

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045481**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.11.28

(21) Номер заявки

202192378

(22) Дата подачи заявки

2020.03.18(51) Int. Cl. **A01N 31/02** (2006.01)**A01N 33/12** (2006.01)**A61K 31/10** (2006.01)**A61K 31/14** (2006.01)**A01P 3/00** (2006.01)**(54) ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ**(31) **1904744.8**(32) **2019.04.04**(33) **GB**(43) **2021.12.14**(86) **PCT/GB2020/050691**(87) **WO 2020/201698 2020.10.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЭКСЕТЕР (GB)

(72) Изобретатель:

Штайнберг Геро, Гурр Сара, Вуд**Марк (GB)**

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,**Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**(56) **WO-A1-9115120****JP-A-H09300820**

KIYOSHI YAMAUCHI ET AL.: "Three-Phase Model of Micellar Reactions. Methylation of Thymidine by (Long-chain-alkyl)dimethylsulfonium Iodides", J. AM. CHEM. SOC, vol. 105, 1 February 1983 (1983-02-01), pages 538-545, XP055690018, DOI: 10.1021/ja00341a039, page 538; table 1

EP-A1-0079972

KENJI NEGORO ET AL.: "Preparation of Alkylethylmethylsulfonium Iodide and Their Physico-chemical, Antimicrobial Properties", JOURNAL OF JAPAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, vol. 27, no. 1, 1 January 1978 (1978-01-01), pages 47-51, XP055696558, DOI: 10.5650/josl956.27.47, abstract, table 2, page 50; table 5

EP-A1-0064441

(57) В изобретении предложены противогрибковая композиция, содержащая противогрибковое соединение формулы $R-S+(R')_2$ или $R-N+(R')_3$, где R представляет собой $C_{17}-C_{32}$ неразветвленный или разветвленный алкил; а каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил; и применения указанной композиции в качестве противогрибковых агентов.

B1**045481****045481 B1**

Область техники изобретения

Данное изобретение относится к противогрибковым композициям, содержащим катионные противогрибковые соединения с одной алкильной цепью. Дополнительно изобретение относится к применению катионных соединений с одной алкильной цепью в качестве противогрибковых агентов. В частности, изобретение относится к противогрибковым композициям, способам и применениям.

Уровень техники изобретения

Грибы представляют одну из наибольших биотических угроз для здоровья культурных растений и, следовательно, для безопасности пищевых продуктов. Эта угроза усугубляется практикой интенсивного земледелия, такой как выращивание монокультур, когда обширные поля генетически однородных сортов обеспечивают идеальную среду для появления новых резистентных к фунгицидам штаммов. Фактически скорость появления резистентности к фунгицидам превышает скорость разработки противогрибковых средств. В процессе разработки находится лишь небольшое количество "новых" противогрибковых средств, но они являются производными обычно используемых химикатов, например, нацеленных на биосинтез эргостерола или конкретные комплексы цепи митохондриального дыхания. Существует явная неотложная необходимость в новых противогрибковых средствах с новым образом действия, низкой токсичностью для млекопитающих и которые являются экологически безопасными. Кроме того, существует растущая потребность в открытии новых противогрибковых средств для лучшей защиты животных (включая людей) от грибковых заболеваний. Она возникла на фоне растущей резистентности к противогрибковым средствам в случае используемых в настоящее время клинических лекарственных препаратов (азолов). Также желательно заменить азолы в качестве антисептической обработки для малярных красок и пропитанной древесины.

Одними из потенциальных мишеней новых фунгицидов являются митохондрии грибов. Эти органеллы участвуют в широком спектре клеточных процессов, но, что наиболее важно, содержат ферменты для окислительного фосфорилирования, которое обеспечивает химическую энергию для "топлива" клетки. Окислительное фосфорилирование зависит от переноса электронов через комплексы цепи митохондриального дыхания во внутренней митохондриальной мембране (Hirst, 2013). Грибные митохондрии отличаются от своих аналогов у млекопитающих по композиции и функции дыхательных ферментов, что делает их привлекательными мишенями для новых фунгицидов. Действительно, два из трех лидирующих на рынке фунгицидов с одним сайтом-мишенью, которыми являются ингибиторы сукцинатдегидрогеназы (SDHI) и стробилурины, разрушают цепь митохондриального дыхания грибов путем нацеливания на дыхательные комплексы II и III. Митохондрии также вырабатывают активные формы кислорода (mROS) в комплексе I и III, которые в случае нарушения регуляции могут повреждать белки и липиды во внутренней митохондриальной мембране и инициировать апоптотическую гибель клетки. Увеличивающееся количество данных позволяет предположить, что такой путь запрограммированной гибели клеток существует в грибах, а нацеливание на этот путь является перспективной стратегией для разработки новых противогрибковых средств.

Перенос электронов через дыхательную цепь инициирует транспорт протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Это оставляет матрикс отрицательно заряженным и, следовательно, он становится мишенью для липофильных катионов. Эти молекулы, в которых катионная головная группа объединена с липофильным фрагментом, проходят через клеточные мембраны и накапливаются во внутренней мембране митохондрии, оставляя катионный фрагмент открытым со стороны матрикса. Это поведение позволяет осуществлять доставку терапевтических средств в митохондрии, но также может ингибировать дыхательные ферменты. Хотя такой эффект на функции митохондрий затрудняет применение липофильных катионов в медицине, он может послужить ключом для применения липофильных катионов в качестве растительных фунгицидов/противогрибковых средств.

Липофильные катионы широко используют в качестве дезинфицирующих средств на основе "катионных поверхностно-активных веществ" или в качестве добавок в косметических и фармацевтических составах. Катионные поверхностно-активные вещества и, в частности соединения четвертичного аммония, известны благодаря своей антибактериальной активности, но с недавних пор привлекают все больше внимания в связи с их потенциальным применением для борьбы с человеческими патогенными грибами. Термин "катионное поверхностно-активное вещество" подразумевает, что биологическая активность этих соединений происходит на поверхности патогена. Действительно, в связи с их амфифильной структурой ожидается, что эти молекулы будут встраиваться в плазматическую мембрану, а все известные в настоящее время противогрибковые липофильные катионы с n-алкильной цепью, по-видимому, уничтожают клетки грибов путем изменения проницаемости или функции плазматической мембраны или путем взаимодействия с клеточной стенкой гриба. Это касается липофильного катиона с одной алкильной цепью (SACC) додецилгуанидиния (далее называемого "C12-G⁺"), который является активным ингредиентом фунгицида додина. Додин является защитным фунгицидом, который широко используют для борьбы с паршой фруктовых растений и болезнями листьев в фруктовых садах. Хотя считается, что C12-G⁺ пермеабилизирует грибные клетки, он также проникает в клетки и, как сообщалось, ингибирует жизненно важные метаболические ферменты. Является ли внутриклеточная активность основным механизмом действия C12-G⁺ или следствием протекания клеток вследствие повышенной проницаемости

клеток, неизвестно.

Хотя С12-G+ применим в качестве фунгицида, он имеет некоторые проблемы с токсичностью. В частности, токсичность С12-G+ для *Daphnia magna* (водяных блох) и т.д. может привести к экологическим проблемам, если его использовать на культурных растениях или почвах, поскольку это может приводить, например, к попаданию воды в водоемы, такие как озера и реки.

Кроме того, хотя С12-G+ применим в качестве фунгицида, его эффективность ограничена при использовании против определенных грибов. Например, при применении для подавления *Zymoseptoria tritici* или *Magnaporthe oryzae* на пшенице и рисе, соответственно, С12-G+, хотя и является номинально эффективным, не полностью подавляет возникающие в результате септориозную пятнистость пшеницы и пирикулярриоз риса, даже в номинально высоких концентрациях (75-100 мкл/мл С12-G+).

Существует постоянная потребность в более эффективной обработке против патогенов культурных растений для того, чтобы наша будущая пищевая продукция была безопасной. Быстрое развитие резистентности к фунгицидам в случае лидирующих на рынке химикатов делает идентификацию новых фунгицидов приоритетной. Эти фунгициды должны (i) быть активными против повреждающих культуры патогенов, (ii) быть нацелены на фундаментальный процесс в нескольких сайтах для снижения развития резистентности и (iii) иметь низкую токсичность для людей и окружающей среды.

Следовательно, было бы целесообразно предоставить дополнительные противогрибковые соединения на основе катионного поверхностно-активного вещества, которые имеют улучшенную эффективность по сравнению с известными противогрибковыми соединениями на основе катионных поверхностно-активных веществ, такими как С12-G+, против конкретных грибов или против широкого спектра грибов. В контексте данного документа термин "противогрибковый" относится к широкому спектру токсических эффектов против представителей всех типов грибов и оомицетов.

Также было бы целесообразно предоставить дополнительные противогрибковые соединения на основе катионного поверхностно-активного вещества со сниженной токсичностью для окружающей среды и/или человека и со свойствами защиты краски и для предотвращения разложения продуктов из древесины.

Кроме того, было бы целесообразно предоставить более эффективные противогрибковые соединения на основе катионного поверхностно-активного вещества, композиции и средства обработки, которые нацелены на метаболизм грибов в нескольких сайтах в одном или более метаболических путях. В идеале в таких фунгицидах использовался бы механизм действия в нескольких сайтах, который нацелен на фундаментальные процессы в патогенной клетке.

Кроме того, было бы целесообразно предоставить эффективные биоцидные соединения на основе катионного поверхностно-активного вещества, эффективные против патогенов человека и/или животных, таких как патогенные грибы, а также эффективных против растительных патогенов.

Следовательно, целью вариантов осуществления настоящего изобретения является преодоление или уменьшение по меньшей мере одной проблемы известного уровня техники, описанной в данном документе или нет.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом изобретения предложена композиция, содержащая противогрибковое соединение (А) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$,

где R представляет собой $C_{17}-C_{32}$ неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил.

Соединение (А) может содержать любой подходящий противоион, такой как бромид, хлорид, йодид, гидроксид, сульфат, гидросульфат и фосфат.

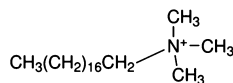
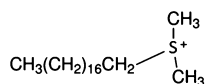
Предпочтительно композиция представляет собой композицию против грибов, но также может представлять собой композицию против бактерий или против простейших или любую их комбинацию (например, композицию против грибов и бактерий, или композицию против грибов, бактерий и простейших).

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение (А) и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, применение соединения (А) в качестве противогрибкового агента и способ уничтожения, контролирования или подавления гриба путем приведения композиции (А) в контакт с указанным грибом.

В предпочтительных вариантах осуществления R представляет собой $C_{18}-C_{24}$, предпочтительно неразветвленный алкил, $C_{18}-C_{22}$, предпочтительно неразветвленный алкил или $C_{18}-C_{20}$, предпочтительно неразветвленный алкил. В особенно предпочтительных вариантах осуществления R представляет собой C_{18} неразветвленный алкил.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R' представляет собой метил или этил, а в предпочтительных вариантах осуществления все R' представляют собой метил.

В особенности применимыми в качестве соединения (А) в композициях, применениях и способах по изобретению являются C_{18} -диметилсульфоний (октадецилдиметилсульфоний или "C18-DMS+") и C_{18} -триметиламмоний (октадецилтриметиламмоний или "C18-TMA+"), имеющие соответствующие формулы:



Композиция может включать, например, раствор, суспензию, эмульсию, порошок, пасту, гранулы, гель, мусс или пудру.

Композиция может содержать носитель. Носитель может включать растворитель, который может представлять собой воду или водный растворитель. Таким образом, композиция может представлять собой водную композицию соединения (А) в воде или водном растворителе. Водный растворитель может содержать воду и соразстворитель, который может быть выбран, например, из метанола и этанола.

Противогрибковая композиция может содержать соединение (А) в концентрации по меньшей мере 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,3 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,75 мкг/мл, 1 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 2 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 7,5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, 30 мкг/мл, 40 мкг/мл, 50 мкг/мл, 60 мкг/мл, 70 мкг/мл, 75 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 500 мкг/мл или по меньшей мере 1000 мкг/мл композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит соединение (А) в концентрации 0,1-1000 мкг/мл, например 0,1-250 мкг/мл или 0,1-200 мкг/мл.

В случае некоторых применений, таких как нанесение композиции на культурные растения (например, пшеницу, ячмень, овес, рис, сорго, банан, кукурузу, картофель, овощи или фрукты), плодовые растения и деревья, композиция может содержать соединение (А) в концентрации 10-1000 мкг/мл, например 20-500 мкг/мл, 25-250 мкг/мл или 10-100 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать адъювант. Адъювант может повышать эффективность противогрибкового соединения (А). Механизмы действия подходящих адъювантов включают забуферивание воды до рН, при котором конкретное противогрибковое соединение является наиболее активным, кондиционирование воды (например, при применении жесткой воды для растворения или разведения противогрибкового соединения они могут снижать потенциальные ингибирующие эффекты минералов, таких как кальций или магний), уменьшение поверхностного натяжения воды ("смачивающие агенты") так, чтобы противогрибковая композиция имела больший охват поверхности, на которую она нанесена. Адъюванты могут включать растворители, которые делают поверхности (такие как, например, серозные оболочки листьев растений, на которые наносят композицию) более проницаемыми для противогрибкового соединения; или они могут содержать питательные вещества, которые могут дополнять противогрибковое соединение при нанесении на культуры или другие растения, например, способствовать росту растений; или которые делают соединение (А) более эффективным против активно растущих растений. Другими подходящими адъювантами являются адъюванты, которые снижают снос во время распыления противогрибкового соединения, и адъюванты, которые могут снижать испарение и летучесть противогрибкового соединения.

Адъювант может представлять собой соединение, выбранное из: рН-буферного агента; агента для кондиционирования воды; смачивающего агента; средства, облегчающего проникновение через серозную оболочку листьев и/или клеточную мембрану; усилителя роста растений; обеспенивающего агента; агента для уменьшения сноса при распылении; и/или агента для снижения испарения; или любой их комбинации.

Адъювант может иметь форму добавки для защиты растений в виде спрея и/или поверхностно-активного вещества. Адъювант может повышать проницаемость серозной оболочки и/или клеточных мембран растений. Адъювант может представлять собой неионное средство, облегчающее растекание и проникновение; и/или снижать поверхностное натяжение композиции.

Адъювант может повышать фунгицидную активность указанного соединения (А), например, повышая проницаемость серозной оболочки и/или клеточных мембран. Адъювант может повышать фунгицидную активность соединения (А), например, повышая проницаемость серозной оболочки и/или клеточных мембран растений.

Адъювант может представлять собой, например, добавку для спреев для защиты растений, такую как поверхностно-активное вещество; неионное средство, облегчающее растекание и проникновение; и/или снижать поверхностное натяжение композиции.

Адъювант может включать активирующий адъювант или функциональный адъювант.

Активирующие адъюванты представляют собой соединения, которые при добавлении к композиции, содержащей соединение (А), повышают ее противогрибковую активность. Активирующие адъюванты включают, например, поверхностно-активные вещества, масляные носители, такие как масла "фитобленд" (не вредящие растениям), масла для защиты культур, маслянистые концентраты для защиты культур (СОС, англ. "crop oil concentrates"), растительные масла, метилированные масла из семян (MSO, англ.

"methylated seed oils"), нефтяные масла и силиконовые производные, а также азотные удобрения.

Функциональные адьюванты, которые иногда называют модификаторами распыления, изменяют физические или химические характеристики композиции, облегчая ее нанесение, например, за счет повышения ее адгезивности к поверхности растений так, чтобы она с меньшей вероятностью скатывалась, или повышения ее сохранности в окружающей среде.

В качестве адьювантного носителя или разбавителя для соединения (А) можно использовать одно или более масел.

Также в качестве активирующих адьювантов можно использовать соли, например, чтобы повысить поглощение и эффект противогрибкового соединения на целевых поверхности, материале или растении в течение времени.

В композиции могут присутствовать один или более поверхностно-активных адьювантов, чтобы облегчить или повысить эмульгирующие, диспергирующие, способствующие растеканию, клейкие или смачивающие свойства композиции.

Поверхностно-активные вещества снижают поверхностное натяжение в распыленных каплях композиции, когда композицию наносят на материал (такой как поверхность, листья растений и т.д.), что помогает композиции растекаться и покрывать целевой материал тонкой пленкой, приводя к более эффективной или быстрой абсорбции композиции материалом. Поверхностно-активные вещества также могут влиять на абсорбцию композиции при распылении на стебли или листья растений путем изменения вязкости и кристаллической структуры восков на поверхности листьев и стеблей так, чтобы они были более проницаемыми для соединения (А) композиции.

Поверхностно-активное вещество можно выбирать так, чтобы оно повышало противогрибковые свойства композиции за счет одного или более из: а) обеспечения более равномерного растекания композиции по материалу, на который наносят композицию; б) повышения удержания (или "приклеивания") композиции на материале; в) в случае применения для защиты растений или культур, повышения проникновения композиции через волоски, чешуйки или другие поверхностные структуры листьев растения; д) предотвращения кристаллизации композиции и/или е) замедления высыхания композиции.

Каждое поверхностно-активное вещество может быть выбрано из неионного поверхностно-активного вещества, ионного поверхностно-активного вещества, амфотерного поверхностно-активного вещества или цвиттерийного поверхностно-активного вещества или любой их комбинации.

Неионные поверхностно-активные вещества в общем случае являются биоразлагаемыми и совместимыми со многими удобрениями и поэтому могут быть предпочтительными в композициях по изобретению при применении для защиты культур или растений. Некоторые неионные поверхностно-активные вещества представляют собой воскоподобные твердые вещества и требуют добавления соразтворителя (такого как спирт или гликоль) для растворения до жидкого состояния. В общем случае гликолевые соразтворители предпочтительнее спиртовых, поскольку последние являются горючими, быстро испаряются и могут увеличивать число капель спрея (повышая вероятность сноса состава при распылении).

Неионное поверхностно-активное вещество может включать кремнийорганическое или кремнийсодержащее поверхностно-активное вещество (включая силоксаны и органосилоксаны). Кремнийорганические поверхностно-активные вещества существенно снижают поверхностное натяжение композиции, обеспечивая при применении возможность образования композицией тонкого слоя на поверхности листьев или стеблей растений. Кремнийсодержащие поверхностно-активные вещества также снижают поверхностное натяжение и позволяют композиции проникать в устьица листьев растений. Кремнийсодержащие поверхностно-активные вещества также обеспечивают композициям по изобретению защитный эффект, сильно затрудняя смывание композиций после их нанесения. Кремнийсодержащие поверхностно-активные вещества также могут влиять на уровень/скорость абсорбции соединения (А) через серозную оболочку листьев.

В других вариантах изобретения неионное поверхностно-активное вещество может включать карбамидное поверхностно-активное вещество (также известное как мочевиное поверхностно-активное вещество). Карбамидное поверхностно-активное вещество может содержать, например, дигидросульфат монокарбамида.

Подходящие ионные поверхностно-активные вещества включают катионные поверхностно-активные вещества и анионные поверхностно-активные вещества. Подходящие катионные поверхностно-активные вещества включают этоксилаты талловых аминов. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают сульфаты, карбоксилаты и фосфаты, присоединенные к липофильным углеводородам, включая, например, линейные алкилбензолсульфонаты.

Амфотерные поверхностно-активные вещества содержат как положительный, так и отрицательный заряд, и, как правило, функционируют аналогично неионным поверхностно-активным веществам. Подходящие амфотерные поверхностно-активные вещества включают, например, лецитин (фосфатидилхолин) и амидопропиламины.

Функциональные адьюванты, которые иногда называют модификаторами распыления, изменяют физические или химические характеристики композиции по изобретению, облегчая нанесение композиции, что может повышать ее адгезивность к поверхности растений так, чтобы уменьшить риск удаления

композиций с указанной поверхности; или повысить сохранность композиции в окружающей среде или на обрабатываемой площади, где присутствует композиция.

Примеры разных функциональных категорий функциональных адъювантов, подходящих для использования в композициях и применениях по изобретению, включают смачивающие агенты, агенты, способствующие растеканию, агенты для контроля сноса, пенообразующие агенты, красители, загустители, агенты для нанесения (клеякие вещества), агенты для кондиционирования воды, увлажнители, рН-буферы, обеспенивающие агенты, противовспенивающие агенты и поглотители УФ-излучения. Некоторые функциональные адъюванты могут иметь функцию более чем одной из вышеприведенных категорий. Некоторые активирующие адъюванты также являются функциональными адъювантами.

Смачивающие агенты или агенты, способствующие растеканию, снижают поверхностное натяжение композиций и позволяют композициям образовывать большой тонкий слой на листьях и стеблях целевого растения. Поскольку эти агенты, как правило, являются неионными поверхностно-активными веществами, растворимыми водой, спиртами или гликолями, они также могут иметь функции активирующих адъювантов (поверхностно-активных веществ). Однако некоторые смачивающие или способствующие растеканию агенты влияют только на физические свойства композиции и не влияют на поведение композиции после ее контакта с растениями.

Агенты для контроля сноса можно использовать для снижения сноса композиции при распылении, например, когда композицию распыляют на растение, что чаще всего происходит, когда мелкие (диаметром < 150 мкм) капли спрея сносятся с целевого участка потоками воздуха. Агенты для контроля сноса изменяют вязкоупругие свойства раствора для распыления, обеспечивая более крупночастичный спрей с большими средними размерами и массой капель и минимизируя число мелких, легко уносимых воздухом капель. Подходящие агенты для контроля сноса могут включать крупные полимеры, такие как полиакриламиды, полисахариды и определенные типы камедей.

Подходящие агенты для нанесения (клеякие вещества) включают, например, пленкообразующие растительные гели, эмульгируемые смолы, эмульгируемые минеральные масла, растительные масла и водорастворимые полимеры. Агенты для нанесения можно использовать для уменьшения потерь композиции на целевом растении вследствие испарения композиции с целевой поверхности или скатывания и опадения композиции. Агенты для нанесения, в частности, применимы для композиций по изобретению в форме сухих (смачиваемых) порошковых и гранульных составов.

Обеспенивающие и противовспенивающие агенты снижают, подавляют или устраняют образование пены в контейнерах, в которых могут содержаться композиции по изобретению. Подходящие обеспенивающие агенты включают, например, масла, полидиметилсилоксаны и другие силиконы, спирты, стеараты и гликоли.

Адъювант или адъюванты могут включать BREAK-THRU® S 240, BREAK-THRU® SP 131, BREAK-THRU® SP 133, BREAK-THRU® S 233, BREAK-THRU® OE 446, Aduro (RTM) и/или Transport Ultra (RTM). BREAK-THRU® S 240 представляет собой полиэфиртрисилоксан, который придает суперрастекаемость и сильно снижает поверхностное натяжение. BREAK-THRU SP131 состоит из полиглицериновых жирных сложных эфиров и полигликолей и улучшает характеристики противогрибковых соединений.

BREAK-THRU® SP 133 основан на полиглицериновых сложных эфирах и сложных эфирах жирных кислот. BREAK-THRU® S 233 представляет собой неионное поверхностно-активное вещество на основе трисилоксана, которое повышает нанесение агрохимических спреев и улучшает проникновение активных компонентов пестицидов в ткани растений. BREAK-THRU® OE 446 представляет собой полиэфирполисилоксан.

Transport Ultra (RTM) содержит смесь неионных поверхностно-активных веществ, аммонизированных ионов, агентов для кондиционирования воды и противовспенивающего агента.

Aduro (RTM) содержит дигидросульфат монокарбамида и алкиламинэтоксилаты.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере один адъювант выбран из силикона, силоксана, алкиламинэтоксилата или карбамида. Указанные адъюванты, в частности, применимы для усиления эффекта противогрибкового соединения или повышения или ускорения поглощения противогрибкового соединения растениями (в частности, сосудистыми растениями и мхами) иным образом.

В некоторых вариантах осуществления адъювант может включать: неионное поверхностно-активное вещество; и/или противовспенивающий агент; и/или ионы аммония; и/или агент для кондиционирования воды; и/или сополимер полиэфира и полиметилсилоксана; и/или полиэфирполисилоксан, и/или полиглицериновые жирные сложные эфиры и полигликоли; и/или полиглицериновые сложные эфиры и сложные эфиры жирных кислот; и/или неионный трисилоксан.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, которое может представлять собой неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере один силикон или силоксан, которые могут действовать как поверхностно-активное вещество, и/или противовспени-

вающий агент, и/или смачивающий агент.

В дополнение к соединению (А) противогрибковая композиция может содержать один или более дополнительных противогрибковых агентов. Дополнительные противогрибковые агенты могут быть выбраны из азолов; аминокпроизводных; стробилуринов; специфических соединений против пепелицы; анилинпиримидинов; бензимидазолов и их аналогов; дикарбоксимидов; многогалогенных фунгицидов; индукторов системной приобретенной устойчивости (SAR, англ. "systemic acquired resistance"); фенилпирролов; ацилаланинов; антипероноспорных соединений; дитиокарбаматов; ариламидинов; фосфорной кислоты и ее производных; фунгицидных соединений на основе меди; растительных масел (ботанических); хитозана; фунгицидов на основе серы; фунгицидных амидов; и азотных гетероциклов; или любой их комбинации.

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложено применение биоцидного соединения (А) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$,

где R представляет собой C_{17} - C_{32} неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил; в качестве агента против грибов, бактерий или простейших.

Соединение (А) может соответствовать описанию и определению выше для первого аспекта изобретения и предпочтительно представляет собой октадецилдиметилсульфоний или октадецилтриметиламмоний. Соединение (А) может находиться в противогрибковой композиции по первому аспекту изобретения.

В соответствии с третьим аспектом изобретения предложено биоцидное соединение (А) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$,

где R представляет собой C_{17} - C_{32} неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил; для применения при лечении заболевания, предпочтительно грибкового заболевания.

Соединение (А) может соответствовать описанию и определению выше и предпочтительно представляет собой октадецилдиметилсульфоний или октадецилтриметиламмоний. Соединение (А) может находиться в противогрибковой композиции по первому аспекту изобретения.

Заболевание может представлять собой патогенное заболевание растения. Патогенное заболевание растения может представлять собой патогенное заболевание растения или его семян, такого как, например, зерновые (пшеница, ячмень, рожь, овес, рис, кукуруза, сорго и т.д.), фруктовые растения (яблони, груши, сливы, персики, миндаль, вишни, бананы, виноград, клубника, малина, черная смородина и т.д.), цитрусовые растения (апельсины, лимоны, мандарины, грейпфруты и т.д.), бобовые (бобы, горошек, чечевица, соя и т.д.), овощи (шпинат, латук, спаржа, капуста, морковь, лук, томат, картофель, баклажан, перец и т.д.), тыквенные (тыква, цукини, огурец, дыня, арбуз и т.д.), масличные растения (подсолнечник, рапс, арахис, клещевина, кокос и т.д.), табак, кофе, чай, кокос, сахарная свекла, сахарный тростник, хлопок и садовые растения.

Виды растительных патогенных грибов и оомицетов, против которых можно использовать соединение (А), включают Basidiomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes или несовершенные грибы, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Microsporidia и Oomycetes. К ним относятся, но не исключительно, Puccinia spp., Ustilago spp., Tilletia spp., Uromyces spp., Phakopsora spp., Rhizoctonia spp., Erysiphe spp., Sphaerotheca spp., Podosphaera spp., Uncinula spp., Helminthosporium spp., Rhynchosporium spp., Pyrenophora spp., Monilinia spp., Sclerotinia spp., Septoria spp. (Mycosphaerella spp., Zymoseptoria spp.), Venturia spp., Botrytis spp., Alternaria spp., Fusarium spp., Cercospora spp., Cercospora herpotrichoides, Colletotrichum spp., Pyricularia oryzae, Sclerotium spp., Phytophthora spp., Pythium spp., Plasmopara viticola, Peronospora spp., Pseudoperonospora cubensis, Bremia lactucae.

Инфекции конкретными видами грибов, против которых можно использовать соединение (А), включают: Erysiphe graminis в случае зерновых, Zymoseptoria tritici в случае зерновых (в особенности пшеницы), Magnaporthe oryzae в случае зерновых (в особенности риса), Erysiphe cichoracearum и Sphaerotheca fuliginea в случае тыквенных, Podosphaera leucotricha в случае яблок, Uncinula necator в случае винограда, Venturia inaequalis (парша) в случае яблок, Helminthosporium species в случае зерновых, Septoria nodorum в случае пшеницы, Botrytis cinerea (серая плесень) в случае клубники и винограда, Cercospora arachidicola в случае земляных орехов, Pseudocercospora herpotrichoides в случае пшеницы и ячменя, Pyricularia oryzae в случае риса, виды Fusarium и Verticillium в случае различных растений и виды Alternaria в случае фруктов и овощей.

Примеры грибковых заболеваний растений, против которых можно использовать соединение (А), включают, но не ограничиваются этим: пятнистость (в частности пятнистость пшеницы), гниль, сосудистое заболевание Fusarium, рак растений, черную корневую гниль, корневую гниль Thielaviopsis, пирикулярриоз (в частности пирикулярриоз риса), хлопковую гниль, головню, ржавчину сои, ржавчину зерновых, фитофтороз картофеля, милдью, килу, антракноз, вымокание, гниль Rhizoctonia, прикорневую гниль, вдавленную пятнистость, мишеневидную пятнистость, повреждение листьев, септориозную пятнистость, кольцевую пятнистость, черную ножку, повреждение стеблей, черные сучки, спорынью, пузырчатость листьев, паршу, снежную плесень, чернь и увядание, вызванное Verticillium.

В некоторых вариантах осуществления заболевание может представлять собой патогенное грибковое заболевание животных, которое может, в некоторых вариантах осуществления, быть независимо выбрано из заболеваний из таблицы ниже:

Тип	Микозы	Возбудители
Поверхностные (дерматофитозы)	Отрубевидный лишай	Малассезионный
	Черный лишай	дерматит
	Белая пьедра/черная пьедра	Exophiala wemeckii Trichosporon
	Дерматофитозы (стригущий лишай)	beigelii/Pieddraia hortoe Вид Microsporum, вид Trichophyton и Epidermophyton floccosum Candia albicans и другие
Подкожные	Споротрихоз	Sporothrix schenckii (диморфный)
	Хромобластомикоз (феоидные грибы – вырабатывающие пигмент нитевидные грибы)	Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi и другие
	Мицетома	Pseudallescheria boydii, Modurella mycetomatis и другие
Системные, первичные (диморфные грибы)	Гистоплазмоз	Гистоплазмы
	Кокцидиридомикоз	Coccidioides immitis
	Бластомикоз Паракокцидиоидомикоз	Blastomyces dermatitidis Paracoccidioides brasiliensis
Системные, условно-патогенные	Кандидоз, системный (дрожжеподобные клетки)	Candida albicans и другие виды Candida
	Аспергиллез (нитевидный)	Aspergillus fumigatus и другие виды Aspergillus
	Криптококкоз (дрожжевой)	Cryptococcus neoformans Виды Rhizopus, Absidia,
	Мукоромикоз (зигомикоз) нитевидный	Mucor и другие Zygomycetes

Таким образом, соединение (A) можно использовать для лечения многих распространенных грибковых инфекций человека и животных, включая кандидоз, черный лишай и дерматофитозы.

В соответствии с четвертым аспектом изобретения предложен способ уничтожения, контроля или подавления гриба путем приведения гриба в контакт с соединением (A) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$, где R представляет собой $C_{17}-C_{32}$ неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил.

Соединение (A) может соответствовать описанию и определению выше и предпочтительно представляет собой октадецилдиметилсульфоний или октадецилтриметиламмоний. Соединение (A) может находиться в противогрибковой композиции по первому аспекту изобретения.

Способ может включать приведение гриба в контакт с противогрибковой композицией по первому аспекту изобретения.

Контроль или подавление гриба может включать контроль роста и/или продолжительности жизни гриба.

Способ может включать уничтожение, контроль или подавление грибов, инфицирующих растения (включая срезанные или растущие растения или части растений), семена, животных (включая людей, отличных от людей млекопитающих и других отличных от людей животных), почку или экосистему.

В случае внесения соединения (A) или его композиции в почву или землю экосистему уровень внесения может составлять от 0,02 до 3 кг или более активного ингредиента на гектар в зависимости от типа необходимого эффекта.

Растение может представлять собой сосудистое растение и, в некоторых вариантах осуществления, выбрано из культурного растения или дерева. Соединение (A) или композицию, содержащую соединение (A), можно наносить путем опрыскивания или опыления растений активными ингредиентами или обработки семян растений активными ингредиентами. Их можно наносить до или после инфицирования растений или семян грибом или грибами.

В других вариантах осуществления способ может включать уничтожение, контроль или подавление грибов в строительном материале или конструкционном материале. Строительный материал или конструкционный материал может включать древесину (сырую или обработанную), покрытие для стен, кирпичи, блоки, гипсокартон, покрытие для полов или краску.

Подходящие покрытия включают, например, обшивку, обои, керамические покрытия для стен (такие как плитка), резину, полимерные покрытия, краску и лак. Покрытия для полов включают, например, ковры, линолеум, деревянные доски или блоки, керамическую плитку и лак. Соединение (A) или композицию, содержащую соединение (A), можно наносить на покрытие для стен или покрытие для полов путем опрыскивания или опыления покрытия или путем пропитки покрытия соединением (A) или композицией, содержащей соединение (A).

Композиции, содержащие соединение (A), такие как растворы, эмульсии, суспензии, порошки, пасты, присыпки и гранулы, можно наносить на строительный или конструкционный материал, например, путем опрыскивания, атомизации, опыления, разбрызгивания, обработки или увлажнения.

В соответствии с пятым аспектом изобретения предложены строительные или конструкционные материал или композиция, содержащие соединение (A) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$,

где R представляет собой $C_{17}-C_{32}$ неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил или этил.

Соединением (A) можно, например, пропитывать строительные или конструкционные материал или композицию или же оно может составлять покрытие на них. Строительный или конструкционный материал могут быть выбраны из древесины (сырой или обработанной), покрытия для стен, кирпичей, гипсокартона, покрытия для полов или краски.

Строительные или конструкционные материал или композиция могут представлять собой материал или композицию, которые были обработаны (например, путем распыления, покрытия или пропитки) способом по четвертому аспекту изобретения.

В соответствии с шестым аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая противогрибковое соединение (A) формулы $R-S^+(R')_2$ или $R-N^+(R')_3$,

где R представляет собой $C_{17}-C_{32}$ неразветвленный или разветвленный алкил и каждый R' независимо представляет собой метил, этил, пропил, изопропил или бутил; и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Соединение (A) может соответствовать описанию и определению выше для первого аспекта изобретения и в предпочтительных вариантах осуществления представляет собой октадецилдиметилсульфоний ("C18-DMS+") или октадецилтриметиламмоний ("C18-TPP+").

Фармацевтические композиции по второму аспекту изобретения можно использовать для лечения людей или отличных от людей животных, в частности отличных от людей млекопитающих. Подходящие отличные от людей млекопитающие включают, например, овец, коз, коров, свиней, собак, кошек и лошадей. Другие животные могут включать, например, кур, гусей, уток, индеек или других птиц.

Фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент может представлять собой растворитель и предпочтительно представляет собой водный растворитель. В некоторых вариантах осуществления водный растворитель может представлять собой воду. В других вариантах осуществления водный растворитель может содержать смесь воды и соразтворителя. Соразтворитель может представлять собой спирт и может быть выбран из метанола, этанола и их комбинации.

Фармацевтическая композиция может находиться в форме для местного применения. Таким образом, фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для местного применения.

Термин "местное применение" относится к нанесению вещества на поверхность тела, такую как кожа. В предпочтительных вариантах осуществления местное применение является накожным (непосредственно на поверхность кожи), что также известно как "дермальное применение".

Фармацевтическая композиция может быть предоставлена в любой подходящей форме для местного применения, включая, но не ограничиваясь этим, мази, гели, кремы, лосьоны, пены, спреи, муссы, пластыри, порошки, пасты, гидрогели, эмульсии (включая эмульсии типа масло в воде, вода в масле, масло в воде в масле, вода в масле в воде) или любую их комбинацию. В некоторых предпочтительных

вариантах осуществления фармацевтическая композиция предоставлена в виде крема, мази, лосьона или геля, наиболее предпочтительно - крема или мази.

В некоторых вариантах осуществления носитель или разбавитель может представлять собой водный носитель или разбавитель, который может включать саму воду, например, деионизированную воду, или смесь воды и другого растворителя. Подходящие смеси содержат, например, воду и полярный протонный растворитель (такой как метанол, этанол, пропанол, изопропанол и бутанол).

В альтернативном варианте носитель или разбавитель может включать гидрофобный носитель или разбавитель, который может быть выбран из масла или жира, природного воска, нефтяного воска, углеводорода или любой подходящей их смеси. В альтернативном варианте носитель или разбавитель может включать органический растворитель.

Подходящие природные воски включают пчелиный воск (включая белый или желтый пчелиный воск), карнаубский воск, шерстяной воск, ланолин (такой как очищенный ланолин или безводный ланолин) или любую подходящую их комбинацию.

Подходящие нефтяные воски включают твердый парафин и микрокристаллический воск.

Подходящие углеводороды включают жидкий парафин, мягкий парафин (включая белый или желтый парафин), белый петролатум, желтый петролатум или любую подходящую их комбинацию.

Фармацевтическая композиция может содержать любой другой подходящий носитель или разбавитель, например, описанный в Британской фармакопее издания 2017 г. или 9-ом издании Европейской фармакопее.

Подходящие органические растворители включают, но не ограничиваются этим, неполярные растворители, полярные апротонные растворители и полярные протонные растворители.

Подходящие неполярные растворители включают алканы (такие как гексан и пентан), циклоалканы (такие как циклопентан и циклогексан), бензол, толуол, хлороформ, диэтилэфир и дихлорметан.

Подходящие полярные апротонные растворители включают тетрагидрофуран, этилацетат, ацетон, диметилформамид, ацетонитрил, диметилсульфоксид и пропиленкарбонат.

Полярные протонные растворители включают, но не ограничиваются этим, спирты (такие как, например, метанол, этанол, пропанол, изопропанол и бутанол), муравьиную кислоту и уксусную кислоту.

Применение органического растворителя по определению выше является исключительно целесообразным, например, для фармацевтических композиций в форме спреев. Спреи можно использовать, чтобы гарантировать покрытие фармацевтическими композициями труднодоступных участков кожи, например, между копытами или под складками кожи.

В некоторых вариантах осуществления соединение (A) может быть инкапсулировано. В некоторых вариантах осуществления соединение (A) может быть включено в липосомы. В случае как инкапсулированного соединения (A), так и заключенного в липосомах соединения (A) фармацевтические композиции по изобретению могут содержать водный носитель, включая саму воду. Соединение (A) может быть микроинкапсулировано. Подходящие инкапсуляторы для инкапсуляции или микроинкапсуляции включают, например, дрожжевые клетки, материалы внешней оболочки спор (например, из пыльцевых зерен) и т.п.

Фармацевтическая композиция по изобретению может дополнительно содержать один или более фармацевтических эксципиентов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, но не ограничиваются этим, эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, растворители, соразтворители, консерванты, стабилизаторы, буферы, солюбилизаторы, диспергирующие агенты, антиоксиданты, загустители, смягчители, лубриканты, эмульгаторы и один или более дополнительных агентов для заживления или кондиционирования кожи.

Фармацевтическая композиция по изобретению может дополнительно содержать один или более фармацевтических эксципиентов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, но не ограничиваются этим, эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, растворители, соразтворители, консерванты, стабилизаторы, буферы, солюбилизаторы, диспергирующие агенты, антиоксиданты, загустители, смягчители, лубриканты, эмульгаторы и один или более дополнительных агентов для заживления или кондиционирования кожи.

Подходящие консерванты включают один или более агентов, выбранных из перечня, включающего: соединение четвертичного аммония, такое как, например, бензалкония хлорид (N-бензил-N-(C₈-C₁₈-алкил)-N,N-диметиламмония хлорид), бензоксония хлорид, бензетония хлорид, цетримид (гексадецилтриметиламмония бромид), сепазония хлорид, цетилпиридиния хлорид, домифена бромид и т.п.; соединения на основе кватернизированного аммония и циклодекстринов (соединения QACD, описанные, например, в US 3453257 или US 5241059); алкил-ртутные соли тиосульфидной кислоты, такие как, например, тиомерсал, нитрат фенолртути, ацетат фенолртути или борат фенолртути; парабены, такие как, например, метилпарабен или пропилпарабен; спирты, такие как, например, хлорбутанол, бензиловый спирт или фенолэтиловый спирт; производные бигуанидов, такие как, например, хлоргексидин или полигексаметиленбигуанид; перборат натрия; имидазолидинилмочевину; сорбиновую кислоту; стабилизированные оксихлор-комплексы; полигликолевые-полиаминные конденсационные смолы; стабилизированный пероксид водорода, образуемый из источника пероксида водорода для обеспечения эффективного следово-

го количества получаемого в результате пероксида водорода, например, татрагидрат пербората натрия; и/или любую подходящую их комбинацию.

Предпочтительными консервантами являются соединения четвертичного аммония, в частности бензалкония хлорид, цетримид и фенилэтиловый спирт. При необходимости в фармацевтическую композицию добавляют достаточное количество консерванта, чтобы обеспечить защиту от вторичного загрязнения во время использования.

Подходящие поверхностно-активные вещества или эмульгаторы включают, но не ограничиваются этим, неионные поверхностно-активные вещества, анионные поверхностно-активные вещества, катионные поверхностно-активные вещества, амфотерные поверхностно-активные вещества и цвиттерионные поверхностно-активные вещества.

Подходящие катионные поверхностно-активные вещества включают, например, соли четвертичного аммония. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как натриевые или калиевые соли жирных кислот; и сульфаты солей жирных кислот, такие как, например, лауретсульфат натрия и додецилсульфат натрия.

Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются этим, эфиры жирных спиртов, сложные эфиры полиолов, сложные эфиры полиоксиэтилена, полиоксамеры и т.п. Подходящие сложные эфиры полиоксиэтилена включают, но не ограничиваются этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ). Подходящие сложные эфиры полиолов включают, но не ограничиваются этим, сложные эфиры гликоля и глицерина и производные сорбитана.

Следует понимать, что фармацевтические композиции по изобретению для местного применения не должны содержать ингредиенты, которые могут вызывать раздражение кожи, даже при длительном использовании. Следует избегать соединений, к которым может возникнуть сенсibilизация. Таким образом, в качестве поверхностно-активного вещества могут быть предпочтительны сбалансированные амфотерные поверхностно-активные вещества.

Термин "амфотерное поверхностно-активное вещество" хорошо известен специалистам в данной области техники. Такие поверхностно-активные вещества (которые также могут быть известны как амфолитические поверхностно-активные вещества) имеют по меньшей мере одну анионную группу и по меньшей мере одну катионную группу и, следовательно, могут иметь анионные, неионные или катионные свойства в зависимости от pH. Если изоэлектрическая точка молекулы приходится на pH 7, говорят, что молекула сбалансирована. Амфотерные поверхностно-активные вещества могут иметь детергентные и дезинфицирующие свойства. Сбалансированные амфотерные поверхностно-активные вещества могут, в частности, не вызывать раздражение кожи и, следовательно, быть предпочтительными в местных фармацевтических композициях по изобретению.

Подходящие амфотерные поверхностно-активные вещества включают аминокарбоновые кислоты, производные аминопропионовой кислоты, производные имидазолина, додидин, пендекамаин или длинноцепочечные бетаины, или кокамидопропилбетаины.

Подходящие комплексообразующие агенты включают, но не ограничиваются этим, выбранные из: двунатриевый этилендиаминтетраацетат, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА); хелатирующие агенты, имеющие группы фосфоновой кислоты или фосфонатов, предпочтительно органофосфонатов, в частности аминок три(нижних алкиленовых фосфоновых кислоты) и т.п.; циклодекстрины, например, α -, β - или γ -циклодекстрин, например, алкилированные, гидроксилалкилированные, карбоксилалкилированные или алкилоксикарбонилалкилированные производные, или моно- или дигликозил- α -, β - или γ -циклодекстрин, моно- или димальтозил 1- α -, β - или γ -циклодекстрин или панозил-циклодекстрин, и любую их подходящую смесь.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистеин, цистеин, гидросульфит натрия, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол или природные или синтетические производные витамина E, такие как, например, альфа-токоферол или альфа-токоферола ацетат.

В другом варианте осуществления описанная в данном документе композиция, содержащая соединение (A), также может содержать второй агент (второй активный ингредиент, второй активный агент), который обладает необходимой терапевтической или профилактической активностью, отличной от активности противогрибкового соединения (A). Такой второй активный агент может включать, но не ограничиваться этим, дополнительный противогрибковый агент, антибиотик, антители, противовирусный агент, противораковый агент, анальгетик (например, нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат (NSAID), ацетаминофен, опиоид, ингибитор COX-2), иммуностимулирующий агент (например, цитокин), гормон (природный или синтетический), стимулятор центральной нервной системы (ЦНС), противорвотный агент, антигистамин, эритропоэтин, стимулятор комплемента, седативное средство, мышечный релаксант, анестетик, противосудорожный агент, антидепрессант, антипсихотический агент и их комбинации.

В соответствии с седьмым аспектом изобретения предложено соединение (A) для применения в лечении грибкового заболевания человека или млекопитающего.

Соединение (А) может находиться в фармацевтической композиции, описанной выше для шестого аспекта изобретения. Грибковое заболевание человека или млекопитающего может представлять собой описанное выше.

Подробное описание изобретения

Для более ясного понимания изобретения теперь исключительно в качестве примера будут описаны варианты его осуществления со ссылкой на прилагаемые графические материалы, на которых

на фиг. 1 приведена таблица (табл. 1), иллюстрирующая относительную эффективность C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ в отношении противогрибковой активности и токсичности для двух грибковых инфекций растений (*Z. tritici* на пшенице и *M. oryzae* на рисе);

на фиг. 2 изображены 4 графика, иллюстрирующих ингибирующий эффект SACC C18-TMA+ и C18-DMS+ на митохондриальный потенциал для двух патогенных для растений и двух патогенных для человека грибов.

на фиг. 3 изображены 3 графика, обобщающих результаты экспериментов по окрашиванию в отношении живых/мертвых клеток, которые использовали для оценки гибели от C18-TMA+ и C18-DMS+ одного патогенного для растений гриба, вызывающего септориозную пятнистость пшеницы, и двух видов *Candida*, которые вызывают инфекционные заболевания у людей.

на фиг. 4 приведен график, иллюстрирующий дополнительный механизм действия (генерацию митохондриальных активных форм кислорода) C18-DMS+ для трех патогенных для растений грибов, вызывающих пирикулярриоз риса (*Magnaporthe oryzae*), септориозную пятнистость пшеницы (*Zymoseptoria tritici*) и пузырчатую головню кукурузы (*Ustilago maydis*); и двух видов *Candida*, которые вызывают инфекционные заболевания у людей;

на фиг. 5 приведен график, иллюстрирующий дополнительный механизм действия (индукцию запрограммированной гибели клеток, продемонстрированной двумя методами окрашивания в *Zymoseptoria tritici*) C18-DMS+;

на фиг. 6 приведен график, иллюстрирующий повышенный потенциал C18-DMS+ в отношении защиты культур против септориозной пятнистости пшеницы и пирикулярриоза риса;

на фиг. 7 приведен график, иллюстрирующий дополнительный механизм действия (индукцию защитной системы растения) C18-DMS+;

на фиг. 8 приведена таблица (табл. 2) со сравнением относительной эффективности и токсичности C12-G+ и C18-DMS+ с использованием данных из таблицы на фиг. 1 и

на фиг. 9 проиллюстрирована модель эффекта SACC на окислительное фосфорилирование грибов.

Определение эффекта додецилгуанидиния (додина) на целостность грибной плазматической мембраны

Исследовали физиологический эффект и механизм действия (далее - "МД") известного противогрибкового соединения додина (далее - "C12-G+") на базидиальный гриб пузырчатой головни кукурузы *U. maydis* и сумчатый гриб септориозной пятнистости пшеницы *Z. tritici*. Оба гриба являются основными экономически важными патогенами культурных растений, для которых недавно были разработаны технологии и инструменты клеточной биологии, включая флуоресцентные маркеры для визуализации оргanelл живых клеток.

На агаровых планшетах, дополненных C12-G+, происходило ингибирование грибкового роста зависимым от концентрации образом, причем *Z. tritici* был в ~ 4 раз более чувствительным к C12-G+, чем *U. maydis* (концентрация при 50% ингибировании роста: EC₅₀, *Z. tritici*: 0,6 мкг/мл; EC₅₀, *U. maydis*: 2,3 мкг/мл. После этого исследовали токсичность C12-G+ в жидких культурах клеток, экспрессирующих флуоресцентный маркер плазматической мембраны ЗФБ-Ssol, используя окрашивание в отношении живых/мертвых клеток. В этих анализах живые клетки были зелеными, но становились желтыми или красными после гибели. Снова C12-G+ был более эффективным в *Z. tritici*, чем в *U. maydis* и уничтожал > 80% клеток через 1 ч при 100 мкг/мл (по сравнению с ~ 15% уничтожения в *U. maydis* в таких же условиях). После 30-45 мин инкубации с C12-G+ при концентрации до 50 мкг/мл (*U. maydis*) или 100 мкг/мл (*Z. tritici*) большинство клеток все еще оставались живыми, что позволяет предположить, что изучение клеток в этих условиях может дать представление о первичном клеточном ответе на препарат.

Считается, что C12-G+ действует на грибную плазматическую мембрану. Наблюдали за подвергнутыми воздействию клетками, экспрессирующими флуоресцентный маркер ЗФБ-Ssol, чтобы определить изменения во внешнем виде плазматической мембраны. Высокие концентрации C12-G+ индуцировали образование "заплат" ЗФБ-Ssol на периферии клеток обоих грибов, но *Z. tritici* был в ~2 раз менее чувствительным к C12-G+ (при 50 мкг/мл). Исследования с помощью электронной микроскопии выявили, что обработанные C12-G+ клетки демонстрируют инвагинацию плазматической мембраны. Эти структуры распознавались антителами к ЗФБ, показывая, что они представляют заплатки ЗФБ-Ssol. Считается, что инвагинация плазматической мембраны может быть последствием избыточного встраивания C12-G+ в грибную плазматическую мембрану и поэтому отслеживали латеральную диффузию ЗФБ-Ssol в обработанных C12-G+ клетках. Под воздействием света происходило обесцвечивание репортера в плазматической мембране, и наблюдали восстановление флуоресценции, которое указывало на латеральное пере-

мещение необесцвеченного 3ФБ-Ssol. Добавление > 10 мкг/мл C12-G+ существенно снижало подвижность 3ФБ-Ssol в *U. maydis*, однако этот эффект не наблюдали в обработанных C12-G+ клетках *Z. tritici*, что позволяет предположить разницу во влиянии SACC на плазматическую мембрану двух грибов.

Затем определяли индуцированную препаратом утечку ионов из клетки путем визуализации изменений мембранного потенциала в обработанных C12-G+ клетках, используя потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд бис-(1,3-дибутилбарбитуровой кислоты) триметиноксонол, DiBAC4(3), который окрашивает только деполяризованные клетки. Высокие концентрации C12-G+ увеличивали число деполяризованных клеток в *U. maydis*, но оказывали лишь небольшое влияние на *Z. tritici*. Этот результат подтверждает, что C12-G+ имеет большее влияние на плазму в *U. maydis*, чем в *Z. tritici*. Однако низкий эффект C12-G+ на плазматическую мембрану *Z. tritici* не соответствует его токсичности для этого гриба (смотрите выше). Следовательно, эффект на плазматическую мембрану, вероятно, не является основным МД C12-G+ в грибах.

Определение эффекта C12-G+ на митохондриальную организацию и дыхание грибов

Исследовали липофильный катион C12-G+, чтобы определить, нацелен ли он на отрицательно заряженные митохондрии грибов. Накопление липофильных катионов во внутренней мембране индуцирует изменения в тонкой структуре митохондрий. Эффект C12-G+ исследовали, используя штаммы грибов, которые содержали флуоресцентный маркер (флуоресцентные репортерные белки) в отношении митохондрий. Низкие концентрации C12-G+ сильно влияли на форму митохондрий и индуцировали фрагментацию органелл. Электронная микроскопия позволила выявить изменение организации внутренней митохондриальной мембраны с разупорядоченными и вздутыми кристами. Этот результат свидетельствует в пользу того, что C12-G+ нацелен на митохондрии и встраивается в их внутреннюю мембрану. Эта мембрана содержит белковые комплексы дыхательной цепи, которые создают мембранный потенциал, необходимый для синтеза АТФ. Также определяли, влияет ли C12-G+ на окислительное фосфорилирование, путем окрашивания обработанных C12-G+ клеток красителем в отношении митохондриального потенциала, тетраметилродамина метиловым эфиром (TMRM), и обнаружили, что даже низкие количества C12-G+ деполяризовали митохондрии в *U. maydis*. Измерение потребления внутриклеточного кислорода в клеточных суспензиях подтвердило, что C12-G+ ингибирует клеточное дыхание. Аналогичный эффект на мембранный потенциал наблюдали в *Z. tritici*, а *Z. tritici* был в ~ 4 раз более чувствительным к обработке C12-G+, чем *U. maydis*. Это соответствует в ~ 4 раз повышенной гибели клеток *Z. tritici* в присутствии C12-G+ (смотрите выше). Следовательно, вероятно, что ингибирующий эффект на выработку АТФ является основным МД C12-G+ в грибах.

Эффекты на митохондрии могут быть обусловлены специфичностью C12-G+ в отношении грибов. Чтобы исследовать это, фибробласты кожи человека C109 обрабатывали C12-G+ и отслеживали его эффекты на форму митохондрий и мембранный потенциал.

C12-G+ оказывает небольшой эффект на митохондриальную организацию в концентрациях до 20 мкг/мл, но выше этой концентрации вызывает фрагментацию органелл и вздутие крист. Это позволяет предположить, что C12-G+ встраивается в митохондриальную внутреннюю мембрану человека, но при в ~ 5 раз большей концентрации, чем в *Z. tritici* (как показано в табл. 1 на фиг. 1; сравните значение EC50 для фрагментации митохондрий). Мы также обнаружили умеренный эффект C12-G+ на потенциал митохондриальной мембраны - человеческие клетки были в ~ 50 раз менее чувствительными к липидному катиону (как показано в табл. 1 на фиг. 1; сравните значение EC50 для деполяризации в табл. 1). Таким образом, ингибирующий эффект на митохондриальное дыхание наиболее вероятно является основой специфичности C12-G+ в отношении грибов.

Определение эффекта более длинной алкильной цепи на противогрибковую активность

Разработав анализы, которые позволяют количественно отслеживать эффект C12-G+ на митохондрии, проводили синтез и идентификацию новых катионов с одной алкильной цепью (далее - "SACC"). Сообщалось, что головная группа катиона и длина алкильной цепи определяют активность SACC. Таким образом, синтезировали SACC, в которых были скомбинированы разные катионные (и один анионный) фрагменты, включая головную группу сульфония, с алкильными цепями различной длины, и исследовали их эффект на митохондрии *Z. tritici*. В качестве показателя встраивания в митохондриальные мембраны отслеживали степень фрагментации, а деполяризацию митохондрий измеряли, используя окрашивание TMRM.

Были синтезированы следующие соединения:

- (i) C12-алкильные катионы с различными фрагментами:
 - додецилтрифенилфосфоний - далее "C12-TRP+";
 - додецилтриметиламмоний - далее "C12-TMA+";
 - додецилтриэтиламмоний=C12-TEA+;
 - додецилдиметилсульфоний - далее "C12-DMS+";
- (ii) липофильные катионы с короткими C6-алкильными цепями:
 - гексилтриметиламмоний - далее "C6-TMA";
 - гексилдиметилсульфоний - далее "C6-DMS+") и

(iii) липофильные катионы с более длинными C18-алкильными цепями:

(октадецилтриметиламмоний - далее "C18-TMA+";

октадецилдиметилсульфоний - далее "C18-DMS+";

(iv) липофильные алкильные анионы:

додецилфосфат - далее "C12-PO4-")

(v) симметричный липофильный катион с фрагментами диметилсульфония в каждом конце C12-алкильной цепи:

(додекан-1,12-диилбис(диметилсульфоний - далее "+(DMS)2-C12")

В низкой концентрации (2,5 мкг/мл) только молекулы в группе (i) и группе (iii) индуцировали существенную митохондриальную фрагментацию.

Исследовали EC50 на *Z. tritici* для каждого соединения группы (i) и (iii) и получили следующие результаты:

EC50 [C12-G+]: 6,63 мкг/мл; EC50 [C12-TPP+]: 6,63 мкг/мл; EC50 [C12-TMA+]: 3,85 мкг/мл; EC50 [C12-TEA+]: 2,38 мкг/мл; EC50 [C12-DMS+]: 7,39 мкг/мл; EC50 [C18-TMA+]: 1,55 мкг/мл; EC50 [C18-DMS+]: 1,72 мкг/мл).

Результаты показывают, что только катионные амфипатические молекулы с длинными алкильными цепями встраиваются в митохондриальную мембрану. Однако при исследовании митохондриальной деполаризации только C12-TPP+ и два катиона с C18-алкильной цепью (C18-TMA+, C18-DMS+) продемонстрировали существенное ингибирование митохондриального дыхания в *Z. tritici*. Все три SACC исследовали в отношении их способности деполаризовать митохондрии в патогенных для растений грибах *Zygomycetozia tritici* (вызывающих септориозную пятнистость пшеницы) и *Magnaporthe oryzae* (вызывающих пирикулярриоз риса). Кроме того, C18-TMA+, C18-DMS+ исследовали в отношении аналогичного эффекта на митохондриальный потенциал в *Candida albicans* и *Candida glabrata* (оба вызывают различные инфекционные кандидозы). Все соединения снижают митохондриальный потенциал (фиг. 2), необходимый для синтеза АТФ (основная функция митохондрий). Это говорит в пользу заключения, что ингибирование дыхания является основным физиологическим эффектом SACC. В соответствии с влиянием на важный клеточный путь C18-TMA+, C18-DMS+ эффективно уничтожали *Z. tritici* (воздействие 12-14 ч, 10 мкг/мл) и оба вида *Candida* (фиг. 3; результаты из экспериментов по окрашиванию в отношении живых/мертвых клеток), причем C18-DMS+ был наиболее токсичным в *C. albicans* (воздействие 5 ч, 100 мкг/мл). Оба C18-TMA+ и C18-DMS+ были в 2-7 раз более токсичными для *Z. tritici*, чем C12-G+.

В результате этого эксперимента для последующего исследования использовали только определенные C12 и оба C18 SACC, поскольку было ясно, что C6 SACC и некоторые из C12 SACC не подходили в качестве эффективных противогрибковых агентов.

Определение токсичности C18-TMA+ и C18-DMS+ в человеческих клетках и *Daphnia magna*

Низкая токсичность для людей и окружающей среды является важным требованием для фунгицидов. Поэтому исследовали токсичность C12-TPP+, C18-TMA+ и C18-DMS+ на фибробластах кожи человека C109. Митохондриальную организацию и митохондриальный мембранный потенциал отслеживали после инкубации с различными концентрациями соединений. Эти эксперименты позволили выявить, что C12-TPP+ оказывал небольшой эффект на организацию человеческих митохондрий (EC [C12-TPP+]: 5,62 мкг/мл), но влиял на человеческое митохондриальное дыхание в низкой концентрации (EC50 C12-TPP+: 0,355 мкг/мл) и, следовательно, его посчитали слишком токсичным в качестве эффективного противогрибкового агента для большинства применений.

В отличие от этого, катионы с C18-алкильными цепями C18-TMA+ и C18-DMS+ индуцировали изменения митохондриальной морфологии в грибах при 1,5-1,8 мкг/мл, тогда как человеческие митохондрии были в ~ 29 раз менее чувствительными к обоим SACC по сравнению с C12-G+ (как показано в табл. 1 на фиг. 1). Кроме того, оба соединения ингибировали митохондриальное дыхание в *Z. tritici* при намного меньшей концентрации, чем в человеческих клетках, что указывает на в ~ 75 раз (C18-TMA+) и ~ 53 раз (C18-DMS+) большую специфичность обоих SACC в отношении грибов, чем в отношении людей (как показано в табл. 1 на фиг. 1). Аналогичное ингибирование митохондриального дыхания было обнаружено в человеческих патогенах *Candida albicans* и *Candida glabrata* (фиг. 2).

Кроме того, исследовали токсичность C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ на водяных блохах *Daphnia magna*. Это пресноводное ракообразное является общепризнанным репортерным организмом в исследованиях токсичности. Сначала *Daphnia magna* обрабатывали 1 мкг/мл C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ в течение 30 мин с последующей визуализацией митохондриального потенциала с помощью TMRM. Эта обработка не влияла на подвижность ракообразных. Водяные блохи, которых инкубировали с контрольным растворителем (без SACC), демонстрировали красную флуоресценцию, что позволяет предположить, что их митохондрии были здоровы. C12-G+-обработанные организмы утрачивали большую часть сигнала, что указывает на то, что даже низкие количества C12-G+ быстро начинают влиять на митохондриальное дыхание *Daphnia magna*. В отличие от этого, катионы с C18-алкильными цепями имели слабый эффект или не влияли на митохондриальный потенциал.

После этого водяных блох обрабатывали в течение 24 ч различными концентрациями всех трех

SACC и отслеживали их двигательную активность и "реакцию избегания" в качестве индикатора гибели. В этих экспериментах C12-G+ уничтожал все *Daphnia magna* при ~ 1 мкг/мл, тогда как C18-TMA+ и C18-DMS+ при такой концентрации оказывали небольшой эффект. Большие количества обоих C18 SACC в конечном итоге уничтожали *Daphnia magna*, причем C18-TMA+ был в 1,8 раза более токсичным, чем C18-DMS+. Однако оба C18-алкильных катиона были в ~ 5-8 раз менее токсичными, чем C12-G+ (как показано в табл. 1 на фиг. 1).

Подводя итоги, эксперименты по токсичности показали, что C18-TMA+ и C18-DMS+ демонстрируют низкую токсичность для культур человеческих клеток и пресноводного зоопланктона, в особенности по сравнению с C12-G+ и C12-TPP+.

Определение, ингибируют ли C18 SACC цепь митохондриального дыхания несколькими путями

Результаты описанных выше экспериментов продемонстрировали, что C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ деполаризуют внутреннюю митохондриальную мембрану в патогенных для растений и человека грибах. В клетках млекопитающих липофильный катион C12-TPP+ обеспечивает такой эффект, действуя как протонифор. Мы решили исследовать, имеют ли C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ аналогичный механизм действия в *Z. tritici*. Протонифоры повышают образование митохондриальных активных форм кислорода (mROS), которые можно обнаружить в живых клетках, используя флуоресцентный краситель дигидродиамина-123 (DHR-123). Клетки *Z. tritici* обрабатывали в течение 30 мин протонифором карбонилцианид м-хлорфенилгидразоном (CCCP), который подтвердил повышение уровней митохондриальных активных форм кислорода (далее - "mROS", англ. "mitochondrial reactive oxygen species"). Потом измеряли уровни mROS в клетках, обработанных C12-G+ и C18-TMA+. В отличие от CCCP, оба соединения снижали концентрации mROS, что позволяет предположить, что они действуют отличным от CCCP образом (фиг. 4, *Zygomycetozia tritici*). Таким образом, активность протонифора может быть уникальной в C12-TPP+.

C12-G+ и C18-TMA+ существенно снижали mROS в клетках *Z. tritici* (фиг. 4). Аналогичное снижение mROS было обнаружено для обработанных C18-TMA+ клеток патогенного для человека гриба *S. glabrata* (фиг. 4). Основным сайтом образования mROS в митохондриях является дыхательный комплекс I, и в меньшей мере - дыхательный комплекс III. Использовали специфический ингибитор комплекса I ротинон и антимицин А, чтобы блокировать активность комплекса I и III, соответственно. Блокирование комплекса I снижало уровни mROS и было в 3-4 раза более эффективным, чем C12-G+ и C18-TMA+. Таким образом, оба SACC ингибируют комплекс I, но не так сильно, как ротенон. Ингибитор антимицин А блокирует связывание восстановленного кофермента Q на комплексе III и таким образом снижает mROS в клетках млекопитающих. Наблюдалось повышение mROS в обработанных антимицином А клетках *Z. tritici*. Оно было существенно снижено в присутствии C12-G+ и C18-TMA+. Таким образом, в *Z. tritici* оба SACC снижали доставку электронов посредством кофермента Q. Это свидетельствует в пользу предположения, что SACC могут влиять на ранние этапы переноса электронов во внутренней митохондриальной мембране.

Определение, индуцирует ли C18-DMS+ выработку mROS и запрограммированную гибель клеток грибов

Также определяли выработку mROS в обработанных C18-DMS+ клетках в патогенных для растений грибах *Z. tritici*, *U. maydis* и *M. oryzae* и человеческих патогенах *S. albicans* и *S. glabrata*. Неожиданно C18-DMS+ действовали отличным образом от C12-G+ и C18-TMA+, поскольку уровни mROS были в значительной степени индуцированы этим соединением во всех исследуемых грибах, как показано на фиг. 4. Хотя в *Z. tritici* этот эффект имитировал эффект CCCP, 24-часовая инкубация с CCCP снижала mROS, тогда как 24-часовая обработка C18-DMS+ индуцировала дополнительную выработку mROS. Когда клетки *Z. tritici* инкубировали с ингибитором комплекса I ротеноном, C18-DMS+ не повышал уровни mROS. Таким образом, вероятно, что C18-DMS+ индуцирует выработку mROS в дыхательном комплексе I. После этого исследовали важность длины алкильной цепи для способности C18-DMS+ инициировать образование mROS. В связи с этим также синтезировали катион диметилсульфония с C16-алкильной цепью (C16-DMS+). Это соединение и C12-DMS+ (смотрите выше) исследовали в отношении их способности индуцировать выработку mROS в *Z. tritici*. 30 мин инкубации с обоими SACC не повышали уровни mROS, ни при 5 мкг/мл, ни при 20 мкг/мл. Таким образом оказалось, что для того, чтобы соединения алкил-DMS+ могли индуцировать mROS, необходима более чем C16-алкильная цепь.

Увеличивающееся количество данных позволяет предположить, что грибы могут подвергаться запрограммированной гибели клеток, и считается, что mROS индуцируют этот путь. Таким образом, исследовали запрограммированную гибель клеток в клетках *Z. tritici*, обработанных C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+. Использовали флуоресцентный маркер активности каспазы CaspACE™ FITC-VAD-FMK, который позволяет выявлять апоптотическую гибель в грибах. Проводили совместное окрашивание пропидий йодидом, репортером целостности плазматической мембраны, чтобы отличить ранние апоптотические клетки от мертвых постапоптотических клеток. Через 24 ч обработки C18-DMS+ было обнаружено значительное повышение количества ранних апоптотических клеток (положительных в отношении

CaspACE™ FITC-VAD-FMK, но отрицательных в отношении пропидий йодида; показано на фиг. 5). После инкубации с C12-G+ или C18-TMA+ было обнаружено лишь несколько апоптотических клеток. Этот результат подтвердили, используя окрашивание аннексином-V-флуоресцеином открытого фосфатидилсерина в плазматической мембране ранних апоптотических клеток. Снова, связанная с мембраной флуоресценция в апоптотических клетках была обнаружена только в обработанных C18-DMS+ клетках, как показано на фиг. 5. Таким образом, индуцированная C18-DMS+ выработка mROS приводит к активации пути запрограммированной гибели клеток в *Z. tritici*, и очень вероятно также в других растительных и человеческих патогенах.

Определение защиты C18-DMS+ и C18-TMA+ растений против инфекции септориозной пятнистости пшеницы и пирикулярриоза риса

Как было определено выше, C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ деполаризуют митохондриальную мембрану и ингибируют синтез АТФ, тем самым отсекая "поставки энергии" в патогене. Кроме того, C18-DMS+ индуцирует выработку mROS, что приводит к окислительному повреждению митохондрий и инициирует запрограммированную гибель клеток. Исследовали повышенную защиту этого множественного механизма действия против растительных патогенов в анализах инфекции листьев. Растения пшеницы, чьи листья были предварительно обработаны всеми SACC, инокулировали путем распыления *Z. tritici* IPO323. Кроме того, исследовали способность C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ защищать листья риса против гриба пирикулярриоза риса *Magnaporthe oryzae*. Было обнаружено, что все исследованные SACC подавляли прорастание и прекращали образование аппрессория спорофитов *M. oryzae* - важных этапов развития для последующего инфицирования риса. В течение 3 ч на стеклянных слайдах конидии, обработанные контрольным растворителем, прорастали и образовывали аппрессории. Действительно, SACC ингибировали этот процесс, причем C18-TMA+ был немного эффективнее, чем C18-DMS+. Это сопровождалось митохондриальной фрагментацией, изменениями в организации внутренней мембраны и деполаризацией митохондрий. Также определяли уровни mROS в присутствии всех SACC и обнаружили, что только C18-DMS+ индуцировал выработку mROS. Эти результаты подтверждают наблюдения в *Z. tritici* и позволяют предположить, что C18-DMS+ может иметь повышенный потенциал в отношении защиты против пирикулярриоза риса. В качестве дополнительной подготовки к экспериментам по инфицированию растений, исследовали, являются ли листья пшеницы и рису чувствительными к C12-G+, C18-TMA+ или C18-DMS+. Целые растения опрыскивали до состояния "стекания с листьев" водой, содержащей небольшие количества растворителя метанола (= отрицательный контроль), 10% Твин 20 (= положительный контроль) и 1000 мкг/мл C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ в растворителе/воде, соответственно. Несмотря на эти высокие концентрации, ни один из SACC не индуцировал хлороз или некроз в листьях пшеницы или риса через 7 дней. Это демонстрирует, что ни C12-G+, ни C18-TMA+ или C18-DMS+ не являются фитотоксичными.

После этого проводили количественный анализ листьев пшеницы и риса. Различные концентрации всех 3 SACC распыляли на пшеницу и рис и оставляли растения на 24 ч перед нанесением *Z. tritici* (штамм IPO323) и *M. oryzae* (штамм Guy11), и количественно оценивали появление связанных с заболеванием поражений/симптомов. В контрольных экспериментах *Z. tritici* образовывал темные пятна на хлоротических листьях через 21 день, что представляет меланизированную пикниду, симптоматическую для септориозной пятнистости пшеницы. Инфекция *M. oryzae* приводила к образованию коричневых связанных с заболеванием поражений через 4 дня инкубации. Развитие симптомов ингибировалось, когда листья обеих культур были обработаны C12-G+, C18-TMA+ или C18-DMS+. Этот защитный эффект зависел от концентрации. Даже при высоких концентрациях C12-G+ полностью не подавлял инфекцию *Z. tritici* или *M. oryzae*, а C18-TMA+ полностью не защищал от септориозной пятнистости пшеницы и пирикулярриоза риса, как показано на фиг. 6. В отличие от этого, C18-DMS+ практически устранял развитие симптомов при 75 и 100 мкг/мл у пшеницы и риса и, следовательно, является исключительно полезным в качестве противогрибкового агента для защиты культур. Действительно, прямое сравнение появления симптомов заболевания при высоких концентрациях выявило, что C18-DMS+ значительно лучше защищает от *Z. tritici* и *M. oryzae* (как показано в табл. 1 на фиг. 1 и табл. 2 на фиг. 6).

Наблюдаемое повышение защиты растений со стороны C18-DMS+ может быть обусловлено множественным МД в грибном патогене. Однако возможно, что C18-DMS+ также индуцирует врожденную защиту в растениях, тем самым готовя растение к потенциальной атаке патогенов. Такое примирование приводит к окислительному взрыву, включая выработку пероксида водорода, который защищает растения от внедрения патогенов. Три SACC исследовали, чтобы определить, индуцируют ли они такой ранний защитный ответ растения, путем обработки листьев риса 150 мкг/мл C12-G+, C18-TMA+ и C18-DMS+ с последующим окрашиванием диаминобензидином (DAB). Этот краситель вступает в реакцию с локальным H₂O₂, что приводит к образованию красновато-коричневого осадка, который указывает на защитную реакцию растения. Листья, обработанные растворителем, практически не демонстрировали осадка DAB, тогда как обработка 15 мМ салициловой кислотой приводила к коричневому окрашиванию. Обработка C12-G+ и C18-TMA+ индуцирует небольшую выработку пероксида через 6 ч, но более сильную реакцию DAB наблюдали, когда листья опрыскивали C18-DMS+ (как показано на фиг. 7 и в табл. 1 на фиг. 1). Это позволяет предположить, что C18-DMS+ примировало растение в отношении атаки патогене-

нов, что повышает защитную активность этого SACC.

Применения и преимущества изобретения

Мы нуждаемся в новых фунгицидах для защиты наших калорийных культур от грибковых заболеваний и, таким образом, обеспечения безопасности пищевых продуктов и защиты здоровья человека/животных и экосистемы. Следовательно, задачей является разработка противогрибковых агентов, в которых объединены низкая токсичность для человека с низким влиянием на окружающую среду. Кроме того, такие химические вещества должны быть гибкими, то есть иметь механизмы действия в нескольких сайтах, которые нельзя легко преодолеть путем развития резистентности. Митохондрии являются значимыми мишенями для разработки фунгицидов, поскольку эти органеллы обеспечивают клеточный АТФ, но также контролируют гомеостаз липидов и запрограммированную гибель клеток грибов. Синтезировали новую группу SACC с длиной алкильной цепи более 16 и использовали в качестве противогрибковых агентов. В частности, два SACC, C18-TMA+ и C18-DMS+ объединяют в себе противогрибковую активность с относительно низкой токсичностью для людей, *Daphnia magna* и растений. C18-DMS+, в частности, демонстрирует низкую токсичность и борется с грибковыми патогенами несколькими путями, а именно: (i) ингибируя окислительное фосфорилирование, (ii) индуцируя повреждающие mROS, (iii) инициируя апоптоз грибов и (iv) примируя защиту растения.

Катионы с одной алкильной цепью нацелены на растительные митохондрии. Липофильные катионы давно известны благодаря своей антибактериальной токсичности и недавно получили признание в качестве противогрибковых соединений в медицинских применениях. К биоцидным катионам относятся SACC, в которых объединены катионная головная группа и длинная n-алкильная цепь. Эта простая амфипатическая организация позволяет предположить, что SACC встраиваются в мембраны. Действительно, многочисленные исследования показывают, что SACC, такие как СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) или C12-G+ (додецилгуанидиний, также известный как додин), изменяют проницаемость или функцию плазматической мембраны. Перед тем, как SACC достигнут плазматической мембраны, они должны пересечь клеточную стенку гриба. Во время этого прохождения они могут менять поверхностный заряд стенки гриба, что было описано как первичный эффект, лежащий в основе токсичности этих соединений для грибов. Таким образом, считается, что противогрибковые липидные катионы, включая SACC, действуют на поверхности стенки гриба, что отражено в названии "катионные поверхностно-активные вещества".

Однако многочисленные результаты противоречат этому предположительному МД в грибах. Первые сообщения по механизму действия додина показали, что в высоких концентрациях этот фунгицид пермеабилзирует плазматическую мембрану, но клетки грибов были уже мертвыми. В других сообщениях было высказано предположение, что додин ингибирует метаболические ферменты, позволяя предположить, что липофильный катион пересекает плазматическую мембрану и оказывает свой основной токсичный для гриба эффект внутри клетки гриба. После того, как они оказываются за плазматической мембраной, положительно заряженные SACC вероятно накапливаются в отрицательно заряженном митохондриальном матриксе, где они встраиваются во внутреннюю митохондриальную мембрану. Результаты, подробно описанные в данном документе, свидетельствуют в пользу этой концепции. Хотя высокие концентрации C12-G+ влияют на плазматическую мембрану гриба (EC₅₀ ~ 20-50 мкг/мл в *Z. tritici*), все исследованные SACC индуцировали митохондриальную фрагментацию и изменяли вид внутренней митохондриальной мембраны (EC₅₀ < 7 мкг/мл в *Z. tritici*). Кроме того, все 7 исследованных длинноцепочечных SACC демонстрировали более сильное ингибирование митохондриального дыхания (EC₅₀ < 2 мкг/мл в *Z. tritici*). Эти результаты были подтверждены в *U. maydis* и *M. oryzae* с использованием выбранных SACC. Таким образом, считается, что SACC нацелены на митохондрии и влияют на окислительное фосфорилирование в грибах.

Множественные эффекты катионов с одной алкильной цепью на митохондриальное дыхание

Перенос электронов через комплексы цепи митохондриального дыхания закачивает протоны во внутреннее митохондриальное пространство, оставляя матрикс отрицательно заряженным. Это пространственное разделение заряда создает протонно-движущую силу, которая используется для синтеза АТФ. SACC деполаризуют внутреннюю мембрану и, таким образом, прекращают выработку АТФ, что эффективно "отсекает" поставки энергии клетки гриба. В предыдущей работе с выделенными митохондриями было показано, что C12-TRP+ деполаризует митохондрии путем взаимодействия с отрицательно заряженными остатками жирных кислот, и это приводит к слабому расцепляющему эффекту. Таким образом, исследованные SACC могут способствовать неконтролируемому переносу протонов в митохондриальный матрикс. Однако отслеживание выработки mROS в *Z. tritici* позволило выявить, что SACC действуют отличным от протонофора CCCP образом. Кроме того, для расцепляющей активности C12TRP+ необходимы делокализованные катионные заряды, тогда как SACC несут локализованные заряды. Таким образом, C12-TRP+ может иметь уникальный эффект на грибную цепь митохондриального дыхания, что может объяснить его высокую токсичность. Однако эти результаты не могут исключить слабый расцепляющий эффект исследованных SACC.

Не ограничиваясь какой-либо теорией считается, что липофильные катионы могут ингибировать

дыхательный комплекс I и/или комплекс III в выделенных митохондриях. В грибах комплекс I дополнен грибными специфическими альтернативными дегидрогеназами. Обе восстанавливают кофермент Q, который доставляет электроны к комплексу III. В качестве побочного продукта как комплекс I, так и комплекс III вырабатывают низкие уровни mROS. C12-G+ и C18-TMA+ снижают базовые уровни mROS в *Z. tritici* и также снижают индуцированное антимицином-A образование mROS в комплексе III. Таким образом, SACC могут оказывать влияние на ранних этапах в цепи переноса электронов. Одним из возможных путей является то, что встроенные в мембрану SACC изменяют поверхностный заряд этих мембраносвязанных ферментов, тем самым препятствуя их активности. Кроме того, SACC могут изменять текучесть мембраны и тем самым препятствовать сборке и функции комплекса I, поскольку для этого необходима его диффузия через внутреннюю мембрану, и было показано, что это зависит от липидной композиции внутренней мембраны. Кроме того, липофильные катионы могут непосредственно связываться с белками дыхательных комплексов. Действительно, специфический ингибитор комплекса I 2-децил-4-хиназолинламин (DQA) непосредственно связывается с очищенным комплексом I и по прогнозам является липофильным катионом при физиологическом pH. Таким образом, влияние на ранних этапах дыхательной цепи путем ингибирования грибных альтернативных дегидрогеназ NADH и/или специфических грибных белков в комплексе I может обуславливать специфичность SACC в отношении клеток грибов.

C18-DMS+ и C18-TMA+ борются с грибковыми патогенами посредством нескольких механизмов действия.

Как показано на фигурах, наиболее эффективным SACC против *Z. tritici* является C18-DMS+. Это соединение является более токсичным для грибов и ингибирует дыхание более эффективно, чем C12-G+ (как показано в табл. 2 на фиг. 8), известный фунгицид, используемый для борьбы с патогенами фруктовых деревьев. Что важно, повышенная противогрибковая эффективность C18-DMS+ сопровождалась более низкой токсичностью для человеческих клеток и *Daphnia magna*. Хотя C18-DMS+ был менее эффективным в ингибировании окислительного фосфорилирования, чем катион четвертичного аммония C18-TMA+ (как показано в табл. 1 на фиг. 1), он эффективно защищал пшеницу и рис против грибковых патогенов значительно лучше, чем другие C12-G+ и C12-TPP+. Вероятно, что эти улучшенные защитные характеристики связаны с несколькими путями, посредством которых C18-DMS+ и C18-TMA+ "атакуют" грибковый патоген. В частности, C18-DMS+ демонстрировал подавление и уничтожение грибов посредством нескольких действий, а именно: (i) как и другие SACC, это соединение ингибирует окислительное фосфорилирование, лишая таким образом клетку гриба АТФ; (ii) оно индуцирует выработку mROS, наиболее вероятно с привлечением комплекса I, что приводит к окислительному повреждению митохондриальных липидов и белков; (iii) C18-DMS+ направляет патоген на необратимый путь запрограммированной гибели клеток; (iv) и наконец, C18-DMS+ инициирует образование пероксида водорода в растениях, что является показателем окислительного взрыва, который инициирует ранний защитный ответ растения. Таким образом, C18-DMS+ примиряет растение против атаки патогена и таким образом снижает шансы успешного инфицирования грибами.

C18-TMA+ и C18-DMS+ отличаются только своей головной группой, что позволяет предположить, что дополнительные физиологические эффекты в клетках грибов обусловлены фрагментами диметилсульфония. Ключом к физиологическому эффекту C18-DMS+ в грибах является его способность индуцировать выработку mROS. Это было обнаружено в *Z. tritici*, *M. oryzae* и *U. maydis* и, таким образом, является общим признаком C18-DMS+. Что интересно, фрагмент диметилсульфония не индуцирует mROS при присоединении к C12- или C16-алкильной цепи даже в высоких концентрациях. Этот результат демонстрирует, что длина алкильной цепи является критической для функции катионной головной группы. Это открытие является удивительным, поскольку даже немного меньшая гидрофобная C16-алкильная цепь эффективно не интегрировалась во внутреннюю митохондриальную мембрану, и только цепи длиной более C16 демонстрировали индукцию mROS.

Выводы

C18-DMS+ и C18-TMA+ оказались на удивление намного более эффективными противогрибковыми агентами, чем любые из исследованных соединений с длиной алкильной цепи C6 или C12. Оба C18-DMS+ и C18-TMA+ в целом были более эффективными (и в случае C18-DMS+ практически в отношении каждого механизма действия) против гриба пузырчатой головки кукурузы *U. maydis*, патогена септориозной пятнистости пшеницы *Z. tritici* и гриба пирикулярноза риса *M. oryzae*, чем другие исследованные SACC. Вместе исследованные патогены поражают культуры, которые обеспечивают две трети калорий в рационе человека. В табл. 1 на фиг. 1 показана улучшенная эффективность и сниженная токсичность C18-DMS+ и C18-TMA+ по сравнению с хорошо известным противогрибковым SACC-соединением додином, а в табл. 2 на фиг. 8 также показано, насколько более эффективным является C18-DMS+ по сравнению с додином.

Во-вторых, как C18-DMS+, так и C18-TMA+ нацелены на дыхательную цепь грибов за счет различных путей, причем C18-DMS+ вызывает образование mROS в дыхательном комплексе I, что ожидаемо повреждает митохондриальные белки и липиды, но также инициирует апоптоз грибов, как показано на фиг. 9.

И наконец, исследованные C18 SACC продемонстрировали относительно низкую токсичность в

культуре человеческих клеток и в *Daphnia magna* (по сравнению с известными фунгицидами SACC), причем C12-TPP+ продемонстрировал неожиданно высокую токсичность в отношении культуры человеческих клеток; тогда как C12-G+ не защищал растения от патогенов в должной степени.

Идентификация C18-DMS+ и C18-TMA+ и последующая идентификация катионов с C₁₇-C₃₂ алкильной цепью, имеющих диалкил- или триалкил-замещенные катионные фрагменты, в качестве в особенности эффективных противогрибковых агентов, которые действуют посредством ряда механизмов действия и которые имеют существенно меньшую токсичность (токсичность для человека и/или окружающей среды), чем C12-G+, демонстрирует, что соединения по изобретению и композиции по изобретению имеют огромный потенциал в качестве фунгицидов для защиты культур.

Другие применения

Благодаря своей низкой токсичности для человека и эффективности против грибов композиции C₁₇-C₃₂ SACC по изобретению можно использовать для обработки (профилактической или для улучшения) строительных и конструкционных материалов, в частности древесины, покрытий для стен (таких как обои), покрытий для полов (таких как ковры или линолеум) и в краске. Композиции SACC могут быть включены во время производства строительного или конструкционного материала, или ими можно попытаться или покрывать материал после производства.

Композиции SACC по изобретению также можно использовать в очищающих или стерилизующих композициях, как против грибов, так и против других микроорганизмов (например, оомицетов, простейших), которые можно использовать профилактически, например, для предотвращения роста патогенов на поверхности или для устранения заражения с поверхности.

Композиции SACC по изобретению можно дополнительно использовать на почве или другой среде для роста растений для уничтожения грибов, ограничения распространения грибов или контроля роста грибов. Их можно наносить любым подходящим образом, например, путем опрыскивания или распыления.

C18-DMS+, C18-TMA+ и другие композиции C₁₇+ SACC по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, в частности для местного применения для человека, отличных от человека млекопитающих и других животных.

Вышеприведенные варианты осуществления описаны исключительно в качестве примера. Возможно множество вариаций без отступления от объема изобретения, определяемого прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противогрибковая композиция, содержащая противогрибковое соединение формулы R-S⁺(R')₂-анион,

где R представляет собой октадецил;

каждый R' представляет собой метил и

анион выбран из хлорида, бромида, йодида, гидроксида, сульфата, фосфата, гидросульфата или ацетата;

и указанная противогрибковая композиция дополнительно содержит один или несколько адъювантов и/или носитель.

2. Противогрибковая композиция по п.1, отличающаяся тем, что противогрибковое соединение растворено или суспендировано в водном носителе.

3. Противогрибковая композиция по любому из предыдущих пунктов, где один или более адъювантов выбраны из смачивающих агентов, агентов, способствующих растеканию, агентов для контроля сноса, пенообразующих агентов, красителей, загустителей, агентов для нанесения (клеяких веществ), агентов для кондиционирования воды, увлажнителей, рН-буферов, обеспенивающих агентов, противовспенивающих агентов, поглотителей УФ-излучения, поверхностно-активных веществ, масляных носителей, масел для защиты культур, маслянистых концентратов для защиты культур (COC), растительных масел, метилированных масел из семян (MSO), нефтяных масел, производных силикона и азотных удобрений.

4. Противогрибковая композиция по любому из предыдущих пунктов, которая содержит один или более дополнительных противогрибковых агентов.

5. Применение противогрибковой композиции по любому из пп.1-4 для лечения грибкового заболевания на растении, части растения, семени или почве, имеющих грибковую инфекцию.

6. Применение противогрибковой композиции по п.5, отличающееся тем, что указанное противогрибковое соединение представляет собой октадецилдиметилсульфоний.

7. Применение композиции по любому из пп.1-4 в качестве противогрибкового агента на растении, части растения, семени или почве.

8. Применение по п.7, отличающееся тем, что указанное противогрибковое соединение представляет собой октадецилдиметилсульфоний.

9. Способ уничтожения, контроля или подавления гриба путем приведения гриба в контакт с противогрибковой композицией по любому из пп.1-4, причем способ включает способ защиты растения, а про-

тивогрибковую композицию наносят на растение, часть растения или семена растения, имеющего грибковую инфекцию.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что противогрибковая композиция содержит 0,1-200 мкг/мл соединения.

11. Способ по п.9 или 10, отличающийся тем, что указанное противогрибковое соединение представляет собой октадецилдиметилсульфоний.

Таблица 1. Противогрибковая активность и токсичность SACC

	C ₁₂ G ⁺	C ₁₈ TMA ⁺	C ₁₈ DMS ⁺
1. Токсичность в <i>Z. tritici</i>			
Фрагментация митохондрий*	6,64	1,55	1,72
Ингибирование дыхания*	0,32	0,14	0,25
Гибель клеток**	32,29	89,27	66,47
2. Токсичность в клетках человека			
Фрагментация митохондрий*	33,10	44,5	50,00
Ингибирование дыхания*	16,10	10,50	13,35
Относительная токсичность [‡]	50,31	75	53,4
3. Токсичность в зоопланктоне			
Гибель <i>Daphnia magna</i> [§]	0,41	2,01	3,63
Относительная токсичность [†]	13,23	179,43	241,29
4. Токсичность в растениях[‡]			
Связанные с листьями симптомы у пшеницы	>1000	>1000	>1000
Связанные с листьями симптомы у риса	>1000	>1000	>1000
4. Противогрибковая защита			
Защита от септориозной пятнистости пшеницы [§]	5,00	1,57	0,22
Защита от пирикулярноза риса	17,19	12,45	2,67
Индукция защиты растений ^{&}	14,4	6,2	64,9

*Оценочная концентрация (мкг/мл) при 50 % эффекте (EC₅₀) через 30–45 мин обработки.

**Процент мертвых клеток *Z. tritici* в жидких культурах через 25 ч инкубации при 10 пг/мл.

[‡]Доля значений EC₅₀ для ингибирования человеческого дыхания и грибного дыхания.

[§]Оценочная концентрация (мкг/мл) при 50 % неподвижных/не отвечающих водяных блох через 24 ч.

[†]Гибель в *Z. tritici*, умноженная на гибель в *Daphnia*, указывает на токсичность при такой же эффективности.

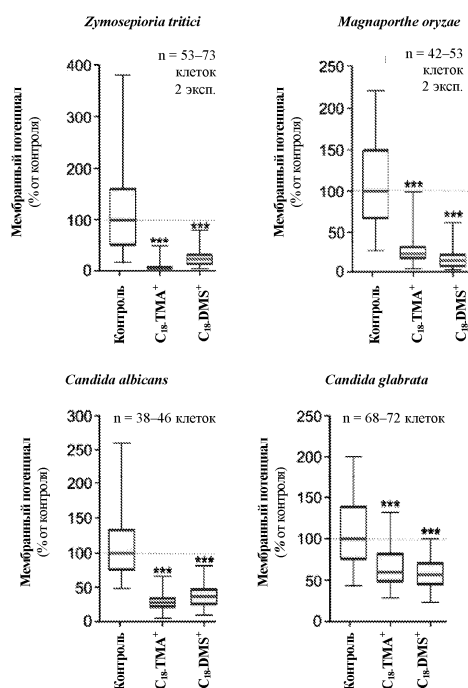
[‡]Наименьшая концентрация (пг/мл), при которой возникает хлороз через 7 дней инкубации.

[§]Средняя площадь листьев с пикнидой (%); 21-дневная пшеница, опрысканная 100 мкг/мл и инфицированная через 24 ч.

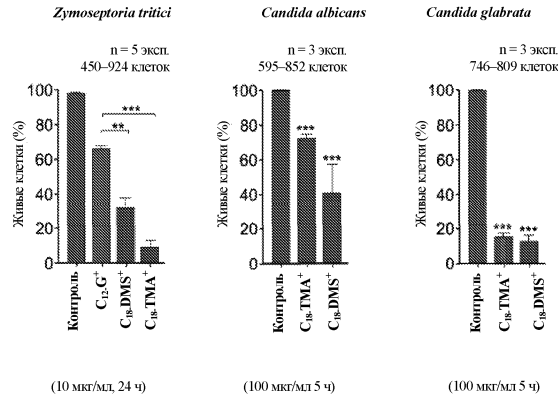
^{||}Средняя площадь поражений (%); листья 4-дневного риса, опрысканные 125 мкг/мл и инфицированные через 24 ч.

[&]ДАВ-окрашенная площадь листьев через 6 ч обработки 150 мкг/мл, приведенная в виде процента от положительного контроля.

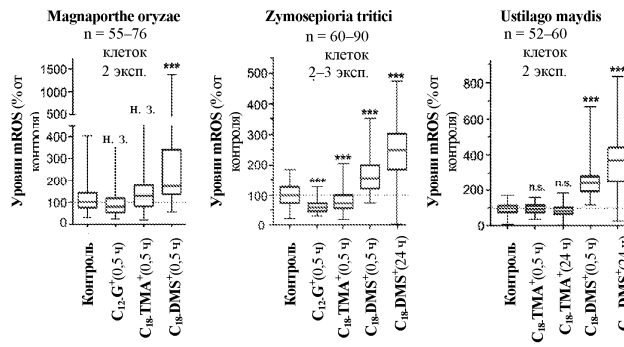
Фиг. 1



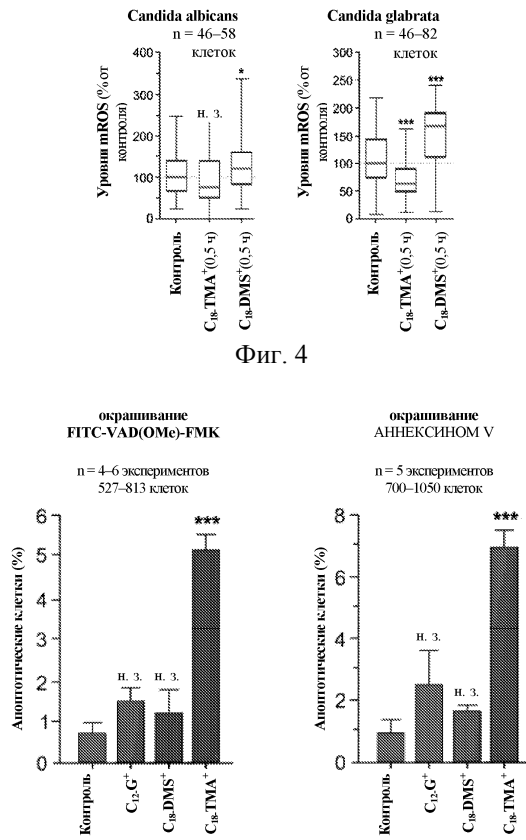
Фиг. 2



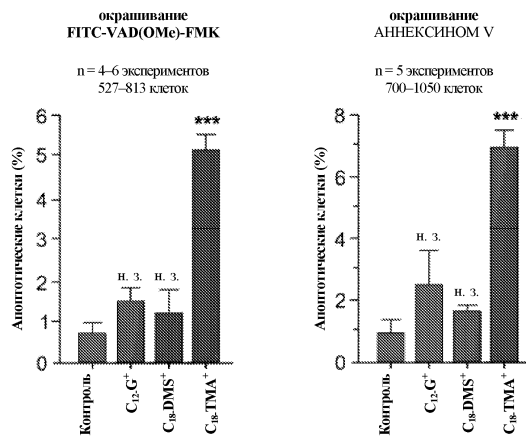
Фиг. 3



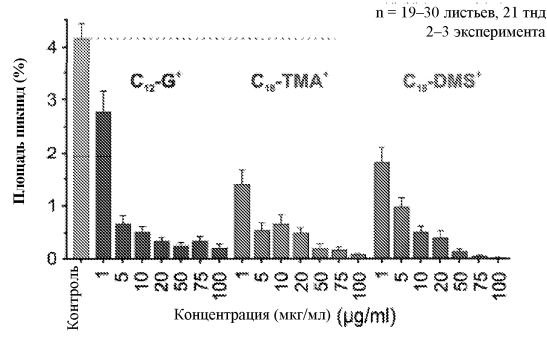
Фиг. 4



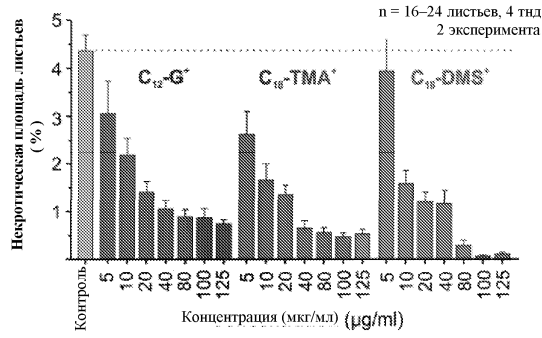
Фиг. 5



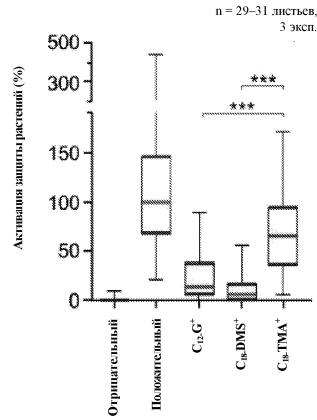
Септориозная пятнистость пшеницы



Перикулярриоз риса



Фиг. 6



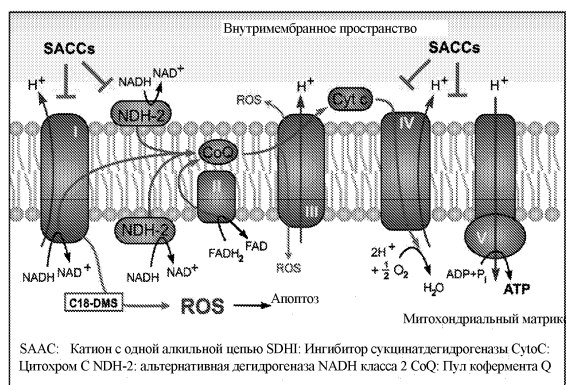
Фиг. 7

Таблица 2. Сравнение C₁₈-DMS⁺ и долина

	Кратность изменения
1. Токсичность в <i>Z. tritici</i>	
Фрагментация митохондрий	+3,9
Ингибирование дыхания	+1,3
Гибель клеток	+2,1
2. Токсичность в клетках человека	
Фрагментация митохондрий	+1,5
Ингибирование дыхания*	-1,21
Относительная токсичность	+1,06
3. Токсичность в зоопланктоне	
Гибель <i>Daphnia magna</i>	+8,9
Относительная токсичность	+18,2
4. Токсичность в растениях	
Связанные с листьями симптомы у пшеницы	Без изменений
Связанные с листьями симптомы у риса	Без изменений
5. Противогрибковая защита	
От септориозной пятнистости пшеницы	+22,7
От пирикулярриоза риса	+6,6
Индукция защиты растения	+4,5

Все значения указывают кратность изменения противогрибковой эффективности или токсичности C₁₈-DMS⁺ по сравнению с C₁₂-G⁺; значения основаны на данных, приведенных в таблице 1; улучшение эффективности указано знаком «+» и выделено жирным шрифтом; снижение эффективности указано знаком «-», значение 1 указывает на идентичную эффективность.

Фиг. 8



Фиг. 9

