

P 0 2 0 0 8 9 6

73333-SZE



AL

**Természetes pseudomicin-származékok és ezek alkalmazása gombák gátlására adható gyógyászati készítmények előállítására**

## K I V O N A T

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát elkülönített pseudomicin képezi, amely pseudomicin A'-t, ennek gyógyászatilag megfelelő sóját, hidrátját, észter-származékát, pseudomicin B'-t, ennek gyógyászatilag megfelelő sóját, hidrátját, észter-származékát, vagy ezek elegyét tartalmazza.

A találmány tárgyát képezi közelebbről a pseudomicin A' és pseudomicin B', amely vegyületek az (IA) és (IB) képlettel írhatók le.

Az új pseudomicin A' és B' eredményesen alkalmazható gombák szaporodásának gátlására és gombák pusztítására; e vegyületek adhatók humán személyeknek, állatoknak vagy pedig alkalmazhatók gombákkal megtámadott növények kezelésére.

A találmány szerinti pseudomicin A' és B' eredményesen alkalmazható *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* vagy *Histoplasma capsulatum* elleni kezelésre.

A találmány kiterjed a pseudomicin A' és B'-t tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására is.

PK

P02 00896

73333-SZE

SZC. & K.  
Nemzetközi  
Gombajammi Intézet  
H-1060 Budapest, Andrássy út 117.  
Telefon: 34-249-111, 34-24-523

AR



**Természetes pseudomicin-származékok és ezek alkalmazása  
gombák gátlására adható gyógyászati készítmények előállítására  
KÖZZETÉTELI PÉLDÁNY**

A találmány tárgyát a természetből elkülönített pseudomicin-származékok képezik, ideértve a pseudomicin A' és B'-t; a találmány tárgyát képezi továbbá e vegyületek alkalmazása gyógyászati készítmények előállítására.

A gombás fertőzések számos betegséget idézhetnek elő, csökkentve így az életkörülmények minőségét, továbbá fokozva a humán betegek halálozási arányát, különösen a károsodott immunrendszerrel rendelkező betegek esetében. A gombás fertőzések száma humán személyeknél nagy mértékben növekedett az elmúlt 20 évben. Ez részben annak tulajdonítható, hogy nagy mértékben megnövekedett azon személyek száma, akiknél az immunrendszer legyengült állapotban van vagy szervátültetés, kemoterápiás rákkezelés, AIDS, idős kor vagy hasonló rendellenesség vagy állapot miatt az immunrendszer korlátozottan működőképes. Ezen személyek ki vannak téve a gombás kórokozók támadásának, minthogy a gombák a lakosság körében nagyszámmal fordulnak elő, csak a jól működő immunrendszer ezeket korlátok között tartja. Ezen kórokozókat nehéz elpusztítani, minthogy a rendelkezésre álló gombaellenes szerek egy része nagy mértékben toxikus, vagy csak a gombák szaporodását gátolja. Így például a polién származékok fungicid hatással rendelkeznek, azonban toxikusak, ezzel szemben az azol-származékok kevésbé toxikusak, azonban csak fungisztatikus hatást mutatnak. Ami még aggasztóbb, újabban megjelentek az azol és polién-származékokkal szemben rezisztens Candida törzsek is, ami nagy mértékben korlátozza ezen törzsekkel szemben alkalmazható terápiás lehetőségeket.

A *Pseudomonas syringae* a gombaellenes vagy antibiotikus hatású származékok több csoportját termeli, ezek közül említjük meg a pseudomicineket, sziringomicineket, sziringotoxinokat és sziringosztatinokat, amelyek lipodepsinonapeptidek. A *P. syringae*-hoz tartozó természetes törzsek,

és transzpozícióval létrehozott mutánsok termelik ezen lipodepszinonapeptideket. Számos olyan pszeudomicin, sziringomicin és egyéb lipodepszipeptid típusú gombaellenes származékot különítettek el, és határoztak meg kémiaiilag, amelyek széles spektrumú gombaellenes hatással rendelkeznek, ideértve a humán személyeknél és növényeknél nagymértékű káros hatást kifejtő kórokozók elleni hatékonyságot. Így például a pseudomicin A, B, C és C' származékokat elkülönítették, tisztították, és ezen származékok szerkezetét különböző módszerekkel megállapították, ezek közül megemlítve az aminosav szekvenálást az NMR és tömegspektrometriás vizsgálatokat [lásd például Ballio és munkatársai közleményét ["A *Pseudomonas syringae* új bioaktív lipodepszipeptid származékai: a pszeudomicinek", *FEBS Lett.*, **355**, 96-100 (1994)], valamint az 5 576 298 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást. A pszeudomicinek, sziringomicinek, sziringotoxinok és sziringosztatinok a gombaellenes hatású vegyületek szerkezetileg különálló családjaik képezik.

A pszeudomicinek, sziringomicinek, sziringotoxinok vagy sziringosztatinok közül egyik származék sem került forgalomba gombaellenes kezelésre. Nem kívánatos mellékhatások és egyéb, a nagyobb léptékű termelésel és a készítmény előállításával kapcsolatos egyéb problémák mindaddig megakadályozták, hogy a pszeudomicinek, sziringomicinek, sziringotoxinok vagy sziringosztatinok alkalmazhatók legyenek az állatokat, embereket és növényeket megtámadó gombás fertőzésekkel szemben. Változatlanul fennáll az igény olyan gombaellenes szerek iránt, amelyek alkalmazhatók az eddig ismert gombaellenes szerekkel nem kezelhető fertőzések esetében és alkalmazhatók az állatoknál, humán személyeknél vagy növényeknél fellépő fertőzésekkel szemben.

### **A találmány összefoglalása**

A találmány tárgyát a *P. syringae* által termelt természetes pszedomicin termék képezi. Ezen pszedomicin-származék depszinonapeptid gyűrűt tartalmaz, amelynek szekvenciája: Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-CIThr, még közelebbről, amelyben LSer-D-Dab-L-Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl) szekvencia található, ahol a CIThr-ben lévő karboxilcsoport és a szerinben lévő hidroxilcsoport a gyűrűt lakton kötés révén zárja. Az (IA) képletű pszedomicin A' 3,4-dihidroxi-pentadekánsav csoportot tartalmaz, ahol a karboxilcsoport az N-terminális szerinben lévő aminosocporttal amidkötést létesít.

Az (IB) képletű pszedomicin B' 3-hidroxi-dodekánsav-csoportot tartalmaz, amelyben a karboxilcsoport az N-terminális szerinben lévő aminocporttal amidkötést létesít.

A találmány szerinti természetes pszedomicin termékek alkalmazásával, így a pszedomicin A'-vel, pszedomicin B'-vel vagy ezek elegyével gátolható a gombák káros hatása, vagy csökkenthető az arra rászoruló betegeknél a gombás fertőzések szimptomái. A találmány szerinti származékok segítségével elpusztíthatók a gombák, csökkenthető a gombás fertőzések káros hatása, enyhíthető a láz, és/vagy fokozható a betegek általános jó közérzete. A találmány szerinti származékok különböző gombák ellen, mint a *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* és/vagy *Histoplasma capsulatum* ellen eredményesen alkalmazhatók.

### **A találmány részletes ismertetése**

#### **Pszedomicinek**

Mint a fentiekben említettük, a pszedomicin vagy természetes pszedomicin termék kifejezés a *Pseudomonas syringae* baktériumból elkülönített gombaellenes szerek családjának egy vagy több tagjára vonatkozik. A pszedomicin egy lipodepszipeptid, egy olyan gyűrűs peptid, amelyben egy

vagy több szokatlan, ritkán előforduló aminosav van jelen, és egy vagy több hidrofób vagy zsírsav oldalláncot hordoz. Közelebbről, a pszeudomicinek lipodepszinonapeptidek, amelyekben egy laktonkötéssel zárt gyűrűs peptid rész van jelen, és amelyben olyan ritkán előforduló aminosavak, mint 4-klór-treonin, 3-hidroxi-aszparaginsav, dehidro-2-amino-vajsav és 2,4-diaminovajsav található. Feltételezhető, hogy ezek a ritkán előforduló aminosavak játszanak szerepet a pszeudomicinek kedvező biológiai tulajdonságainál, így a szérumban mutatott stabilitásnál és gomba-pusztító hatásuknál.

Mindegyik pszeudomicinnél azonos gyűrűs peptid mag található, azonban eltérő hidrofób oldalláncok kapcsolódnak ezen maghoz. Mindegyik pszeudomicinben jelen van a gyűrűs nonapeptid csoport, amelynek szekvenciája: Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-CIThr (vagyis szerin; 2,4-diaminovajsav; aszparaginsav; lizin; 2,4-diamino-vajsav; alloTreonin, dehidro-2-amino-vajsav; 3-hidroxi-aszparaginsav; 4-klór-treonin), ahol a CIThr-ben lévő karboxilcsoport és a szerinben lévő hidroxilcsoport a gyűrűt laktonkötés révén zárja. A lipofil csoport az N-terminális szerin aminocsoportjához kapcsolódik. A pszeudomicin A-ban a szerinben lévő aminocsoport egy 3,4-dihidroxi-tetradekanoil-csoportban lévő karboxilcsoporttal képez amidkötést, a B pszeudomicin esetében az amidkötés egy 3-monohidroxi-tetradekanoil-csoporttal, a C pszeudomicin esetében az amidkötés egy 3,4-dihidroxi-hexadekanoil-csoporttal, és a C' pszeudomicin esetében az amidképzés egy 3-monohidroxi-hexadekanoil-csoporttal történik. A szerinben lévő karboxilcsoport a gyűrűben lévő Dab-bal képez amidkötést.

### **Pszeudomicin A' és B'**

Mint a fentiekből kitűnik, a pszeudomicin A' és pszeudomicin B' megjelölések olyan gombaellenes szerekre vonatkoznak, amelyeket a *Pseudomonas syringae* baktériumból különítettünk el. A pszeudomicin A' és B' olyan pszeudomicinek, amelyekben a Ser-Dab-Asp-Lys-Dab-aThr-Dhb-HOAsp-

-CIThr szekvenciát tartalmazó jellegzetes depszinonapeptid gyűrű van jelen, és ahol a CIThr-ben lévő karboxilcsoport és a szerin hidroxilcsoportja laktonkötés révén zárja a gyűrűt. A pszeudomicin A'-ben 3,4-dihidroxi-pentadekánsav-csoport van jelen, amelyben lévő karboxilcsoport az N-terminális szerinben lévő aminocsoporttal létesít amidkötést. A pszeudomicin B'-ben 3-hidroxi-dodekánsav csoport van jelen, ennek karboxilcsoportja az N-terminális szerinben lévő aminocsoporttal létesít amidkötést.

### **A pszeudomicinek biológiai hatása**

A pszeudomicinek számos kedvező biológiai hatással rendelkeznek, ideértve azt, hogy különböző gombákat elpusztítanak, így a növényeknél és állatoknál jelentkező számos gombás kórokozót. Közelebbről, a pszeudomicinek hatásos antimikotikus szerek olyan gombák esetében, amelyek a legyengült immunrendszerrel rendelkező személyeknél fertőzést idéznek elő. Ezen gombák közül említjük meg a különböző *Candida* fajtákat, ideértve a *C. parapsilosis*-t, *C. albicans*-t, *C. glabrata*-t, *C. tropicalis*-t és *C. krusei*-t. Ide tartoznak egyéb fajták is, mint *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* és *Histoplasma capsulatum* is. Egy gombaellenes szer biológiai hatása esetében az az előnyös, ha a szer képes a gombát elpusztítani, és nemcsak a szaporodását gátolni, különösen vonatkozik ez a patogén gombákra; ilyen kedvező hatással rendelkezik a pszeudomicin A' és/vagy B'.

A pszeudomicinek toxikusnak mutatkoztak igen sokféle növényt károsító gombával szemben, megemlíthető itt a *Rynchosporium secalis*, *Ceratocystis ulmi*, *Rizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum* és *Fusarium culmorum* [lásd Harrison, L. és munkatársai: "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity," (Pszeudomicinek, *Pseudomonas syringae*-ből származó, széles spektrumú gombaellenes hatású új peptidcsalád) *J. of General*

Microbiology, 7, 2857-2865 (1991)]. Ezen túlmenően a *P. syringae* MSU 16H-ról kimutatták, hogy nagyobb védelmet biztosít, mint a *Ceratocystis ulmi*-val fertőzött szilfákban található vad törzs, amely gomba a holland szilfa betegség előidézője [lásd például Lam és munkatársai: Proc. Natl. Sci., USA, 84, 6447-6451 (1987)].

### ***Pseudomonas syringae***

A *Pseudomonas syringae* megjelölés sokféle baktériumot foglal magában, amelyek általában növényekkel vannak kapcsolatban. A *P. syringae* közül némelyik növényi kórokozó, némelyik azonban csak gyengén kórokozó vagy saprophyta. Számos különböző *P. syringae* izolátum termel egy vagy több citotoxikus szert, amelyek segítik ezen baktériumoknak a természetben való túlélését, ahol ezen baktériumoknak gombákkal és egyéb baktériumokkal kell megküzdeni. A *P. syringae* által termelt sejt-toxikus szerekhez tartoznak olyan gombaellenes szerek, mint a pszeudomicinek, a sziringomicinek, a sziringotoxinok és sziringosztatinok.

A szakirodalomból ismertek olyan *P. syringae* törzsek, amelyek egy vagy több pszeudomicint termelnek. Így például az MSU 174-es vad törzs (egy Montana-i árpaföldről elkülönítve) és transposon mutagenézissel ebből létrehozott mutáns törzs [aholis a mutagenézishez TN905-t (MSU 16H) alkalmaztak) az 5 576 298 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban kerültek ismertetésre (meagadás időpontja: 1996. november 19.) (szabadalmas: Strobel G. és munkatársai). Ezen pszeudomicinokkal és a mutagenézissel a szakirodalomban részletesen foglalkoznak [Strobel, Harrison és munkatársai: J. "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity" (Pszeudomicinek, *Pseudomonas syringae*-ből nyert széles spektrumú gombaellenes hatású új peptidcsalád), Gen. Microbiology, 137, 2857-2865 (1991); továbbá 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 törzseinek tenyésztését és ezek alkalmazását gombaellenes szerek előállítására Hilton M.D. és munkatársai ismertetik ("Pseudomycin production By *Pseudomonas Syringae*", US szabadalom száma:                   ). Az MSU 174 és MSU 16H tenyészetek a Montana State University-nél vannak letétbe helyezve [Bozeman, Montana, USA], és beszerezhetők az American Type Culture Collection-től is (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA). Fenti közleményeket találmányunknál referenciaként tekintjük.

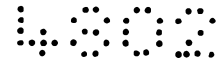
A találmány tárgyát egy törzs, egy izolátum, biológiailag tisztított *P. syringae* tenyészet képezi, amely pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termel legalább mintegy 10 µg/ml mennyiségben. A biológiailag tisztított *Pseudomonas syringae* tenyészet az MSU 16H, 25-B1, 67H1 vagy 7H9-1 mikroorganizmusok biológiailag tisztított tenészete, vagy ezen törzsek mutánsa, variánsa, izolátuma vagy rekombinánsa, amely tenyészetek pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termelnek. Az MSU 174 és MSU16H tenyészeteket a fentiekben ismertett helyekről szereztük be.

A pszeudomicin A' és/vagy B' termelésére alkalmas *P. syringae* törzs elkülöníthető környezeti forrásokból, ideértve a növényeket, mint az árpát, citrus növényeket, liliomféleségeket, valamint olyan forrásokat, mint a talaj, víz, levegő és por. Egy előnyös törzs növényekből izolálható. A környezeti forrásokból elkülönített *P. syringae* törzseket vad típusú törzsként említjük. A leírásban alkalmazott "vad típus" kifejezés a természetben előforduló normális *P. syringae* populáció domináns genotípusát jelenti (vagyis olyan *P. syringae* törzseket vagy izolátumokat, amelyek a természetben találhatóak, és nem laboratóriumi körülmények között lettek előállítva). Mint a többi mikroorganizmus esetében is, a találmány szerinti megoldáshoz alkalmazott, A'

és/vagy B' pseudomicint termelő *P. syringae* törzs-tenyészetek jellemzői, így az MSU 174, MSU16H, MSU 206, 25-B1, 7H9-1 és 67 H1 tenyészeteké változóak. Így ezen törzsek leszármazottai, például rekombinánsok, mutánsok és variánsok a szakember számára jól ismert módszerrel nyerhetők.

A *P. syringae* törzsek mutánsai szintén alkalmasak pseudomicin A' és/vagy B' előállítására. A mutáns megnevezés a törzs fenotípusában bekövetkező hirtelen örökletes változást jelenti, ami bekövetkezhet spontán módon vagy ismert mutagén szerek hatására, így előidézhető besugárással vagy különböző kémiai szerekkel. A találmány szerinti *P. syringae* mutánsok különféle mutagén szerek segítségével állíthatók elő, ideértve a besugárzást, mint az ultraibolya fényvel vagy röntgensugárral történő besugárzást; megemlítjük itt a kémiai mutagén szereket, egy adott hely szempontjából specifikus mutagenézist, valamint a transzpozonok által közvetített mutagenézist. A kémiai mutagénekre példaként említjük meg az etil-metánszulfonátot (EMS), diepoxioktánt, N-metil-N-nitro-N'-nitrozoguanint (NTG), valamint a salétromos savat.

A találmány szerinti pseudomicin A'-t és/vagy B'-t termelő *P. syringae* mutánsok oly módon tenyészthetők, hogy a baktériumot olyan mennyiségű mutagén szerrel kezeljük, amely eredményesen hoz létre mutánsokat, amelyek nagy mennyiségben termelnek pseudomicin A'-t és/vagy B'-t, vagy egyéb pseudomicineknél nagyobb mennyiségben termelnek A'-t és/vagy B'-t, vagy kedvező tenyésztési körülmények között termelnek pseudomicin A'-t és/vagy B'-t. A választott mutagén szer mennyisége és típusa változtatható, azonban előnyös megoldás szerint NTG-ből készült széria hígítást használunk, ahol az NTG mennyisége 1-100 µg/ml. A találmány szerinti előnyös mutánsokhoz tartoznak azok, amelyek minimális tápközegben nagy mennyiségben termelik a pseudomicin A'-t és/vagy B'-t. A pseudomicin A'-t



és/vagy B'-t nagy mennyiségben termelő mutánsok előnyösen legalább mintegy 10 µg/ml pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termelnek.

A környezetből előállított izolátumok, mutáns törzsek és egyéb *P. syringae* törzsek között válogatást végezhetünk a kedvező szaporítási szokások, táptalaj, tápanyagforrás, szénforrás, szaporítási körülmények és aminosav igény alapján válogatva. Előnyösen olyan A'-t és/vagy B'-t termelő *P. syringae* törzset választunk, amely minimális tápközegben, mint N21 közegben tenyészik, és/vagy amely törzs esetében a pszeudomicin A' és/vagy B' termelése mintegy 10 µg/ml-nél nagyobb. Az előnyös törzseket glicint és/vagy adott esetben lipidet, burgonya terméket vagy ezek kombinációját tartalmazó tápközegben tenyésztve a törzsek pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termelnek.

A *P. syringae* törzsek átalakításával rekombináns törzsek alakíthatók ki, ezt a szakember számára jól ismert laboratóriumi körülmények között végezhetjük. A rekombináns technológia segítségével a *P. syringae* törzsek oly módon alakíthatók át, hogy ezen törzsek által termelt antibiotikumok mellett azok egyéb különböző géntermékeket is expresszáljanak. Így például a törzseket egy rekombináns vektorral transzformálva olyan törzseket hozhatunk létre, amelyek olyan antibiotikummal szemben válnak rezisztenssé, amely esetben általában érzékenységet mutatnak. Az ily módon átalakított törzsek nemcsak pszeudomicineket, mint pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t fognak termelni, hanem rezisztenciát előidéző enzimet is, ami lehetővé teszi, hogy a transzformált törzseket a vad típusú sejtektől elkülönítsük. Ezen kívül hasonló technológiák segítségével az ismert törzseket átalakíthatjuk úgy, hogy a sejtekbe az endogén pszeudomicin-bioszintézis gének több másolatát visszük be, és így nagyobb pszeudomicin, így pszeudomicin A' és/vagy B' hozamot érhetünk el. A találmány tárgyát képezik a *P. syringae* 25-B1, 67-H1 és 7H9-1 törzsek származékai, így a természetes variánsok, a mesterségesen létreho-



zott variánsok, mutánsok és rekombinánsok, amelyek pszeudomicineket, így pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t nagy mennyiségben termelnek.

### **A Pseudomonas syringae tenyésztése**

A leírásban szereplő "vizes tápközeg" kifejezés vizes alapú elegyet jelent, amely a találmány szerinti baktériumok szaporodásához szükséges ásványi anyagokat és szerves vegyületeket tartalmazza. Az előnyös tápközégek hatásos mennyiségben tartalmaznak három vagy ennél kevesebb aminosavat, előnyösen glutaminsavat, glicint, hisztidint vagy ezek kombinációját. Egy előnyös megoldás szerint a tápközeg hatásos mennyiségben tartalmaz glicint és adott esetben egy vagy több burgonyaterméket és lipidet. A glicin alkalmazható egyedüli aminosavként vagy többféle aminosav elegyében, mint hidrolizált fehérjében. A lipidek közül előnyösen használható a szójababolaj vagy egy zsírsav. A célszerűen alkalmazható burgonya termékek közül említjük meg a burgonya dextróz főzetet, burgonya dextrint, burgonya fehérjét, a kereskedelmi forgalomban beszerezhető tört burgonya vegyes tápot. A tápközegben jelen lévő ásványi anyagok közül előnyösek a sóelegyek, amelyeket általában alkalmaznak a sejtenyészetekben és a fermentációhoz, így eredményesen alkalmazható a Czapek-féle ásványisó oldat (amely például KCl, MgSO<sub>4</sub> és FeSO<sub>4</sub> tartalmú). A táptalajban lévő szerves vegyületekhez tartozik előnyösen a glükóz, továbbá az oldható keményítő, de jelen lehetnek egyéb szerves vegyületek is. A tápközeg pH-ja előnyösen mintegy 4 és 6,5 között van, még előnyösebben ez az érték mintegy 4,5 - 5,7, legelőnyösebben mintegy 5,2.

A tápközegben jelen lévő komponensek mennyisége nem játszik döntő szerepet a baktérium szaporodása vagy a pszeudomicin A' és/vagy B' termelése szempontjából, mégis kívánatos, hogy némely tápanyag bizonyos szintet elérjen. A glicin előnyös mennyisége mintegy 0,1 g/liter és mintegy 10 g/liter között van, előnyösen ez az érték mintegy 0,3 - 3 g/liter, még előnyösebben 1



g/liter. A lipidek előnyös mennyisége mintegy 1 g/liter és mintegy 10 g/liter között van olaj termékre, mint szójabab olajra számítva, még előnyösebben ez az érték mintegy 0,5 - 2 g/liter szójabab olaj. A zsírsav és zsírsav-észter előnyös mennyisége mintegy 0,5 g/liter és mintegy 5 g/liter között van. A burgonya termékek előnyös mennyisége mintegy 12 g/liter és mintegy 36 g/liter között van, előnyösen mintegy 24 g/liter burgonya dextróz főzet, mintegy 5 g/liter - 50 g/liter, előnyösen mintegy 30 g/liter kereskedelmi forgalomban beszerezhető tört burgonya elegy, mintegy 1 g/liter - 30 g/liter, előnyösen 20 g/liter burgonya dextrin, vagy mintegy 1 g/liter - 10 g/liter, előnyösen 4 g/liter burgonya fehérje van a tápközegben. A tápközeg előnyösen szervesetlen komponenseket is tartalmaz, így előnyösen mintegy 0,02 - 2 g/liter kálium-kloridot, még előnyösebben ez a mennyiség 0,2 g/liter KCl; mintegy 0,02 - 2 g/liter magnézium-szulfátot, előnyösen  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -t tartalmaz, ennek mennyisége még előnyösebben mintegy 0,2 g/liter; valamint mintegy 0,4 - 40 mg/liter, még előnyösebben mintegy 4 mg/liter  $FeSO_4$ -t, előnyösen  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -t tartalmaz. Amennyiben jelen van, az oldható keményítő mennyisége mintegy 0,5 - 50 g/liter, még előnyösebben mintegy 5 g/liter. A glükóz mennyisége előnyösen mintegy 2 - 80 g/liter, még előnyösebben mintegy 20 g/liter.

Általában a *P. syringae*-t szabályozott pH-körülmények között és hőmérsékleten tenyésztjük. A *P. syringae* tenyésztését és a Pseudomycin A' és/vagy B' termelését mintegy 15 °C - 35 °C közötti hőmérsékleten végezzük, előnyösen a hőmérsékletet mintegy 20 °C - 30 °C-on, még előnyösebben mintegy 22 °C - 27 °C-on, legelőnyösebben mintegy 25 °C-on tartjuk. A *P. syringae* tenyésztését és a pszeudomicin A' és/vagy B' termelését mintegy 4 - 9 pH közötti tartományban, előnyösen mintegy 4 - 6, még előnyösebben mintegy 4,5 - 5,5 pH-n végezzük. Általában a *P. syringae* nem szaporodik,



amennyiben a hőmérséklet 37 °C felett vagy 10 °C alatt van, vagy ha a pH 9 feletti vagy 4-es érték alatti.

### **Pszeudomicin A' és B' termelése**

Annak érdekében, hogy pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termelhessünk, egy vad típusú vagy mutáns *P. syringae* törzset rázás közben hatásos mennyiségű, három vagy ennél kevesebb aminosavat tartalmazó tápközegben tenyésztünk. A három vagy ennél kevesebb aminosav előnyösen lehet glutaminsav, glicin, hisztidin vagy ezek kombinációja. Egy előnyös megoldás szerint a táptalajban glicin és adott esetben egy vagy több burgonyatermék és lipid van jelen. A tenyésztést a *P. syringae* szaporodása és a pszeudomicin A' és/vagy B' termelése szempontjából előnyös körülmények között végezzük. Az előnyös körülmények között megemlítjük a mintegy 22 °C - 27 °C közötti hőmérsékletet, a tenyésztést célszerűen mintegy 36 - 96 óra hosszat folytatjuk. Amennyiben fenti körülmények között megy végbe a tenyésztés, úgy a *P. syringae* sejtsűrűsége mintegy 10 - 15 g/liter száraz tömeget is elérhet, a pszeudomicin A' és/vagy B' termelt mennyisége pedig legalább mintegy 10 µg/ml-t tesz ki.

A pszeudomicin A' és/vagy B' termelése szempontjából előnyös, ha a *P. syringae* tenyészetben az oxigéntartalmat szabályozzuk. Előnyös, ha az oxigénszintet mintegy 5 % - 50 % telítettségen, előnyösen mintegy 30 %-os telítettségen tartjuk. A tápközegben az oxigén koncentrációja szabályozható levegő, tiszta oxigén vagy oxigéntartalmú gázelegyek átfújásával. A rázás ütemének beállításával szintén szabályozhatjuk az oxigén bevitel sebességét.

A pszeudomicin A' és/vagy B' termelése szempontjából előnyös, ha a *P. syringae* tenyésztése közben a pH-t szabályozzuk. A pszeudomicinek, mint a pszeudomicin A' és/vagy B' lúgos pH mellett labilisak, és számottevő bomlás következhet be, amennyiben a tápközeg pH-ja mintegy 12 óra hosszat mintegy 6-os érték felett van. Előnyösen a tápközeg pH-ját mintegy 6-os pH alatt



tartjuk, előnyösen ez az érték mintegy 5,5-nél kevesebb, még előnyösebben 4,0 pH felett van. A pH-t előnyösen mintegy 5 - 5,4 értéken tarjuk, még előnyösebben mintegy 5,0 - 5,2 értéken. Feltételezzük anélkül, hogy a találmányt ezzel korlátozni szándékoznánk, hogy a bázikus pH-n végbemenő pszeudomicin bomlás a laktongyűrű felszakadásával, és a CITHr-nek Thr-ré való alakulásával függ össze.

A *P. syringae* képes pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t termelni akkor is, ha szakaszos előállítást végzünk. Azonban a pszeudomicin termelést fokozza, ha félfolyamatosan tápláljuk be a glükózt, és adott esetben savat vagy bázist, mint ammónium-hidroxidot adagolunk be a pH szabályozására. A *P. syringae* által történő pszeudomicin termelés fokozható folyamatos tenyésztési módszerek segítségével, ahol automatikusan táplálunk be glükózt, és adott esetben a pH szabályozására savat vagy bázist, mint ammónium-hidroxidot adagolunk.

A pszeudomicin A' és/vagy B' kimutatása, meghatározása, elkülönítése és/vagy tisztítása a szakember számára jól ismert módszerek segítségével történhet. Így például egy tápközegben vagy elkülönített vagy tisztított termékben a pszeudomicin aktivitás szintje meghatározható a *Candida* gombákkal szemben mutatott gombaellenes hatás alapján. A pszeudomicinek előállítására és vizsgálatára számos módszer ismert. Így például a pszeudomicinek elkülöníthetők és tisztíthatók kromatográfias művelettel, mint HPLC módszerrel.

### **Gyógyászati alkalmazás**

#### **Készítmények előállítása, a pszeudomicin A' vagy B' gombaellenes hatásának vizsgálata**

A pszeudomicin A' és a pszeudomicin B' külön-külön in vitro és in vivo körülmények között hatásos, ezért eredményesen alkalmazhatók szisztémás gombás fertőzések vagy gombás bőrfertőzések leküzdésére. A találmány



szerinti megoldással a gombák aktivitása gátolható oly módon, hogy a gombákat pszeudomicin A'-vel és/vagy B'-vel vagy ezek gyógyászatilag megfelelő sójával hozzuk érintkezésbe. Egy előnyös megoldás szerint különböző gombák, így *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* és *Histoplasma capsulatum* szaporodását gátolhatjuk. Mint a fentiekben említettük, a találmány szerinti vegyületet egy parazitával vagy gombával hozunk érintkezésbe, ez a találmány szerinti vegyületnek a parazitával vagy gombával való kezelését vagy nyilvánvaló érintkeztetését jelenti. Azonban az érintkezés kifejezés nem foglal magában semmilyen gátlási mechanizmust.

A találmány szerinti kezelési eljárásnál eljárhatunk úgy is, hogy a gombafertőzés esetében hatásos mennyiségű pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t vagy ennek gyógyászatilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észterét adjuk azon személynek, akinek ilyen kezelésre szüksége van. Eredményesen kezelhetők különböző gombák, ideértve a *C. parapsilosis*-t, *C. albicans*-t, *Cryptococcus neoformans*-t és *Histoplasma capsulatum*-ot. Pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó készítményt adva megfelelő mennyiségben a kezelt személynek, csökkenthető a gombás fertőzés kellemetlen hatása, mérsékelhetők a gombás fertőzéssel kapcsolatos tünetek, és a kezelés eredményeként a gombás fertőzés teljes mértékben eliminálható is.

Számos beteg, akinek gombaellenes kezelésre van szüksége, a fertőzés súlyos tüneteit mutatja, így a betegeknek magas lázuk van, és rendszerint gondos és intenzív kezelésre van szükségük. Némely gomba súlyos fertőzést okozhat. Így például a *Candida* spp. nyálkahártya vagy egyéb szisztémás fertőzést okozhat. Egyre gyakrabban jelentkeznek azonban azol- és polién-származékokkal szemben rezisztens *Candida* törzsek. Az *Aspergillus* életveszélyes szisztémás fertőzéseket idéz elő. A *Cryptococcus meningitis* kialakulásáért felelős. Ilyen súlyos gombás fertőzések léphetnek fel azon személyeknél, akiknél az immunrendszer működése legyengült, így



például akik szerv- vagy csontvelő-átültetést kaptak, rákbetegségnél kemoterápiás kezelés alatt állnak, súlyosabb műtétek után vannak vagy HIV-fertőzésük van. Ezen betegek esetében gombaellenes kezelésként általában pszeudomicin A' és/vagy B' tartalmú készítményt adunk intravénás úton több napon keresztül, vagy ennél hosszabb időn át a fertőzés leküzdésére.

A gombaellenes hatás vonatkozásában a "hatásos mennyiség" kifejezés a találmány szerinti vegyület azon mennyiségét jelenti, amely képes a gombák szaporodását vagy aktivitását gátolni, vagy a gombás fertőzés szimptomáit csökkenteni. A gombás fertőzések szimptomáinak csökkentése alatt azt értjük, hogy csökken a láz, a beteg eszméletére tér, és javul a beteg közérzete. Előnyösen a szimptomák oly módon csökkenthetők, hogy a gombák elpusztításával a fertőzést megszüntetjük, vagy a fertőzést az érintett személy által tolerálható szintre vagy a kezelt személy immunrendszere által kezelhető szintre csökkentjük. A leírásban alkalmazott "gátlás" kifejezés a gombák aktivitásának gátlását, a gombák szaporodásának leállítását, csökkentését vagy profilaktikus akadályozását, vagy a gomba jelenlétéből adódó bármely jellegzetesség vagy következmény gátlását jelenti.

A beadott dózis nagysága különböző tényezőktől függ, mint a fertőzés súlyosságától és természetétől, a kezelt beteg korától és általános egészségi állapotától, továbbá a kezelt személynek a gombaellenes szerrel szemben mutatott tűrőképességétől. Általában a gombás fertőzés leküzdésére a kezelt személynek (humán vagy egyéb állat, ideértve az emlősöket, mint - a korlátozás szándéka nélkül említve - macskákat, lovakat és szarvasmarhát, valamint madárféleségeket), hatásos mennyiségű készítményt adunk be. Ezen tényezőktől függően állítjuk össze a napi dózisrendet, a beadandó napi dózis adható egy adagban, vagy a nap folyamán több kisebb adagra elosztva. A kezelés időtartama mintegy 2-3 naptól mintegy 2-3 hétig tartó ideig változhat, vagy akár ennél hosszabb ideig is tarthat. A tipikus napi dózis (egy adagban vagy



több kisebb adagra osztva) a találmány szerinti hatóanyagból mintegy 0,01 mg/kg - 100 mg/kg testtömeg mennyiséget tartalmaz. Az előnyös napi dózis általában mintegy 0,1 mg/kg - 60 mg/kg, az ideális mennyiség mintegy 2,5 mg/kg és mintegy 40 mg/kg között van. Súlyos fertőzések esetében a hatóanyag adható intravénás infúzió formájában is, így például 0,01 - 10 mg/kg/óra hatóanyagot beadva.

A találmány tárgyát képezik azon gyógyászati készítmények is, amelyek formájában a találmány szerinti gombaellenes vegyületek betegek kezelésére adhatók. A gyógyászati készítmények egy vagy több gyógyászatilag megfelelő vivőanyagot, hígítószeret, hordozót, segédanyagot és egyéb adalékanyagot, továbbá pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmaznak. Ezen készítményekben a hatóanyag 0,1 - 99,9 tömeg%-ot tesz ki, általában a hatóanyag mennyisége mintegy 10 % - 30 tömeg%. A "gyógyászatilag megfelelő" kifejezés azt jelenti, hogy a vivőanyag, hígítószer vagy segédanyag a készítményben lévő egyéb komponensekkel kompatibilis és nem káros a kezelt személyre nézve.

A készítmény adalékanyagként tartalmazhat különböző olajokat, így például petróleumolajat, állati, növényi vagy szintetikus eredetű olajokat, mint például földimogyoróolajat, szójababot, ásványolajat vagy szezámolajat. A gyógyászatilag megfelelő vivőanyagok közül megemlítjük a keményítőt, cellulózt, glükózt, laktózt, szacharózt, zselatint, malátát, magnézium-sztearátot, nátrium-sztearátot, glicerin-monosztearátot, nátrium-kloridot, szárított lefőlőzött tejet, glicerint, propilénlikolt, vizet és etanolt. A készítményekkel szokásos műveleteket végezhetünk, így ezeket sterilizálhatjuk vagy a készítmények tartalmazhatnak szokásos adalékanyagokat, mint konzerválószerket, stabilizálószerket, nedvesítőszerket vagy emulgeálószerket, az ozmózisnyomás beállítására alkalmas sókat és pufferanyagokat. A gyógyászatilag megfelelő vivőanyagokat és készítményeket a szakirodalom ismerteti [Martin:



"Remington's Pharmaceutical Sciences", 15. kiadás, Mack Publishing Co., Easton, 1405-1412 és 1461-1487. oldalak (1975)].

A leírásban szereplő "gyógyászatilag megfelelő só" kifejezés a fent ismertetett vegyületek azon sóira vonatkozik, amelyek az élő szervezetre nézve lényegében nem toxikusak. A gyógyászatilag megfelelő sókra példaként említjük meg a találmány szerinti vegyületeknek szerves vagy szervetlen savakkal, vagy szervetlen bázisokkal képzett sóit. Ezen sókat savaddíciós sók és bázis addíciós sók néven ismerjük.

A savaddíciós sók képzéséhez általában alkalmazott szervetlen savakhoz tartozik a sósav, hidrogén-bromid, hidrogén-jodid, kénsav és foszforsav, alkalmazhatók erre a célra szerves savak, mint p-toluolszulfonsav, metánszulfonsav, oxálsav, p-bróm-fenil-szulfonsav, szénsav, borostyánkősav, citromsav, benzoésav és ecetsav. Ezen gyógyászatilag megfelelő sókra példaként megemlíthetők a szulfát, piroszulfát, hidrogén-szulfát, szulfid, hidrogén-szulfid, foszfát, mono-hidrogénfoszfát, dihidrogén-foszfát, metafoszfát, pirofoszfát, klorid, bromid, jodid, acetát, propionát, dekanóát, kaprilát, akrilát, formát, izobutirát, kaproát, heptanoát, propiolát, oxalát, malonát, szukcinát, szuberát, szebakát, fumarát, maleát, butin-1,4-dioát, hexin-1,7-dioát, benzoát, klór-benzoát, metil-benzoát, dinitro-benzoát, hidroxibenzoát, metoxibenzoát, ftalát, szulfonát, xilolszulfonát, fenil-acetát, fenil-propionát, fenil-butirát, citrát, laktát, gamma-hidroxi-butirát, glikolát, tartarát, metánszulfonát, propánszulfonát, naftalin-1-szulfonát, naftalin-2-szulfonát sók és a mandulasavval képzett sók. A gyógyászatilag megfelelő savaddíciós sók közül előnyösek a szervetlen savakkal, mint sósavval és hidrogén-bromiddal, valamint a szerves savakkal, így maleinsavval és metánszulfonsavval képzett sók.

A bázis addíciós sókhoz tartoznak a szervetlen bázisokkal, mint ammóniummal vagy alkálifém- vagy alkáliföldfém-hidroxiddal, -karbonáttal vagy -hidrogén-karbonáttal képzett sók. A találmány szerinti sók előállításához al-



kalmas bázisokhoz tartozik a nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónium-hidroxid, kálium-karbonát, nátrium-karbonát, nátrium-hidrogén-karbonát, kálium-hidrogén-karbonát, kalcium-hidroxid és kalcium-karbonát. Különösen előnyösek a kálium- és nátriumsók.

Hangsúlyozni szeretnénk, hogy a találmány szerinti sók képzésében résztvevő ellenion nem játszik döntő szerepet mindaddig, amíg a só egészében véve gyógyászatilag megfelelő és amíg az ellenion a sónál egészében véve nem idéz elő nemkívánatos tulajdonságokat.

A pszeudomicin A' és/vagy B' adható parenterálisan, így például intramuszkuláris, szubkután vagy intraperitoneális injekció formájában, nazálisan vagy orális úton. Ezen kívül a pszeudomicin A' és/vagy B' adható helyi kezelés formájában is a bőr felszínére, vagy pedig a nyálkahártyára felvive a gombák elpusztítására vagy szaporodásuk gátlására.

A parenterális beadásra szánt készítmények pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmaznak, valamint fiziológiai szempontból megfelelő hígítószer, mint ionmentesített vizet, fiziológiás sóoldatot, 5 %-os dextróz oldatot, és egyéb általában ismert hígítószer. A készítmény tartalmazhat ciklodextrint és/vagy szolubilizálószer, mint poli(etilén-glikol)-t vagy poli(propilén-glikol)-t, vagy egyéb ismert szolubilizálószer. Ezen készítmények készülhetnek steril üvegcsében, amely a gombaellenes szer és a segédanyagokat száraz por vagy liofilizált por formájában tartalmazza. A felhasználás előtt fiziológiailag megfelelő hígítószer adunk a porhoz, majd az oldatot fecskendőbe felszívva azt a kezelt betegnek beadjuk.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények ismert módszerrel készülnek, ismert és könnyen beszerezhető komponensek alkalmazásával. A találmány szerinti készítmények előállításánál során a hatóanyagot általában vivőanyaggal elkeverjük, vagy abban feloldjuk, vagy egy vivőanyagba bezárjuk, ahol a vivőanyag képezhet kapszulát, tasakot, papírt vagy egyéb tartályt.



Amennyiben a vivőanyag hígítószerként is szerepel, úgy az lehet szilárd, félszilárd vagy folyékony anyag, ami a hatóanyag szempontjából vivőanyagot, hígítószer vagy közeget képez. A készítmények készülhetnek tabletták, dragsék, porok, gyógycukorkák, tasakok, elixírek, szuszpenziók, emulziók, oldatok, szirupok, aeroszolok (szilárd por formájában vagy folyékony közegben) akár 10 tömeg% hatóanyagot is tartalmazó kenőcsök formájában, lágy és kemény zselatin kapszulák, kúpok, steril injekciós oldatok és sterilen csomagolt porok formájában.

Orális beadásra a gombaellenes vegyületet zselatin kapszulákba töltjük, vagy tabletták formájában készítjük el. Ezen tabletták tartalmazhatnak megkötőszert, diszpergálószer vagy egyéb alkalmas vivőanyagot is, amivel a pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó, megfelelő méretű tabletták elkészíthetők. Gyermekgyógyászati célra vagy idősek számára a gombaellenes vegyület készíthető ízesített folyékony szuszpenzió, oldat vagy emulzió formájában. Egy orális célra szánt előnyös készítményhez használhatunk linolénsavat, cremophor RH-60-at és vizet, célszerűen 8 % linolénsavat, 5 % cremophor RH-60-at, 87 % steril vizet és mintegy 2,5 - 40 mg/ml mennyiségben pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t.

Helyi alkalmazásra a gombaellenes szer készülhet száraz por formájában is, amit a bőr felszínére viszünk fel, vagy pedig készülhetnek folyékony készítmények, ideértve a szolubilizáló vizes folyadékokat vagy nemvizes folyadékokat, így például alkohollal vagy glikollal készült folyadékokat.

#### **Pszeudomicin A' vagy B' tartalmú készítmények alkalmazása**

A találmány tárgyához tartozik egy készlet is, amely a találmány szerinti gyógyászati készítményeket tartalmazza, és a találmány szerinti kezeléshez használható. A készlet tartalmazhat egy üvegcsét, amelyben a találmány szerinti készítmény és megfelelő vivőanyag van jelen szárított formában vagy folyékony alakban. A készlet ezen kívül instrukciókat tartalmaz felirat alakjában.



ban az üvegcsén és/vagy a dobozban elhelyezett ismertetés formájában, ami tájékoztat a vegyületek alkalmazásának módjáról. Az instrukciók nyomtathatók az üvegcsét tartalmazó dobozra is. Az instrukciók tájékoztatást nyújtanak a szükséges dózisiról, a beadás módjáról, ami az egészségügyi területen dolgozók számára megkönnyíti a gyógyszer beadását. Az "egészségügyi területen dolgozók" kifejezésen a gyógyszer beadására jogosult orvost, ápolónőt vagy technikust értjük.

A találmány tárgyát képezi egy pseudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó gyógyászati készítmény is, ami injekció formájában adható be. A találmány szerint egy pseudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó készítmény alkalmazható injekció formájában beadható gyógyszer előállítására is. A találmány tárgyahoz tartozik a pseudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó készítmények előállítására szolgáló eljárás is, ahol a készítmény injekció formájában beadható alakban készül. Így például szokásos műveletekkel folyékony vagy szilárd készítmények alakíthatók ki különböző módon. Folyékony készítmény állítható elő oly módon, hogy pseudomicin A'-t és/vagy B'-t megfelelő oldószerben, így vízben feloldunk, ahol az oldat megfelelő pH-jú, és adott esetben pufferanyagokat vagy egyéb segédanyagokat tartalmaz.

### **Mezőgazdasági alkalmazás**

A *P. syringae* NRRL B-12050 által termelt antibiotikumok eredményesnek mutatkoztak a holland szilfa betegség kezelésére [lásd a 4 342 746 és a 4 277 462 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat]. Közélebről, a *P. syringae* MSU 16H nagyobb védelmet biztosít a *Ceratocystis ulmi* által (a holland szilfabetegség okozója) fertőzött szilfák védelmére, mint a vad típusú törzsek [lásd például Lam és munkatársai: Proc. Natl. Sci., USA **84**, 6447-6451 (1987)]. Szabad területen nevelt szilfáknál végzett vizsgálatok igazolják a kedvező eredményeket profilaktikus szinten. Így a találmány szerinti pseudomicinek eredményesen alkalmazhatók a holland szilfa betegség

megelőző kezelésére. A pseudomicinekről kimutatták, hogy számos növénykárosító patogén gombával szemben toxikus hatást fejtenek ki, ezen növényi patogén gombák közül megemlíjtük a *Rynchosporium secalis*-t, *Ceratocystis ulmi*-t, *Rhizoctonia solani*-t, *Sclerotinia sclerotiorum*-ot, *Verticillium albo-atrum*-ot, *Verticillium dahliae*-t, *Thielaviopsis basicola*-t, *Fusarium oxysporum*-ot és *Fusarium culmorum*-ot [lásd Harrison, L. és munkatársai: "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity" (Pseudomicinek, *P. syringae*-ből származó, széles spektrumú gombaellenes hatású új peptidcsalád), *J. General Microbiology*, 7, 2857-2865 (1991)]. Következésképpen az elkülönített pseudomicin A' és/vagy B' (ideértve e vegyületek hidrátjait, szolvátjait és észtereit) eredményesen alkalmazhatók lehetnek növényi gombák kezelésére (különösen *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani* és *F. oxysporum* esetében), a kezelés végezhető közvetlenül vagy preventív módon. Általában a fertőzött növényeket oly módon kezeljük, hogy a pseudomicin vegyületeket tartalmazó vizes szuszpenziót injekció formájában vagy spray formájában visszük fel a növényekre vagy juttatjuk be a növényekbe. Az injekciók beadásának módjai a szakember számára jól ismertek (így például fúrópisztollyal). A hatóanyag hatásos mennyiségének a növények felületére való juttatásánál bármely módszer alkalmazható a szuszpenzió felpermetezésére. A szuszpenzió tartalmazhat a szakember számára jól ismert általában alkalmazott adalékanyagokat, így szolubilizálószereket, stabilizálószereket, nedvesítőszereket és ezek kombinációit.

A növények kezelését végezhetjük elkülönített pseudomicin A' és/vagy B' vegyületeket tartalmazó száraz készítménnyel is. A száraz készítmény a szakember számára ismert bármely módszerrel felvihető a növények felszínére, így például permetezéssel vagy tartályból való kirázással.



A találmány jobb megértését szolgálják az alábbi példák. A példák a találmány szerinti megoldás szemléltetését szolgálják a találmány oltalmi körének korlátozása nélkül.

### **Példák**

#### **Letétbe helyezett biológiai anyagok**

A *P. syringae* MSU 16H nyilvánosan hozzáférhető az American Type Culture Collection-nál (Parklawn Drive, Rockville, MD, USA, letéti szám: ATCC 67028. *P. syringae* 25-B1, 7H9-1 és 67 H1 törzsek; letétbe helyezés időpontja: 2000. március 23.; ezen törzsek az alábbi számok alapján hozzáférhetők:

25-B1	Állományi szám PTA-1622
7H9-1	Állományi szám PTA-1623
67 H1	Állományi szám PTA-1621.

#### **1. példa**

##### **Pszeudomicin A' és B' előállítás**

A pszeudomicin A' és/vagy B' előállítását fermentációs úton végezzük, egy *P. syringae* törzset fermentációs közegben tenyésztve.

##### **Alkalmazott anyagok és módszerek**

###### **Inokulum készítése**

Folyékony nitrogén gőzfázisában tárolt sejtek alikvot részét felolvasztjuk, majd ezzel két 900 ml-es CSM tápközeg adagot beoltunk. A CSM tápközeg összetétele (g/l-ben): dextróz (5), maltóz (4), Difco Triptin szója tápközeg (30), Difco keményítő (élesztő) extraktum (3), valamint  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (2). 2-literes lombikokban lévő, egyenként 900 ml-es tápközeg adagokat mintegy 0,5 ml sejt szuszpenzióval oltunk be. A lombikok tartalmát rázás közben 24 óra hosszat 25 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A két lombik egyesített tartalmával 150 liter térfogatú fermentorban lévő 115 liter steril fermentációs tápközeget oltunk be.



Fermentációs lépés: a fermentációs tápközeg összetétele (g/l-ben): dextróz (20), oldható keményítő (5), Burgonyapüré (Basic American Foods Country Style Potato Pearls, azonnal oldódó) (30), glicin (1),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2), KCl (0,2), valamint  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,004), a tápközeg csapvízzel készül. Sterilizés előtt a tápközeg pH-ját 5,2-es értékre állítjuk. A fermentációt 25 °C hőmérsékleten 68 óra hosszat folytatjuk. A feloldott oxigén mennyiségét 30 %-os levegő telítettség érték felett tartjuk a levegő áramlás és a keverőlapát sebességének folyamatos szabályozásával.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vagy NaOH beadagolásával a tápközeg pH-ját 4,0 és 5,4 érték között tartjuk.

#### **A szakaszos módszer variációi:**

Az egyszerű szakaszos eljárást különböző módon variálva állítunk elő pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t. A kezdeti beoltást követő 24 óra eltelte után a fermentorokba dextrózt adagolhatunk 60 ml/óra ütemben. A betáplálást a fermentáció teljes ideje alatt folytathatjuk. Másik megoldásként úgy járunk el, hogy a feloldott oxigén mennyiségét 5 %-os levegő telítettségi szinten tartjuk a beoltást követő 24 órától kezdve egészen a fermentációs periódus végéig. Az oldott oxigén 5 %-os szinten való tartását oly módon biztosítjuk, hogy a fermentorba vezetett levegőhöz közömbös nitrogéngázt ( $\text{N}_2$ ) adagolunk. Mindegyik esetben a gáz beadagolást a fermentlébe süllyesztett egyetlen permetező csövön keresztül végezzük, ahol a cső nyílása a fermentorban lévő fenék keverő turbina alatt helyezkedik el.

#### **Eredmények és következtetések**

A *P. syringae*-ből különböző fermentációs módszerekkel állítható elő pszeudomicin A' és/vagy B'.

#### **2. példa**

##### **Pszeudomicin A' és B' elkülönítése és tisztítása**

A *P. syringae* törzs szaporítására használt fermentléből a pszeudomicin A' és B' elkülönítésére és tisztítására alkalmas módszereket dolgoztunk ki.



### Felhasznált anyagok és módszerek

A 4x100 liter térfogatú fermentlét a fermentáció befejezése után Membralox kerámia szűrőn (0,45  $\mu\text{m}$ ) átszűrjük, így szűrletet (A frakció) és szilárd szuszpenziót (B frakció) kapunk. A B frakciót (135 liter) 0,1 % TFA-t tartalmazó, azonos térfogatú acetonnal 120 percig extraháljuk, majd hagyjuk leülepedni. A tiszta acetonos extraktumot szűréssel elkülönítjük, majd vákuumban betöményítjük, így egy vizes oldatot képező C frakcióhoz jutunk (88 liter). Először az A) frakciót visszük fel HP20 gyantával töltött oszlopra (10 liter), ahol a gyantát előzőleg vízzel szuszpendáltuk; majd az oszlopot 0,1 % TFA-t tartalmazó 15 %-os acetonitrillel mossuk (20 liter térfogatú). Ezt követően a C frakciót töltjük fel ugyanezen oszlopra, majd az oszlopot 20 liter térfogatú, 0,1 % TFA tartalmú 15 %-os acetonitrillel mossuk át.

Az oszlopot ezután 30 percig eluáljuk, e művelethez 0,1 % TFA-t tartalmazó 15  $\rightarrow$  20 % acetonitril lineáris gradienst használunk, majd ezután 60 percig az eluálást 0,1 % TFA-tartalmú 20  $\rightarrow$  35 %-os acetonitrillel végezzük; áramlási sebesség: 1 liter/perc. 1 literes térfogatú frakciókat fogunk fel. A 6-tól 9-ig terjedő frakciókat egyesítjük (4 liter térfogat), így 24 g D jelzésű frakcióhoz jutunk. A D frakcióból egy adagot (mintegy 1 g-ot) fordított fázisú oszlopon kromatografálunk (Dynamax C<sub>18</sub> 41,4x250 mm), a művelethez 3-as pH-jú trietil-ammónium-foszfát puffer/acetonitril/metanol elegyet használunk mobil fázisként (gradiens eluálás 65:17:18  $\rightarrow$  30:35:35); az eluálást 45 percig végezzük; áramlási sebesség: 40 ml/perc. A megfelelő frakciókat egyesítjük, a térfogatot 75 ml-re csökkentjük, majd C18-as oszlopon ismét kromatográfiát végzünk a fentiek szerint, ez esetben a gradiens összetétele 80:10:10  $\rightarrow$  46:27:27; így 113 mg E frakciót és 116 mg F frakciót kapunk. Az E és F frakciókat C18-as oszlopon (Dynamax 21,4 x 250 mm) tovább kromatografálva 45 mg pszeudomicin A'-t és 62 mg pszeudomicin B'-t kapunk.



### **Eredmények és következtetések**

Az egyéb pszeudomicinek tisztításához alkalmazott HPLC módszerekkel a fermentléből tiszta pszeudomicin A' és B' nyerhető ki.

### **3. példa**

#### **A pszeudomicin A' és B' szerkezetének meghatározása**

A pszeudomicin A' és B' szerkezetét NMR tömegspektrométerrel határoztuk meg.

#### **Pszeudomicin A' szerkezetének meghatározása**

##### **Alkalmazott módszerek és eredmények**

A pszeudomicin A' molekula összegképletét nagy feloldású FABMS módszerrel határoztuk meg, eredmény:  $C_{52}H_{89}ClN_{12}O_{20}$  [az  $m/z$  értéke 1237,6112 a  $C_{52}H_{89}ClN_{12}O_{20}$  összegképletre számítva  $(M+H)^+$ ,  $\Delta = 2,4$  ppm]. A pszeudomicin A molekula képletét a pszeudomicin A' képletével összehasonlítva ebben egy további  $CH_2$  csoport jelenlétét mutathatjuk ki. Ebből arra következtethetünk, hogy a pszeudomicin A'-ben az N-terminális szerin feltehetően 3,4-dihidroxi-pentadekánsavval van acilezve a pszeudomicin A-ban szereplő 3,4-dihidroxi-tetradekánsav helyett. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény, hogy az eddigiekben jellemzett pszeudomicineknél a vegyületben egy határozott, jól azonosítható nonadepsziptid gyűrű jelentkezik, és a vegyületeknél észlelt különbség csak a hidrofób oldalláncnál mutatkozik meg.

Ennek értelmében a pszeudomicin A' NMR spektrum adatai gyakorlatilag azonosak az összes többi pszeudomicinével, így a pszeudomicin A, B, C és C' vegyületek NMR adataival. Az  $^1H$ ,  $^{13}C$  és 2D NMR spektrumok részletes tanulmányozása után, beleértve a pszeudomicin A'-re vonatkozó TOCSY és HMQC adatokat is, azt találtuk, hogy a pszeudomicin A' hidrofób oldalláncában 3,4-diol funkciós csoport van jelen; a protonoknak és a protont hordozó szénatomoknak a molekulában elfoglalt helye tisztázható volt (lásd az 1. táblázatot).

A pszeudomicin A' szerkezetét az alábbi tömegspektrometriás és NMR adatok alapján határoztuk meg, és az (IA) képlettel mutatjuk be.

### 1. táblázat

**Pszeudomicin A'-re vonatkozó  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$ -NMR adatok;  $\text{H}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{CN}$ -ben**

Aminosav	Helyzet	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Ser	NH	8.28	-
	$\alpha$	4.59	54.0
	$\beta_1$	4.50	65.5
	$\beta_2$	4.41	
Dab-1*	NH	8.48	-
	$\alpha$	4.15	53.1
	$\beta_1$	1.98	
	$\gamma$	2.91	37.4
	$\text{NH}_2$	7.50	-
Asp	NH	8.34	-
	$\alpha$	4.54	51.5
	$\beta_1$	2.86	36.0
	$\beta_2$	2.80	
Lys	NH	7.80	-
	$\alpha$	4.16	54.6
	$\beta$	1.75	30.8
	$\gamma_1$	1.31	23.2
	$\gamma_2$	1.22	



Aminosav	Helyzet	$\delta_H$	$\delta_C$
	$\delta$	1.54	27.2
	$\epsilon$	2.83	40.4
	NH <sub>2</sub>	7.34	-
<b>Dab-2*</b>	NH	8.09	-
	$\alpha$	4.28	52.1
	$\beta_1$	2.11	28.7
	$\beta_2$	1.96	
	$\gamma$	2.89	37.6
	NH <sub>2</sub>		-
<b>Thr</b>	NH	7.63	-
	$\alpha$	4.28	59.8
	$\beta$	3.92	68.6
	$\gamma$	1.16	20.4
<b>Dhb</b>	NH	9.45	-
	$\beta$	6.49	133.9
	$\gamma$	1.69	13.5
<b>Hyd. Asp</b>	NH	7.85	-
	$\alpha$	4.94	56.9
	$\beta$	4.78	71.6
<b>CIThr</b>	NH	7.88	
	$\alpha$	4.87	56.0
	$\beta$	4.31	72.3
	$\gamma_1$	3.50	45.6
	$\gamma_2$	3.42	
<b>Side chain</b>	2a	2.47	39.4
	2b	2.30	
	3	3.76	72.6
	4	3.39	75.1
	5	1.41	33.3
	6-14	1.21	32.4.
			30.2X4.
			29.9.
			27.2.
			26.4.
			23.2
	15	0.81	14.3

\* A Dab-1-re és Dab-2-re vonatkozó adatok egymással felcserélhetők.



### A pszeudomicin B' szerkezetének meghatározása

A pszeudomicin B' szerkezetének meghatározása szintén a tömegspektrum és NMR spektrum adatok értelmezése alapján történt. A molekula összegképletét:  $C_{49}H_{83}ClN_{12}O_{19}$  [ $m/z$  1179,5685 a  $C_{49}H_{84}ClN_{12}O_{19}$  összegképletre számítva  $(M+H)^+$ ,  $\Delta$  - 1,8 ppm] nagy feloldású FAB-MS adatok alapján határoztuk meg. Ez a képlet két  $CH_2$  csoporttal kevesebbet mutatott a pszeudomicin B képletéhez viszonyítva. Az  $^1H$ ,  $^{13}C$  és 2D NMR adatok részletes vizsgálata, ideértve a TOCSY és HMQC spektrum adatok értékelését is azt mutatta, hogy az ismert pszeudomicinekhez hasonló aminosav összetétellel állunk szemben. Ezen túlmenően az NMR adatok 3-hidroxi-dodekánsav jelenlétére utaltak (lásd a 2. táblázatot). A spektrum adatokból megállapítható volt a pszeudomicin B' szerkezete, ezt az (IB) képlettel mutatjuk be. A pszeudomicin B' (IB) képletét az alábbi tömegspektrum és NMR spektrum adatok alapján határoztuk meg.

#### 2. táblázat

A pszeudomicin B'-re vonatkozó  $^1H$  és  $^{13}C$ -NMR adatok;  
 $H_2O+CD_3CN$ -ben

Aminosav	Helyzet	$\delta_H$	$\delta_C$
Ser	NH	8.31	-
	$\alpha$	4.64	53.5
	$\beta_1$	4.54	65.8
	$\beta_2$	4.35	



Aminosav	Helyzet	$\delta_H$	$\delta_C$
Dab-1*	NH	8.52	-
	$\alpha$	4.13	53.3
	$\beta_1$	2.02	28.7
	$\beta_2$		
	$\gamma$	2.94	37.3
	NH <sub>2</sub>	7.54	-
Asp	NH	8.30	-
	$\alpha$	4.56	51.6
	$\beta_1$	2.86	36.0
	$\beta_2$	2.80	
Lys	NH	7.90	-
	$\alpha$	4.09	54.9
	$\beta$	1.75	29.8
	$\gamma_1$	1.28	23.2
	$\gamma_2$	1.18	
	$\delta$	1.52	27.3
	$\epsilon$	2.82	40.4
	NH <sub>2</sub>	7.34	-
Dab-2*	NH	8.24	
	$\alpha$	4.35	51.8
	$\beta_1$	2.12	29.2
	$\beta_2$	1.99	
	$\gamma$	2.90	37.7
	NH <sub>2</sub>		-
Thr	NH	7.75	-
	$\alpha$	4.23	60.4
	$\beta$	3.93	68.2
	$\gamma$	1.18	20.5
Dhb	NH	9.45	-
	$\beta$	6.57	134.8
	$\gamma$	1.68	13.7
Hvd. Asp	NH	7.79	-
	$\alpha$	4.95	57.1
	$\beta$	4.71	72.0



Aminosav	Helyzet	$\delta_H$	$\delta_C$
C1Thr	NH	7.98	
	$\alpha$	4.87	55.8
	$\beta$	4.31	72.5
	$\gamma_1$	3.48	45.6
	$\gamma_2$	3.42	
Side chain	2a	2.33	43.8
	2b	2.24	
	3	3.85	69.6
	4	1.37	37.6
	5-11	1.20	32.4, 30.1, 30.1, 29.8, 23.2
	12	0.81	14.4

\* A Dab-1-re és Dab-2-re vonatkozó adatok egymással felcserélhetők.

### Következtetések

A pseudomicin A' és B' a nonadepszipeptidek osztályához tartozó új vegyületeket képviselnek. Ezen molekulák az ismert pseudomicinek szerkezetéhez hasonlóak, mindössze a hidrofób oldalláncban mutatkozik eltérés, azonban ezen vegyületek kulcsszerepet játszhatnak ezen gombaellenes vegyület csoport szerkezettel összefüggő hatásának felderítésénél.

### 4. példa

#### A *Pseudomonas syringae* elkülönítése, jellemzése és mutagenézise

A gombaellenes szerek előállítására során a környezetből *P. syringae*-t és ennek mutánsait különítettük el és alkalmaztuk.



### Felhasznált anyagok és módszerek

Az MSU 174 és MSU 16-H törzseket az 5 576 298 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint különítettük el és jellemeztük (a szabadalom megadásának időpontja: 1996. november 19., Stroebel G. és munkatársai szabadalma); ezen törzsekkel foglalkoznak az alábbi közlemények: Harrison, L. és munkatársai: "Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity," (Pszseudomicinek, *Pseudomonas syringae*-ből származó, széles spektrumú gombaellenes hatású új peptidcsalád, *J. of Gen. Microbiology*, **7**, 2857-2865 (1991), továbbá 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). Fenti közleményeket találmányunknál referenciaként tekintjük.

Kémiaailag előidézett mutagenézis segítségével ezen vad típusú törzsekből és mutánsaiból további törzsek lettek előállítva. Az MSU 174, MSU 16H és 25-B1 törzseken mutagenézist végeztünk. A mutagenézisnek alávetett törzseket CSM tápközegben tenyésztjük, majd a tenyészetet mutagenézist előidéző vegyületet: 1-metil-3-nitro-1-nitrozo-guanidint (NTG vagy MNNG) tartalmazó tápközegbe visszük, ahol a mutagenézist előidéző vegyület koncentrációja 0, 1, 2, 4, 16 vagy 32 µg/ml. Az így nyert sejteket fagyasztva tároljuk a további vizsgálat és elkülönítés előtt.

Mutagenizált sejteket különítünk el egy vagy több pszeudomicin, így pszeudomicin A' és/vagy B' termelése szempontjából kedvező tenyésztési körülmények között. Kémiaailag mutagenizált *P. syringae* sejteket, mint a mutagenizált 25-B1 törzset felolvasztjuk, és 6 sejt/ml koncentrációra hígítjuk N21SM tápközeggel (lásd az 5. táblázatot). Ezen tápközeg némely esetben egy vagy több, szelekcióhoz alkalmas komponenst, így foszfát különböző koncentrációját tartalmazza. 50 µl térfogatú mutagenizált sejtet 96-lyukú

gömbölyű fenekű mikrotiter lemezre viszünk fel átlagban 0,3 sejt/lyuk koncentrációra számítva. A párolgás csökkentésére minden egyes lyukba szilikon olajat töltünk. Rázás közben a lemezeket 25 °C hőmérsékleten 6-12 napig inkubáljuk.

### 5. táblázat

#### Az N21SM tápközeg összetétele

Komponensek	g/liter
Glükóz	20
Ammónium-szulfát	0,5
Mononátrium-glutamát vagy L-glutaminsav	2
L-hisztidin	2
Glicin	0,5
Oldható keményítő	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
Czapek-féle szervesetlen sóoldat	2 ml
MES puffer	9,8
A pH 5,0 értékre van állítva	

Az inkubálást követően minden egyes nyílásból alikvot részt (általában 5 TI-t) széria hígításnak vetünk alá (így például 1:56, 1:196, 1:320, 1:686 és/vagy 1:1715 arányban), majd a hígítások gombaellenes hatását *Candida albicans*-sal szemben vizsgáljuk folyékony közegben mikrotiter lemezen biológiai módszerrel. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáljuk, ezután ellenőrizzük a *C. albicans* szaporodásának gátlását. A megfelelő törzseket kiválasztjuk, ezeket CSM tápközegbe oltjuk (lásd a 6. táblázatot), majd 25 °C hőmérsékleten 1-3 napig tenyésztjük.



**6. táblázat**  
**Teljes Streptomyces tápközeg (CSM)**

Komponensek	Koncentráció g/liter
Glükóz	5
Maltóz	4
Difco Triptin szója főzet	30
Difco keményítő extraktum	3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
pH-állítás nélkül	

A kiválasztott törzseket 13 ml N21SM tápközeget tartalmazó fermentációs lombikokba oltjuk, majd 25 °C hőmérsékleten mintegy 66 óra hosszat tenyésztjük. A fermentléből alikvotot veszünk ki, ezt az alikvot térfogatával azonos térfogatú acetonitrillel 1 óra hosszat extraháljuk majd centrifugáljuk, ezután dekantáljuk és HPLC vizsgálatot végzünk, ellenőrizve egy vagy több pszeudomicin, mint pszeudomicin A' vagy B' jelenlétét (az 1-3. példákban ismertetett módszer szerint). Azokat a törzseket, amelyek egy vagy több pszeudomicint, így pszeudomicin A'-t vagy B'-t termelnek, elkülönítjük, újra fermentáljuk, majd nagyobb léptékű tenyésztésre előkészítjük.

#### **Eredmények**

A fent ismertetett módszerek szerint eljárva egy vagy több pszeudomicint, így pszeudomicin A'-t vagy B'-t termelő törzset különítettünk el.

#### **Következtetés**

A fentiekben ismertetett kiválasztási módszerek eredményesen alkalmazhatók olyan *P. syringae* törzsek elkülönítésére és minimális tápközegen

való szaporítására, amelyek egy vagy több pszeudomicint, így pszeudomicin A'-t vagy B'-t termelnek.

### **5. példa**

#### **P. syringae tenyésztése és pszeudomicinek termelése**

A P. syringae-t burgonya terméket nem tartalmazó N21 tápközegben fermentálva (szemben a szakirodalomban P. syringae tenyésztésére alkalmazott burgonyatartalmú táptalajjal) elkülönítésre alkalmas koncentrációban pszeudomicinek termelhetők.

#### **Pszeudomicinek termelése N21 tápközegben, rázott lombikokban**

##### **Felhasznált anyagok és módszerek**

P. syringae-t tenyésztünk 50 ml N21 tápközeg tartalmazó (lásd a 7. táblázatot) 250 ml térfogatú lombikban. A tenyésztés kezdetén alikvot mennyiségű P. syringae MSU 16H törzs inokulumával beoltást végzünk, majd a tenyésztést 25 °C hőmérsékleten 70 %-os nedvességtartalom mellett 7 napig folytatjuk, miközben a lombikokat 250 fordulat/perc sebességgel rázatjuk. Az inkubálás végén 4 ml fermentlét kiveszünk a lombikból, majd ezt 0,1 % foszforsav tartalmú 6 ml metanollal elegyítjük. Feltételezések szerint az alacsony pH stabilizálja a pszeudomicineket. Szűrővel vagy centrifugálással a szemcséket eltávolítjuk a tiszta oldatból, majd HPLC művelettel a pszeudomicinek koncentrációját fentiek szerint meghatározzuk.

**7. táblázat**  
**Az N21 tápközeg összetétele**

<b>Komponensek</b>	<b>g/liter</b>
Szacharóz	35
Ammónium-szulfát	0,5
Mononátrium-glutamát	2
L-hisztidin	2
Glicin	0,5
Oldható keményítő	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
Czapek-féle szervesetlen sóoldat	2 ml
Keményítő extraktum	1
MES puffer	9,8
pH állítás 5,2-re	

Ellenőrizzük néhány *P. syringae* törzs pseudomicin termelését, e művelethez N21 tápközéget használunk metil-mirisztát hozzáadásával és anélkül. A vizsgált *P. syringae* törzsek közül értékeltük az MSU 16H, 25-B1, 67H1 és 7H9-1 jelzésű törzseket.

### **Eredmények**

A különböző *P. syringae* törzseket metil-mirisztát hozzáadásával vagy anélkül tenyésztjük, a vizsgált törzsek egy vagy több pseudomicint termeltek jelentős szinten, így például 10 Tg/ml koncentrációban pseudomicin A-t, pseudomicin B-t és/vagy pseudomicin C-t. Némely törzs esetében a metil-mirisztát hozzáadása a pseudomicin termelést fokozta.

### **Következtetések**

A *P. syringae* különböző törzseit burgonya termékeket nem tartalmazó tápközegben tenyésztve ezek kereskedelmi szempontból jelentős mennyiségű pszeudomicin termelésére képesek, ez a termelés metil-mirisztát hozzáadásával stimulálható.

### **Pszeudomicin termelés 5000 liter térfogatban, N21 tápközeg alkalmazásával**

A pszeudomicin termelési módszert 5000 literes szintre növeltük meg, a fermentálást burgonya termékeket nem tartalmazó tápközeggel végeztük.

### **Felhasznált anyagok és módszerek**

Komplett *Streptomyces* tápközeget (CSM, lásd az 5. táblázatot) tartalmazó vegetatív szintű lombikokat fagyasztott *P. syringae* tenyészzel, általában 67 H1 törzsszel beoltunk, majd a lombikokat 25 °C hőmérsékleten 24 óra hosszat 250 fordulat/perc sebességgel rázatjuk. 24 óráig tartó inkubálás után a lombikok tartalmát nagyobb méretű lombikok beoltásához használjuk. Ezen nagyobb lombikokban CSN tápközeg van jelen, a lombikok tartalmát 25 °C hőmérsékleten 250 fordulat/perc sebességgel forgatjuk. A vegetatív-szintű tenyésztéshez használt három vagy négy lombikban lévő fermentlét egyesítjük, majd ebből 0,45 ml-t kivéve ezzel a nagyobb méretű lombikokat beoltjuk. Erre a célra 2,5 liter térfogatú Tunair™ típusú lombikokat használunk, amelyek mintegy 900 ml CSM tápközeget tartalmaznak. Minden egyes fermentorhoz két Tunair™ lombik tartalmát használjuk fel. A Tunair™ lombikokban az inkubálást 16 óra hosszat végezzük.

Ezután a Tunair™ lombikokban lévő tenyészeteket fém inokulum tartályban egyesítjük. Ezen egyesített tenyészetekkel oltjuk be a 15. táblázat szerinti tápközeget tartalmazó tankot, amit kiegészítünk 3 g/liter (összesen 4 g/liter) glicinnel, 1 g/liter szójabab olajjal és 1 g/liter keményítő extraktummal. A nagyléptékű tenyésztést 25 °C hőmérsékleten 3-4 napig végezzük. A te-

nyésztés időtartama alatt a feloldott oxigén mennyiségét 30 %-os levegő telítettségre állítjuk a levegő beáramlás és a keverés szabályozásával. A pH-t  $5,2 \pm 0,2$  értékre állítjuk, a pH beállításához kénsavat vagy nátrium-hidroxidot használunk a szükségletnek megfelelően. A nagyléptékű tenyésztésnél 18 óra eltelte után (a fermentáció kezdetétől számítva) glükózt táplálunk be 200 ml/óra ütemben. 20 órával a nagyléptékű tenyésztés kezdete után ammónium-hidroxidot táplálunk be 20 ml/óra ütemben. A tenyésztés alatt a visszafutást gátló nyomás  $3,4 \times 10^4$  Pa. A keverést 150 fordulat/percre állítjuk, a levegő beáramlás sebessége 0,5 scfm. Szükség esetén habzástgátló szert adunk a fermentorba. Ezen körülmények bizonyos változatait szintén vizsgáltuk. A nagyléptékű tenyésztésnél a fermentálás 3. vagy 4. napján a *P. syringae* tenyészetet elkülönítjük. A gombaellenes hatást a 6. példában leírtak szerint vizsgáljuk.

### **Eredmények és következtetések**

Burgonya termékektől mentes tápközeg alkalmazásával és a fermentálást 5000 liter térfogatban végezve kereskedelmi szempontból jelentős mennyiségű pszeudomicineket tudtunk előállítani.

### **6. példa**

#### **Pszeudomicinek meghatározása és tisztítása**

#### **A pszeudomicinek kimutatása és meghatározása gombaellenes hatásuk alapján**

Egy pszeudomicin vagy pszeudomicin elegy jelenlétét vagy mennyiségét a készítmény gombaellenes hatása alapján mutathatjuk ki és határozhatjuk meg. A gombaellenes hatást in vitro körülmények között határozzuk meg a minimális inhibitor koncentráció (MIC) alapján standard agar hígítási módszerrel vagy lemez diffúziós vizsgálatot alkalmazva. Egy vagy több pszeudomicint tartalmazó termék extrahálható sejtenyészetből vagy tisztított elegy-



ből. A gombaellenes hatás vizsgálatához tipikus gombaként *C. albicans*-t használunk. A gombaellenes hatást akkor tekintjük jelentősnek, amennyiben a vizsgált készítmény 10-12 mm átmérőjű gátlási zónát hoz létre a *Candida albicans* x657-tel beoltott agar lemezeken.

A gombaellenes vizsgálatokat tápközeg hígítási módszerrel végezzük (a National Committee for Clinical Laboratory Standards útmutatása szerint) 96-lyukú mikrotiter lemezeken. Sabourauds és dextróz tápközeget  $2,5 \times 10^4$  *Candida*/ml koncentrációra állítunk be. A vizsgálati vegyületeket vízben feloldjuk, és kétszeres hígítási oldatokban vizsgáljuk, ahol a legnagyobb koncentráció 20  $\mu\text{g/ml}$ . A lemezeket 48 óra hosszat 35 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A 3. és 4. táblázatban mutatjuk be a minimális inhibitor koncentrációra (MIC) vonatkozó eredményeket, ahol a vizsgált vegyület a szaporodást teljes mértékben gátolta a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

### 3. táblázat

#### Pszeudomicin A' gombaellenes hatása

Mikroorganizmus	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Candida albicans</i>	2,5
<i>C. parapsilosis</i>	5,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,25
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>20
<i>Histoplasma capsulatum</i>	5,0



#### 4. táblázat

##### Pszeudomicin B' gombaellenes hatása

Mikroorganizmus	MIC ( $\mu$ /ml)
Candida albicans	10
C. parapsilosis	10
Cryptococcus neoformans	1,25
Aspergillus fumigatus	>20
Histoplasma capsulatum	1,25-5,0

#### A pszeudomicinek kimutatása és meghatározása HPLC módszerrel

Az egy vagy több pszeudomicint tartalmazó mintát szűréssel vagy centrifugálással tisztítjuk. A tisztított mintát Zorbax RxC8 oszlopon (3,5 T részecskék, 25 x 0,46 cm) kromatografáljuk; áramlási sebesség: 1 ml/perc. Az oszlopot 15 percig 0,2 % TFA tartalmú 20 → 55 % acetonitril lineáris gradienssel, majd ezután 5 percig 0,2 % TFA-tartalmú 55 %-os acetonitrillel eluáljuk. Tipikusan az A' pszeudomicin mintegy 13,7 perc után (822 másodperc), a pszeudomicin B' pedig 12,4 perc után (744 másodperc) eluálódik. A pszeudomicinek kimutatását a 215 nm-nél mért abszorpció alapján végezzük, a kvantitatív meghatározás az UV csúcsok alatti terület integrálásával történik. A kimutatáshoz és meghatározáshoz mindegyik pszeudomicinből standardot használunk.

#### 7. példa

##### Pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t tartalmazó készítmények

Az alább bemutatott formálási példák kizárólag a szemléltetés célját szolgálják, és semmiképpen nem korlátozzák a találmány oltalmi körét. Az



alábbiakban alkalmazott "hatóanyag" kifejezés pszeudomicin A'-t és/vagy B'-t vagy ezek gyógyászatilag megfelelő sóját jelenti.

### 1. készítmény

**Kemény zselatin kapszulákat készítünk az alábbi komponensekből:**

Komponensek	Mennyiség (mg/kapszula)
Hatóanyag	250
Keményítő, szárított	200
Magnézium-sztearát	10
Összesen	460 mg

### 2. készítmény

Tablettákat állítunk elő az alábbi komponensekből. A komponenseket elegyítjük, az elegyből 665 mg tömegű tablettákat készítünk.

Komponensek	Mennyiség (mg/kapszula)
Hatóanyag	250
Cellulóz, mikrokristályos	400
Szilícium-dioxid, lepárolt	10
Sztearinsav	5
Összesen	665 mg

### 3. készítmény

Aeroszol oldatot állítunk elő az alábbi komponensekből. A hatóanyagot etanollal elegyítjük, az elegyet a -30 °C-ra lehűtött 22-es jelzésű hajtóanyag



egy részletével összekeverjük, majd az elegyet töltő készülékbe visszük. A szükséges mennyiséget ezután rozsdamentes acéltartályba töltjük, és a megmaradt hajtóanyaggal meghígítjuk. A tartóedényt ezután a szelepegységgel lezárjuk.

Komponensek	Tömeg (g)
Hatóanyag	0,25
Metanol	27,75
22. hajtóanyag (klór-difluor-metán)	74,00
Összesen	100,00

#### 4. készítmény

60 mg hatóanyag tartalmú tablettákat állítunk elő az alábbi komponensekből.

Hatóanyag	60 mg
Mikrokristályos cellulóz	45 mg
Poli(vinil-pirrolidon) (10 %-os vizes oldat formájában)	4 mg
Nátrium-karboxi-metil-keményítő	4,5 mg
Magnézium-sztearát	0,5 mg
Talkum	1,0 mg
Összesen	150 mg

A hatóanyagot, keményítőt és cellulózt 0,32 mm nyílású szitán átszítaljuk, majd alaposan elkeverjük. Az így kapott port a polivinil-pirrolidont tartalmazó vizes oldattal elegyítjük, majd az elegyet 1,19 mm-es nyílású szitán átörjük. Az így kapott granulátumot 50 °C hőmérsékleten szárítjuk, majd a



száritott anyagot 0,9 mm-es nyílású szitán áttörjük. A nátrium-karboxi-metil-keményítőt, magnézium-sztearátot és talkumot előzetesen 0,25 mm nyílású szitán átszitáljuk, majd a fenti granulátumhoz adjuk. Keverés után az elegyet tablettázó berendezésben préseljük, egyenként 150 mg tömegű tablettákat előállítva.

### 5. készítmény

80 mg hatóanyag-tartalmú kapszulákat állítunk elő az alábbi összetétel szerint:

Hatóanyag	80 mg
Keményítő	59 mg
Mikrokristályos cellulóz	59 mg
Magnézium-sztearát	2 mg
Összesen	200 mg

A hatóanyagot, cellulózt, keményítőt és magnézium-sztearátot elegyítjük, az elegyet 0,32 mm nyílású szitán átengedjük, majd 200-200 mg-os adagokat kemény zselatin kapszulákba töltünk.

### 6. készítmény

Egyenként 225 mg hatóanyag-tartalmú kúpokot állítunk elő az alábbi komponensekből:

Hatóanyag	225 mg
Telített zsírsav-gliceridek	2000 mg
Összesen	2225 mg

A hatóanyagot 0,25 mm nyílású szitán átszitáljuk, és előzőleg minimális melegítéssel megolvasztott zsírsav-gliceridekben szuszpendáljuk. Az elegyet ezután 2 g nominális kapacitású kúpöntő formába töltjük, és hagyjuk lehűlni.

### 7. készítmény

5 ml-es adagokban 50 mg hatóanyagot tartalmazó szuszpenziót állítunk elő az alábbi komponensekből:

Hatóanyag	50 mg
Nátrium-karboxi-metil-cellulóz	50 mg
Szirup	1,25 ml
Benzooesav-oldat	0,10 ml
Ízanyag	q.v.
Színezék	q.v.
Tisztított víz, ad	5 ml

A hatóanyagot 0,32 mm nyílású szitán átszítjuk, majd a fent megadott mennyiségű nátrium-karboxi-metil-cellulózzal és sziruppal elegyítve sima pasztát készítünk. A benzooesav-oldatot, ízanyagot és színezéket egy adag vízzel meghígítjuk, majd keverés közben fenti pasztához adjuk. Az így nyert elegyet kellő mennyiségű vízzel a kívánt térfogatra feltöltjük.

### 8. készítmény

Intravénás készítményt állíthatunk elő az alábbiak szerint. Az alábbi komponensekből készült oldatot 1 ml/perc sebességgel adjuk be a kezelt személynek.

Hatóanyag	100 mg
Izotóniás nátrium-klorid-oldat	1000 mg

Az előnyös megoldások és műveletek bemutatásával a fentiekben ismertettük a találmányt. Hangsúlyozni szeretnénk azonban, hogy számos változtatás és módosítás végezhető a fentiekben ismertett megoldások alapján, anélkül, hogy a találmány oltalmi körétől és elgondolásától eltérnénk.



## Szabadalmi igénypontok

1. Elkülönített pszeudomicin, amely pszeudomicin A'-t, ennek gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észter-származékát, pszeudomicin B'-t, ennek gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észterszármazékát vagy ezek elegyét tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti pszeudomicin, amely pszeudomicin A'-t vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észter-származékát tartalmazza.

3. A 2. igénypont szerinti (IA) képletű pszeudomicin vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

4. Az 1. igénypont szerinti pszeudomicin, amely pszeudomicin B'-t vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észter-származékát tartalmazza.

5. A 4. igénypont szerinti (IB) képletű pszeudomicin vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

6. (IA) képletű elkülönített vegyület vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

7. (IB) képletű elkülönített vegyület vagy ennek gyógyászatiilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

8. Eljárás gombák aktivitásának gátlására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezelendő gombát olyan elkülönített pszeudomicinnel hozzuk érintkezésbe, ahol ezen pszeudomicin pszeudomicin A'-t, e vegyület gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját, észter-származékát, pszeudomicin B'-t, e vegyület gyógyászatiilag megfelelő sóját, hidrátját, észter-származékát vagy ezek elegyét tartalmazza.



9. A 8. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezeléshez használt pszeudomicin pszeudomicin A'-t vagy ennek gyógyászati-  
lag megfelelő sóját, hidrátját vagy észter-származékát tartalmazza.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a  
kezeléshez használt pszeudomicin (IA) képletű vegyület vagy ennek gyógyá-  
szatilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

11. A 8. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a  
kezeléshez használt pszeudomicin pszeudomicin B'-t, vagy ennek gyógyá-  
szatilag megfelelő sóját, hidrátját vagy észter-származékát tartalmazza.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a  
kezeléshez használt pszeudomicin (IB) képletű vegyület vagy ennek gyógyá-  
szatilag megfelelő sója, hidrátja vagy észter-származéka.

13. A 8. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a  
kezelt gomba *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus*  
*neoformans* vagy *Histoplasma capsulatum*.

14. Eljárás gombák aktivitásának gátlására, a z z a l j e l l e m e z v e ,  
hogy a kezelendő gombát (IA) képletű elkülönített vegyülettel vagy ennek  
gyógyászati-  
lag megfelelő sójával, hidrátjával vagy észter-származékával hoz-  
zuk érintkezésbe.

15. Eljárás gombák gátlására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a keze-  
lendő gombát (IB) képletű elkülönített vegyülettel vagy ennek gyógyászati-  
lag megfelelő sójával, hidrátjával vagy észter-származékával hozzuk érintkezés-  
be.

16. Az 1-7. igénypontok szerinti vegyületek alkalmazása gombák aktivi-  
tásának gátlására adható gyógyászati készítmények előállítására.

17. Az 1-7. igénypontok szerinti vegyületek alkalmazása gombák aktivi-  
tásának gátlására vagy gombás fertőzés tünetjeinek csökkentésére ad-  
ható gyógyászati készítmények előállítására.



18. Eljárás gombák gátlására növényeken vagy növényekben, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezelendő növényt pszeudomicin A'-t, ennek gyógyászatilag megfelelő sóját, hidrátját, észterét, pszeudomicin B'-t, ennek gyógyászatilag megfelelő sóját, hidrátját, észter-származékát vagy ezek elegyét tartalmazó, elkülönített pszeudomicinnel hozzuk érintkezésbe.

19. Eljárás gombák gátlására növényeken vagy növényekben, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezelendő növényt elkülönített (IA) képletű vegyülettel hozzuk érintkezésbe.

20. Eljárás gombák gátlására növényeken vagy növényekben, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a kezelendő növényt elkülönített (IB) képletű vegyülettel hozzuk érintkezésbe.

feldolgozott

A meghatalmazott:

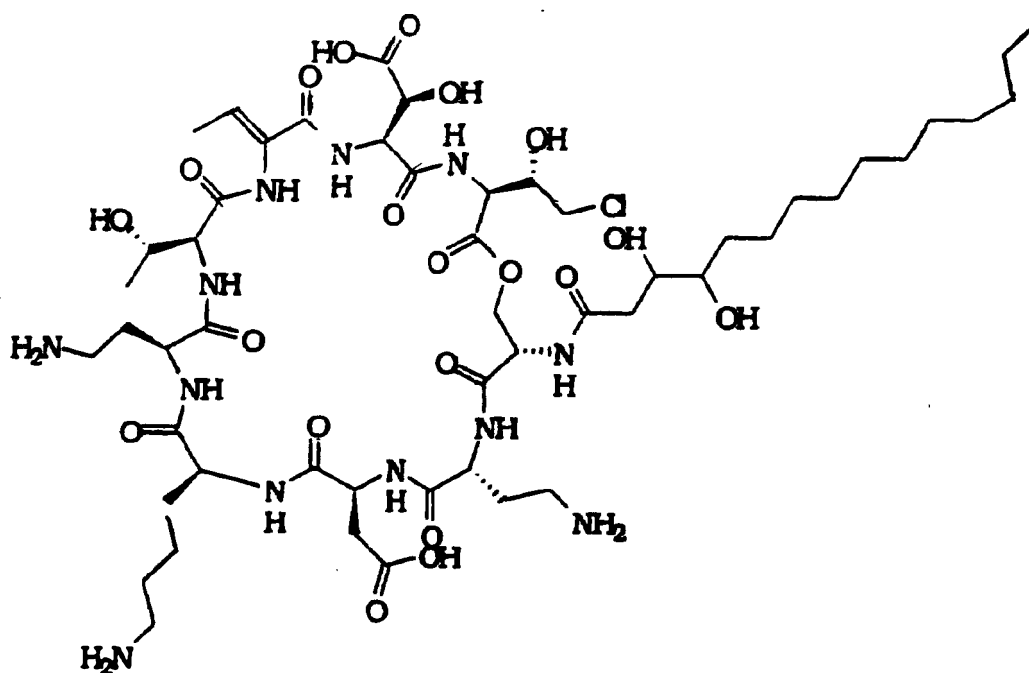
2002. 05. 07  
PK

**ifj. Szentpéteri Ádám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda  
tagja  
H-1042 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

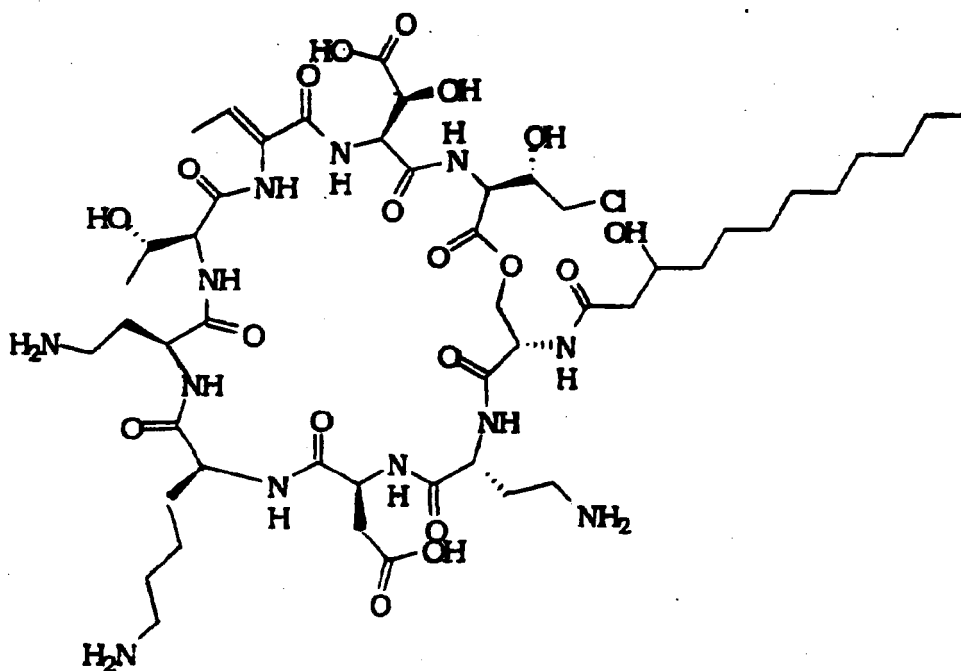
P02 00896

73333/82E  
1/1

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



IA



IB