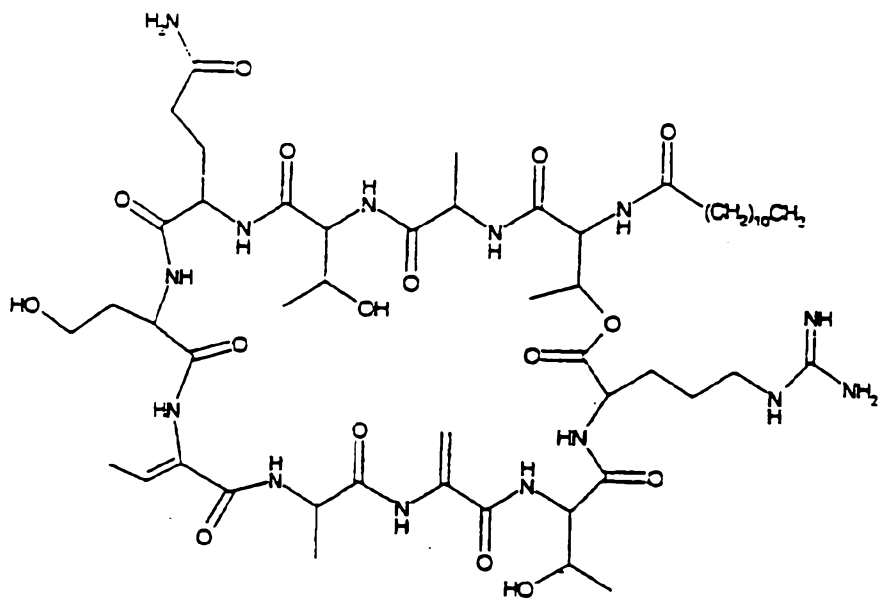
forrás

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

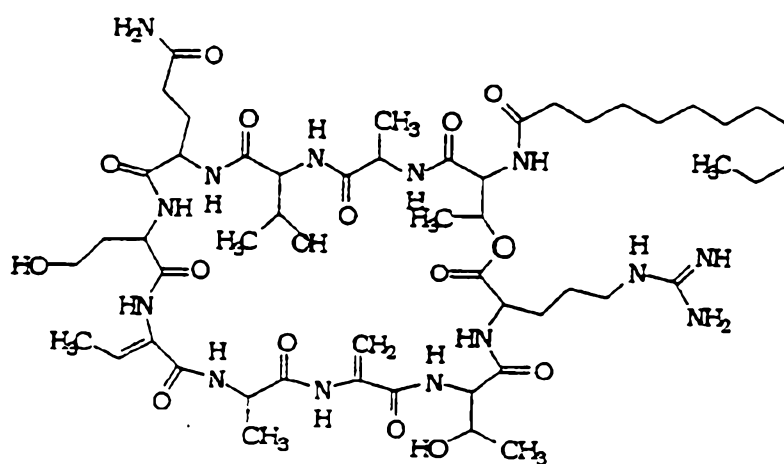
Ar



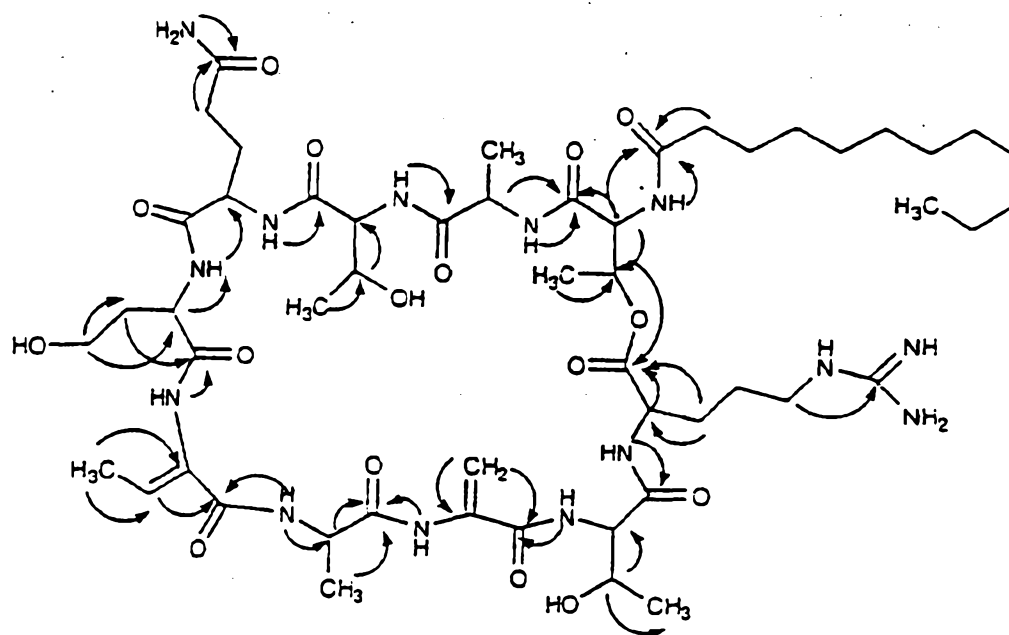
(I)



(IA)

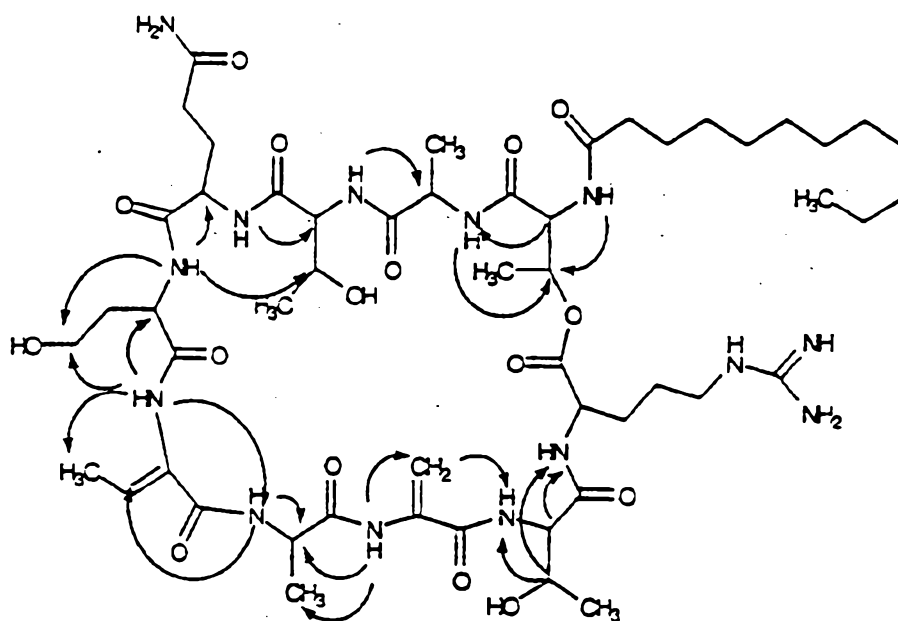


(II)



I. ábra

HMBC (H→C) Korrelációk



II. ábra

Kiválasztott ROESY Korrelációk