



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201138799 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099143150

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/12 (2006.01)

A61K36/06 (2006.01)

A61P33/10 (2006.01)

A61P33/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/11

歐洲專利局

09178799.4

(71)申請人：拜耳動物保健有限公司 (德國) BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (DE)

德國

(72)發明人：哈爾德 阿希姆 HARDER, ACHIM (DE)；凱瑞格 克萊門 KRIEGER, KLEMENS (DE)；范 台蘭宏 PHAM, THI LAM HUONG (VN)；黃 盛登 HUYNH, THANH DAM (VN)；茲博 艾姆路特 ZASPEL, IRMTRAUT (DE)；埃瓦 迪特里希 EWALD, DIETRICH (DE)；穆格 克萊門斯 MUEGGE, CLEMENS (DE)；魏赫弗 哈德 WEISSHOFF, HARDY (DE)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：37 共 46 頁

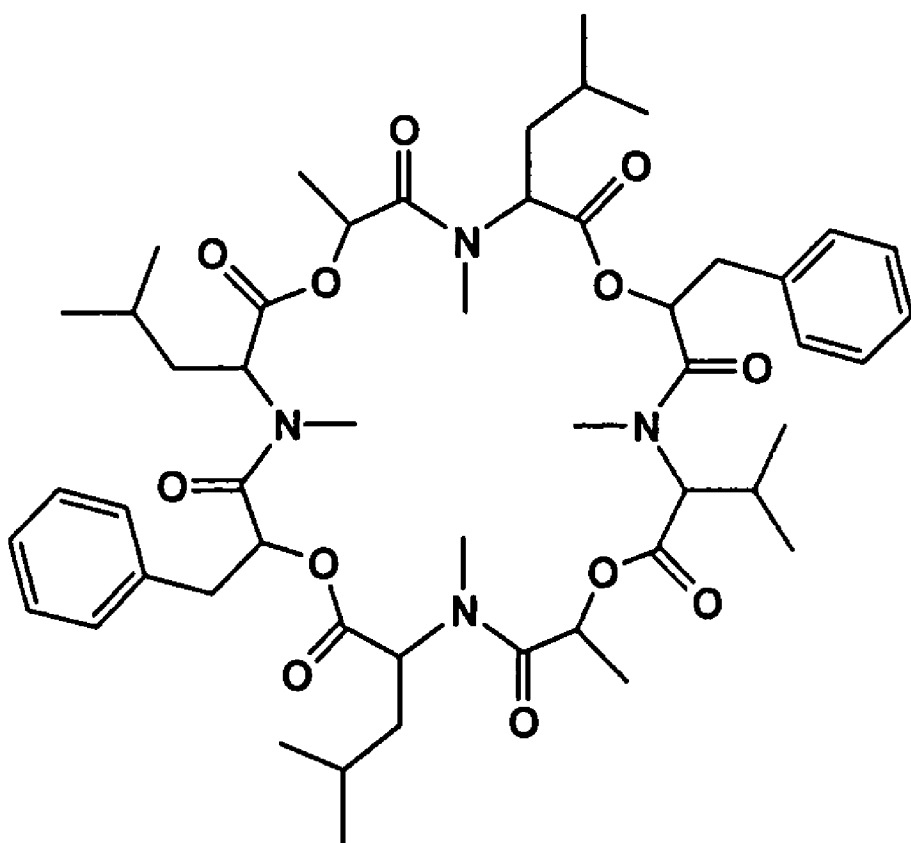
(54)名稱

來自真菌菌株之新穎 24 員環八縮酚酸肽類 (CYCLOOCTADEPSIPEPTIDES) 及其作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途

NOVEL 24-MEMBERED CYCLOOCTADEPSIPEPTIDES FROM FUNGAL STRAINS AND THEIR USE AS ANTHELMINTICS OR ENDOPARASITICIDES

(57)摘要

本發明首先乃有關先前未知之 24 員環八縮酚酸肽類 PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060(呈各種異構物型)之發現，及有關利用得自炭角菌(Xylariaceae)科家族特別是座間殼菌(Rosellinia)屬與康紐拉菌(Coniolaria)屬之真菌菌株、利用得自鐮胞菌(Fusarium)屬、白殭菌屬(Beauveria)與輪枝孢菌屬(Verticillium)[肉座菌目(Hypocreales)]與黑痣菌目(Phyllachorales)]群組之有絲分裂孢子真菌菌株、及利用自彼等真菌菌株分離之酵素製劑製備上述環八縮酚酸肽類之方法；其次係有關使用彼等菌製備上述新穎環八縮酚酸肽類之用途及有關單獨或呈混合物使用球孢白殭菌素與上述環八縮酚酸肽類作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201138799 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099143150

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/12 (2006.01)

A61K36/06 (2006.01)

A61P33/10 (2006.01)

A61P33/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/12/11

歐洲專利局

09178799.4

(71)申請人：拜耳動物保健有限公司 (德國) BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (DE)

德國

(72)發明人：哈爾德 阿希姆 HARDER, ACHIM (DE)；凱瑞格 克萊門 KRIEGER, KLEMENS (DE)；范 台蘭宏 PHAM, THI LAM HUONG (VN)；黃 盛登 HUYNH, THANH DAM (VN)；茲博 艾姆路特 ZASPEL, IRMTRAUT (DE)；埃瓦 迪特里希 EWALD, DIETRICH (DE)；穆格 克萊門斯 MUEGGE, CLEMENS (DE)；魏赫弗 哈德 WEISSHOFF, HARDY (DE)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：37 共 46 頁

(54)名稱

來自真菌菌株之新穎 24 員環八縮酚酸肽類 (CYCLOOCTADEPSIPEPTIDES) 及其作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途

NOVEL 24-MEMBERED CYCLOOCTADEPSIPEPTIDES FROM FUNGAL STRAINS AND THEIR USE AS ANTHELMINTICS OR ENDOPARASITICIDES

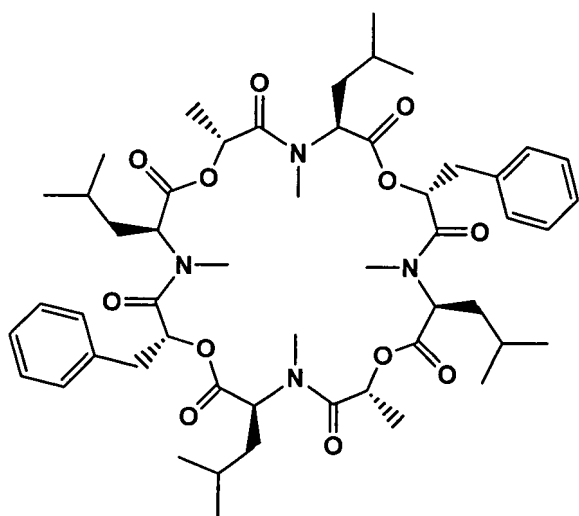
(57)摘要

本發明首先乃有關先前未知之 24 員環八縮酚酸肽類 PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060(呈各種異構物型)之發現，及有關利用得自炭角菌(Xylariaceae)科家族特別是座間殼菌(Rosellinia)屬與康紐拉菌(Coniolaria)屬之真菌菌株、利用得自鐮胞菌(Fusarium)屬、白殭菌屬(Beauveria)與輪枝孢菌屬(Verticillium)[肉座菌目(Hypocreales)]與黑痣菌目(Phyllachorales)]群組之有絲分裂孢子真菌菌株、及利用自彼等真菌菌株分離之酵素製劑製備上述環八縮酚酸肽類之方法；其次係有關使用彼等菌製備上述新穎環八縮酚酸肽類之用途及有關單獨或呈混合物使用球孢白殭菌素與上述環八縮酚酸肽類作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途。

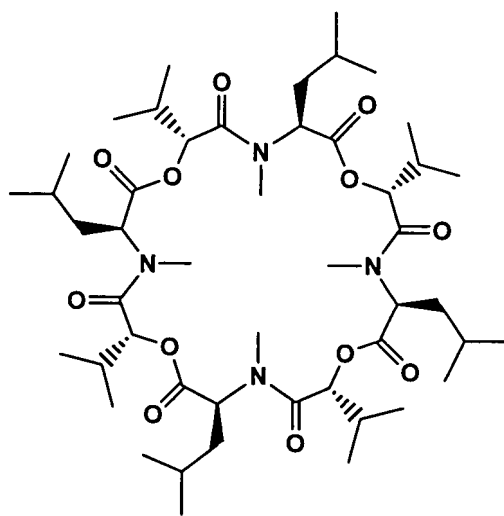
六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

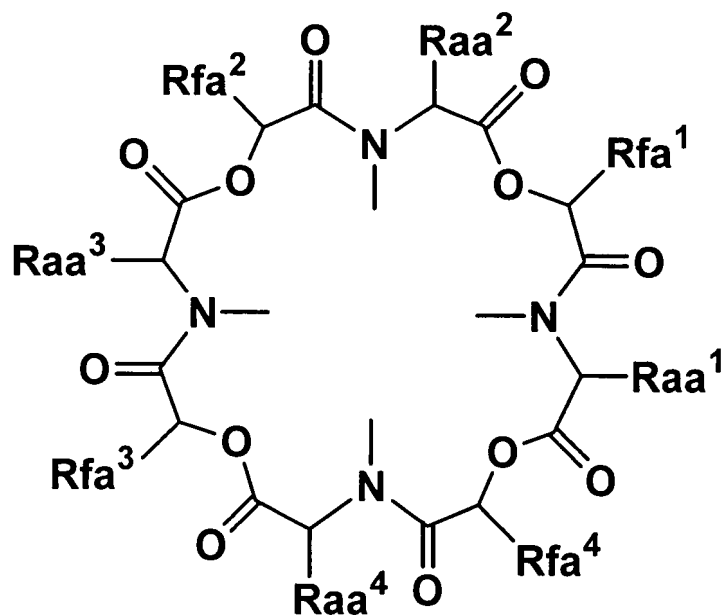
本發明首先乃有關新穎 24 員環八縮酚酸肽類(已知抗蠕蟲藥環八縮酚酸肽 PF1022-A 之先前未知之衍生物 PF1022-V 與 PF1022-W 及已知環八縮酚酸肽球孢白殭菌素(bassianolide)之先前未知之衍生物 XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060)之發現，及利用得自炭角菌(*Xylariaceae*)科家族特別是座間殼菌(*Rosellinia*)屬與康紐拉菌(*Coniolaria*)屬之真菌菌株、利用得自鐮胞菌(*Fusarium*)屬、白殭菌屬(*Beauveria*)與輪枝孢菌屬(*Verticillium*)[肉座菌目(*Hypocreales*)]與黑痣菌目(*Phyllachorales*)]群組之有絲分裂真菌菌株、及利用自彼等真菌菌株分離之酵素製劑製備上述環八縮酚酸肽類之方法；其次係有關單獨或呈混合物使用球孢白殭菌素與上述環八縮酚酸肽類作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途。



式 I：PF1022-A (1)



式 II：球孢白殭菌素(2)



式 III：具 24 個環原子之新穎環八縮酚酸肽類之基本結構
(Raa:胺基酸殘基；Rfa:脂肪酸殘基；Raa 與 Rfa:見表 1)

表 1：新穎 24 員環八縮酚酸肽類之胺基酸殘基(Raa)與脂肪酸殘基(Rfa) (Nos. 3 至 17)

化 合 物 編 號	名 稱	Raa ¹	Rfa ¹	Raa ²	Rfa ²	Raa ³	Rfa ³	Raa ⁴	Rfa ⁴
1	PF1022-A	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅
2	球孢白殭菌素	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
3	PF1022-V ⁽¹⁾	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅
4	PF1022-W	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅
5	XRB-C894	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
6	XRB-C942	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
7	XRB-C976 ⁽¹⁾	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
8	XRB-C1010 ⁽¹⁾	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
9	XRB-C1044 ⁽²⁾	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂

化 合 物 編 號	名 稱	Raa ¹	Rfa ¹	Raa ²	Rfa ²	Raa ³	Rfa ³	Raa ⁴	Rfa ⁴
10	XRB-E922	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-C ₄ H ₉	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
11	XRB-E956 ⁽¹⁾	-CH ₂ C ₆ H ₅	-C ₄ H ₉	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
12	XRB-E990 ⁽¹⁾	-CH ₂ C ₆ H ₅	-C ₄ H ₉	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
13	XRB-E1024 ^(1,2)	-CH ₂ C ₆ H ₅	-C ₄ H ₉	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
14	XRB-S958	-(CH ₂) ₂ SO ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
15	XRB-S992 ⁽¹⁾	-(CH ₂) ₂ SO ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
16	XRB-S1026 ^(1,2)	-(CH ₂) ₂ SO ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂
17	XRB-S1060 ⁽²⁾	-(CH ₂) ₂ SO ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₂ C ₆ H ₅	-CH(CH ₃) ₂

(1) 包括各種結構異構物 (2) 在極低濃度下發生

【 先前技術 】

PF1022A (見式 I)顯著地適用於控制尤其是人類及獸醫醫學領域中之內寄生蟲。此具 24 個環原子之環八縮酚酸肽類及其作為殺內寄生蟲劑之用途已為先前專利申請案 (US005571793A)之主題。

球孢白殭菌素(見式 II)已知為具殺蟲活性之抗生素 (Kanaoka, M. *et al.*, Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*; Agric. Biol. Chem. **42** (1978), 629-635)。已存在一系列用於製備具 24 個環原子之環狀、含 D-2-羥基異戊酸之縮酚酸肽類之化學及微生物方法(例如利用合成方法，參照：Ohyama M. *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem. **58** (1994) p. 1193-1194; Scherkenbeck J. *et al.* Tetrahedron **51** (1995) p. 8459-8470; Kobayashi M. *et al.* Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. **46** (1994) p. 67-75; Lee B. *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. **12** (2002) p. 353-356; Dutton FE *et al.* J. Antibiot. **47** (1994) p. 1322-1327)。

【 發明內容 】

本發明乃有關先前未知之呈各種異構型之 24 員環八縮酚酸肽類(PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026, XRB-S1060)(見式 III、表 1 及圖 3

至 37)之發現，及有關利用得自炭角菌科家族之真菌菌株特別是座間殼菌屬與康紐拉菌屬(得自彼等代表性菌株之子實體及另外的炭角菌科在闊葉樹與針葉樹枯木上之子實體、或購自經由多重篩選之菌株收集所之已知菌株)、及得自鐮胞菌屬、白殭菌屬與輪枝孢菌屬(肉座菌目與黑痣菌目)群組之有絲分裂孢子真菌菌株、及自上述彼等真菌菌株分離之酵素製劑製備上述環八縮酚酸肽類之方法。

作為新穎 24 員環八縮酚酸肽類有效生產菌之真菌菌株或真菌株系之產生或分離之說明：

本發明乃有關利用得自炭角菌科家族之真菌菌株，尤其是座間殼菌屬及康紐拉菌屬(其中有數個真菌株系能產生環八縮酚酸肽類)，以製備呈各種異構型之新穎 24 員環八縮酚酸肽類(PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060)。

得自炭角菌科家族之真菌菌株，特別是座間殼菌(*Rosellinia*)屬，乃購自不同菌株收集所，以用於發現新穎之環八縮酚酸肽生產菌。為了獲得有效環八縮酚酸肽生產菌之適當真菌株系，乃利用多重篩選法改良上述真菌菌株之環八縮酚酸肽產量。再者，新分離菌係得自座間殼菌屬與康紐拉菌屬之子實體及其他炭角菌科在不同闊葉樹及針葉樹品種枯木上之子實體，從彼等新分離株再針對其環八縮酚酸肽產量篩選後獲得新穎株系。得自肉座菌目與黑痣菌

目，特別是鐮胞菌屬、白殭菌屬與輪枝孢菌屬之各種有絲分裂孢子真菌，可能呈伴隨生物存在，彼等同樣能生產環八縮酚酸肽類。

真菌菌株中，座間殼菌屬之隱藏座間殼(*Rosellinia abscondita*)(CBS 447.89、CBS 448.89、CBS 450.89)、英國座間殼(*R. britannica*)(CBS 446.89)、*R. mammaeformis* (CBS 445.89)、*R. millegrana* (CBS 111.75)、鮮殼孢座間殼(*R. nectrioides*)(CBS 449.89)、白紋羽病菌 [*R. necatrix* (CBS 267.30)]、團炭角菌 [*Xylaria hypoxylon* (CBS 499.80)]，於1930、1975 或 1989 年(根據 CBS 編碼)寄存於荷蘭 CBS 菌種保存中心(Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences)，且自該中心獲得呈培養物之形式。株系 XR-909、XR-912、XR-913、XR-916 與 XR-917，其因生長習性及生產環八縮酚酸肽類能力而在培養上與原始菌種不同，係從彼等 CBS 真菌菌株於 mSeed 培養基上重複篩選後獲得。菌絲發展特性與特定環八縮酚酸肽類之生產有關連。其他真菌菌株則從自然界中分離。

座間殼菌屬是炭角菌科家族中普遍存在之真菌菌種，屬於龐大之炭角菌(*Xylariales*)目[子囊菌(*Ascomycota*)門]。

座間殼菌屬之代表性菌種於北半球溫帶微冷地區之闊葉及針葉樹樹皮上尋得；彼等主要腐生於已處降解過程之老木或枯木或草本植株上；具有獨特之球狀堅硬子實體，所謂具小孔之子囊殼(perithecia)，於其中發育出具品種代表

性的孢子之子囊；子囊之特徵為具品種代表性之立方體或長方形頂尖裝置，用以彈射成熟孢子；座間殼菌屬之孢子具有品種代表性之萌芽狹縫。

隱藏座間殼之孢子呈淺褐色，大小介於 16~24 x 5.5~8.5 微米間；萌芽狹縫常常位於孢子表面對角；孢子柱具有黏液鞘。英國座間殼之孢子大小介於 22~27 x 7~9 微米間，呈褐色且具有黏液鞘。座間殼菌屬之 *R. mammaeformis* 之孢子大小介於 17~21 x 6~7 微米間，呈褐色帶著暗色末端。鮮殼孢座間殼與隱藏座間殼很相似，子囊孢子同樣為淺褐色，惟無附屬物或黏液鞘。

彼等品種之子囊殼通常嵌入深褐色至黑色之菌絲層(厚層菌絲)中；菌絲從菌絲層生長至樹皮組織及其下層。各個品種對自然條件下之環境條件要求很高；子囊殼於暖冬及年初幾個月成熟。一般而言，上述座間殼菌屬品種較罕見。

康紐拉菌屬係將先前被分類為座間殼菌屬、曾被分類屬於此屬之各種品種重新命名(Checa *et al.* (2008) Mycol. Res. 112, 7, 795-801)。

從自然棲息地獲得純種培養：純種培養(得自座間殼菌屬、康紐拉菌屬及另外的炭角菌科在闊葉樹及針葉樹枯木上之子實體)係得自從枯木移取且儘可能分離之成熟、完整之子囊殼；以 0.05%強度之 AgNO_3 溶液進行表面殺菌，並以無菌水重複沖洗；於玻璃載玻片上將子囊殼小心壓碎，釋出之子囊及孢子移至含無菌水之試管中。

利用顯微鏡觀察，可估計孢子生成之密度及成熟階段；若孢子密度高，將孢子懸浮液稀釋 10 倍，取 100 微升各個稀釋階段樣品於麥芽萃取物瓊脂(MEA)平板培養基上培養；將平板貯存於 18 至 20°C，於顯微鏡下每天計數，將萌芽孢子移至新鮮馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(PDA)上；於此培養基上長出之菌絲為白色、平坦且細長；無氣生菌絲形成。

除炭角菌科之代表菌外，使分類屬於尤其是鐮胞菌屬、輪枝孢菌屬與白殭菌屬群組之各種有絲分裂真菌於不同密度下生長；同樣建立彼等之純種培養。

待培養物充分生長(菌落大小約 85 毫米)後，以甲醇萃取菌絲。利用 LC-PDA-ESI-Q-TOF-MS 及 -MS/MS 鑑定菌絲萃取物組成分；找到已證實有關生產 24 員環八縮酚酸肽類為陽性之各種座間殼菌屬及康紐拉菌屬株系，特別是 PF1022-A (見專利案 BHC 08 8 004、16.12.2008)及其衍生物 PF1022-V 與 PF1022-W；包括例如 XR-21 菌株(得自闊葉樹木之座間殼菌屬之 *Rosellinia corticum*)。

由於本發明培養物是分離株，已從自然生態系直接移轉到人為條件下，因此可能出現發育成不同菌絲形態及活性物質生產強度變化之培養形式；此為利用多重篩選法改良所得分離菌株以搜尋環八縮酚酸肽生產菌株之因。

根據環八縮酚酸肽含量、細胞生長及菌絲形態進行挑選，以進一步繁殖真菌株系；多重篩選及轉接以產生具有典型菌絲形態、更快速生長及較佳環八縮酚酸肽生產能力

之真菌株系。

真菌株系生長分析：炭角菌科真菌株系在麥芽萃取物瓊脂(MEA)、馬鈴薯葡萄糖瓊脂(PDA)、玉米粉瓊脂(CMA)或 mSeed 瓊脂上之培養有生長緩慢且高度溫度依賴性之傾向；於彼等培養基上形成白色平坦細長菌絲，若干情形下亦呈現絲狀菌絲。

對照於原始培養物，只形成少量氣生菌絲；僅於較老的培養物形成白細氈狀表面，而於瓊脂中形成暗色之似皮革層。株系 XR-909 則例外，即使在表面，菌絲顏色也相當迅速地變成暗灰褐色。

株系 XR-916 於 15°C 展現最高生長速率，15 天後，MEA 上之菌落大小達 85 毫米，而 PDA 上之菌落大小達 70 毫米。於彼等條件下，株系 XR-909 在 MEA 上之生長量達 62 毫米，在 PDA 上達 52 毫米。株系 XR-913 在 PDA 上顯示 85 毫米之生長直徑，在 MEA 上生長直徑 68 毫米。株系 XR-917 在此二培養基上展現相同之生長，菌落大小皆達 85 毫米。

於 21°C，新獲得株系之生長較差；15 天後，株系 XR-916 於 PDA 上達 46 毫米，於 MEA 上達 51 毫米。其間，株系 XR-909 於 PDA 上達 45 毫米，於 MEA 上達 50 毫米。其他株系於 21°C 在此二培養基上菌落大小皆為 85 毫米。

於 27°C，新獲得株系停止生長，只有株系 XR-913 於 15 天後，在 PDA 上之直徑達 52 毫米，MEA 上達 42 毫米。

若干株系，例如 XR-916，於瓊脂中形成可於顯微鏡下

察覺到之深色泡囊。炭角菌科對應不完全階段之孢子或分生孢子於培養中之發育相當罕見。

鐮胞菌屬與輪枝孢菌屬分離株於溫度 22°C 與 25°C 間及白殭菌屬分離株於 20°C 顯現良好生長(在 mSeed 培養基上)。

使用培養基組成：

MEA：麥芽萃取物 17 克/公升、瓊脂 15 克/公升

PDA：葡萄糖 5 克/公升、馬鈴薯澱粉 20 克/公升、瓊脂 15 克/公升

CMA：玉米粉 50 克/公升、瓊脂 15 克/公升

mSeed 瓊脂：藥用培養基(Pharmamedia) 20 克/公升、大豆蛋白胨 2 克/公升、麥芽糖 40 克/公升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 克/公升、 NaCl 2 克/公升、 CaCO_3 3 克/公升、瓊脂 15 克/公升。

【實施方式】

新穎 24 員環八縮酚酸肽類之分離及鑑定之說明：

欲快速鑑定組成分，首先利用 LC-PDA-ESI-Q-TOF-MS 分析得自 CBS 真菌菌株(CBS 111.75、CBS 267.30、CBS 445.89、CBS 446.89、CBS 447.89、CBS 448.89、CBS 449.89、CBS 450.89、CBS 499.80)與新獲得株系或分離株(XR-909、XR-913、XR-916、XR-917、XR-21 等)、以及得自鐮胞菌屬、輪枝孢菌屬與白殭菌屬群組之另外真菌菌株之甲醇菌絲萃取物。

針對組成分鑑定之詳細研究係利用於水溶液及重氫溶劑(H/D 交換實驗)中之 LC-ESI-Q-TOF-MS/MS 及-假 MS³ 進行。利用上述 MS 技術鑑定出上述真菌菌株菌絲萃取物中之許多已知、惟亦為新穎之環四、環六、環八、及環十縮酚酸肽類。

上述 CBS 真菌菌株雖已於 1930 及 1989 年間寄存於 CBS 菌種保存中心，惟迄今為止，關於從彼等菌株發現環縮酚酸肽類，仍無數據資料公告。此為首次發現得自座間殼菌屬菌株之球孢白殭菌素。

為了分離新穎 24 員環八縮酚酸肽類供生物試驗用，乃從瓊脂平板培養盤上獲取細胞材料並以甲醇萃取。真空濃縮甲醇萃取物至不含甲醇，再以乙酸乙酯重複萃取。真空濃縮乙酸乙酯萃取物至不含乙酸乙酯，然後冷凍乾燥至不含水，接著利用管柱層析法(矽膠 60，正己烷/乙酸乙酯/甲醇)分離為粗區分。利用製備 HPLC 進行分離，從粗區分得到環八縮酚酸肽類。

利用 1D-及 2D-NMR 光譜法(¹H、¹³C、DEPT、HMQC、HMBC、COSY、NOESY...)進行新穎之主要環八縮酚酸肽類之詳細結構說明。

從上述 CBS 真菌菌株及新獲得株系或分離株(XR-21、XR-909、XR-913、XR-916、XR-917)鑑定、部分分離及測試新穎之 24 員環八縮酚酸肽類(PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、

XRB-E1024 、 XRB-S958 、 XRB-S992 、 XRB-S1026 、 XRB-S1060) (呈混合物以及單獨存在二者)。

由於旋毛蟲屬(*Trichinella*)及鉤蟲屬(*Nippostrongylus*)之活體外試驗之確定結果，乃據此申請單獨或呈混合物使用上述新穎 24 員環八縮酚酸肽類(呈各種異構型)作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途之專利權。

分析數據：

1. 分離及鑑定之操作條件

1.1. 利用管柱層析法之菌株 XR-916 萃取物之粗分離：

試樣大小：	乾燥之乙酸乙酯萃取物 5 克
分離材料：	矽膠 60 (15 至 40 微米，Merck) 30 克
管柱尺寸：	20 公分×2 公分
流速：	2 毫升/分鐘
區分容積：	50 毫升
<u>移動相：</u>	
區分 1 - 2：	正己烷/乙酸乙酯：2/1
區分 3 - 4：	正己烷/乙酸乙酯：1/1
區分 5 - 6：	正己烷/乙酸乙酯：1/2
區分 7 - 8：	正己烷/乙酸乙酯：1/3
區分 9 - 10：	正己烷/乙酸乙酯：1/4
區分 11 - 12：	正己烷/乙酸乙酯：1/9
區分 13 - 14：	乙酸乙酯

區分 15 - 16 : 乙酸乙酯/甲醇 : 98/2

區分 17 - 18 : 乙酸乙酯/甲醇 : 95/5

區分 19 - 20 : 乙酸乙酯/甲醇 : 90/10

區分 21 - 22 : 乙酸乙酯/甲醇 : 85/15

區分 23 - 26 : 乙酸乙酯/甲醇 : 80/20

區分組成分 :

區分 2 - 4 : 球孢白殭菌素、XRB-C894、-C942 與 -C976、XRB-D-與-E 環八縮酚酸肽類、XRB-F 環十縮酚酸肽類

區分 5 - 7 : XRB-C942、XRB-C976、XRB-B 環六縮酚酸肽類

區分 8 - 16 : XRB-C976、-C1010 與 -C1044、XRB-A 直鏈肽類、XRB-B 肽類

區分 17 - 25 : 恩鑣孢菌素(enniatin) C、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060

1.2. 利用 HPLC 之菌株 XR-916 粗區分之群組分離 :

HPLC 管柱 : Luna C5 (5 微米 , 250 x 4.6 毫米)

溶析液 A : 水(0.1% HCOOH)

溶析液 B : 甲醇(0.1% HCOOH)

溶析液 C : 乙腈(0.1% HCOOH)

HPLC 條件 :

時間	A	B	C	曲線	流速
0 分鐘	25	65	10	1	1 毫升/分鐘

33 分鐘	20	65	15	6	1 毫升/分鐘
34 分鐘	5	65	30	1	1 毫升/分鐘
38 分鐘	5	65	30	1	1 毫升/分鐘
39 分鐘	25	65	10	1	1 毫升/分鐘
45 分鐘	25	65	10	1	1 毫升/分鐘

管柱溫度： 40°C

注入量： 15 微升

PDA 檢測器： 210 至 400 奈米

區分： 20 秒/區分 x 120 區分
(等候時間：1.75 分鐘)

結果：

R_t 10 至 20 分鐘之區分： XRB-S、-A、-B 群組之環-及直
鏈縮酚酸肽類

R_t 20 至 35 分鐘之區分： XRB-C、-D、-E 與 -F 群組之環
縮酚酸肽類

1.3. 利用 HPLC 之菌株 XR-916 之縮酚酸肽類之細微分離

1.3.1. 極性縮酚酸肽類(R_t 10 至 20 分鐘之區分)之分離條件：

HPLC 管柱： Luna C5 (5 微米，250 x 4.6 毫米)

溶析液 A： 水(0.1% HCOOH)

溶析液 B： 乙腈(0.1% HCOOH)

HPLC 條件： 等位(A / B : 33 / 67)

流動時間： 45 分鐘

流速：	0.6 毫升/分鐘
管柱溫度：	40°C
注入量：	10 微升
PDA 檢測器：	210 至 400 奈米
區分：	18 秒/區分 x 120 區分 (等候時間：15 分鐘)
R _t 19.8 至 20.5 分鐘：	直鏈縮酚酸肽 XRB-A767 (C ₄₂ H ₆₁ N ₃ O ₁₀ , [M+H] ⁺ m/z 768.4435)
R _t 21.3 至 22.5 分鐘：	直鏈縮酚酸肽 XRB-A733 (C ₃₉ H ₆₃ N ₃ O ₁₀ , [M+H] ⁺ m/z 734.4592)
R _t 23.1 至 24.9 分鐘：	直鏈縮酚酸肽 XRB-A699 (C ₃₆ H ₆₅ N ₃ O ₁₀ , [M+H] ⁺ m/z 700.4748)
R _t 31.8 至 32.7 分鐘：	XRB-S992
R _t 33.3 至 35.4 分鐘：	XRB-S958
R _t 37.8 至 40.2 分鐘：	恩鐮孢菌素 C (C ₃₆ H ₆₃ N ₃ O ₉ , [M+H] ⁺ m/z 682.4643)

1.3.2.環八縮酚酸肽類 (R_t 20 至 35 分鐘之區)之分離條件：

HPLC 管柱：	Luna C5 (5 微米, 250 x 4.6 毫米)
溶析液 A：	水(0.1% HCOOH)
溶析液 B：	乙腈(0.1% HCOOH)
HPLC 條件：	等位(A / B : 25 / 75)
流動時間：	25 分鐘

流速：	1 毫升/分鐘
管柱溫度：	40°C
注入量：	10 微升
PDA 檢測器：	210 至 400 奈米
區分：	18 秒/區分 x 120 區分 (等候時間：2 分鐘)
R _t 15.8 至 16.5 分鐘：	XRB-C1044
R _t 17.3 至 18.3 分鐘：	XRB-C1010
R _t 19.3 至 20.8 分鐘：	XRB-C976
R _t 22 至 23.5 分鐘：	XRB-C942

1.4. LC-MS、-MS/MS 與 -MS-H/D 交換實驗之條件

1.4.1. 用於菌株 XR-21 之 LC-MS 及 -MS/MS 實驗之條件

HPLC 管柱：	GeminiNX C18 (3 微米，150 x 2 毫米)
溶析液 A：	水/乙腈：9 / 1 (0.1% HCOOH)
溶析液 B：	乙腈(0.1% HCOOH)

HPLC 條件：

時間	A	B	曲線	流速
0 分鐘	40	60	1	0.25 毫升/分鐘
36 分鐘	20	80	6	0.25 毫升/分鐘
37 分鐘	5	95	1	0.35 毫升/分鐘
42 分鐘	5	95	1	0.35 毫升/分鐘
43 分鐘	40	60	1	0.25 毫升/分鐘

50 分鐘 40 60 1 0.25 毫升/分鐘
管柱溫度： 40°C
注入量： 5 微升
PDA 檢測器： 210 至 400 奈米
MS 檢測器： ESI-Q-TOF-MS (全掃描，*m/z* 130 至 2000)

1.4.2.用於菌株 XR-916 之 LC-MS 及 -MS/MS 實驗之條件：

HPLC 管柱： GeminiNX C18 (3 微米，150 x 2 毫米)
溶析液 A： 水/乙腈：9 / 1 (0.1% HCOOH)
溶析液 B： 乙腈(0.1% HCOOH)

HPLC 條件：

時間	A	B	曲線	流速
0 分鐘	40	60	1	0.2 毫升/分鐘
105 分鐘	38	62	6	0.2 毫升/分鐘
108 分鐘	25	75	6	0.35 毫升/分鐘
140 分鐘	5	95	1	0.35 毫升/分鐘
143 分鐘	5	95	1	0.35 毫升/分鐘
144 分鐘	40	60	1	0.35 毫升/分鐘
150 分鐘	40	60	1	0.35 毫升/分鐘
管柱溫度：	40°C			
注入量：	10 微升			
PDA 檢測器：	210 至 400 奈米			

MS 檢測器： ESI-Q-TOF-MS (全掃描， m/z 130 至 2000)

1.4.3. LC-MS-H/D 交換實驗之條件：

HPLC 管柱： GeminiNX C18 (3 微米，150 x 2 毫米)

溶析液 A： D_2O (0.1% DCOOD)

溶析液 B： 乙腈(0.1% DCOOD)

HPLC 條件：

時間	A	B	曲線	流速
0 分鐘	35	65	1	0.2 毫升/分鐘
80 分鐘	32	68	6	0.2 毫升/分鐘
87 分鐘	5	95	1	0.2 毫升/分鐘
92 分鐘	5	95	1	0.2 毫升/分鐘
93 分鐘	35	65	1	0.2 毫升/分鐘
100 分鐘	35	65	1	0.2 毫升/分鐘

管柱溫度： $40^{\circ}C$

注入量： 10 微升

PDA 檢測器： 210 至 400 奈米

MS 檢測器： ESI-Q-TOF-MS (全掃描， m/z 130 至 1600)

2. 具 24 個環原子之環八縮酚酸肽類之分析數據

2.1. PF1022-A(1)、PF1022-V(3)與 PF1022-W(4)之分析數據

2.1.1. PF1022-A (1)

實驗式： $C_{52}H_{76}N_4O_{12}$

精確質量： 948.5460

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值：949.5540；計算值：949.5538

m/z 之 ESI-MS/MS 949.6 ($R_t = 23.6$ 分鐘，碰撞能量：25, 40, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (45), 140.1 (10), 172.1 (25), 182.1 (72), 200.1 (55), 216.1 (5), 230.1 (<5), 248.1 (23), 258.1 (100), 276.1 (55), 348.2 (18), 475.3 (19), 493.3 (5), 547.3 (<5), 595.4 (<5), 620.3 (<5), 674.4 (5), 750.4 (5), 768.5 (<5), 822.5 (<5), 949.6 (15)。

2.1.2. PF1022-V (3)

實驗式： $C_{51}H_{74}N_4O_{12}$

精確質量： 934.5303

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值：935.5390；計算值：935.5382

m/z 之 ESI-MS/MS 935.5 ($R_t = 23.4$ 分鐘，碰撞能量：25, 40, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 86.1 (48), 100.1 (80), 140.1 (18), 154.1 (10), 172.1 (40), 182.1 (68), 200.1 (75), 218.1 (10), 230.1 (6), 248.1 (22), 258.1 (100), 276.1 (51), 285.1 (30), 313.2 (30), 348.2 (22), 388.2 (15), 445.3 (12), 460.3 (15), 475.3 (20), 587.4 (18), 662.4 (15), 738.4 (22), 919.5 (55), 937.5 (70)。

2.1.3. PF1022-W (4)

實驗式： $C_{51}H_{74}N_4O_{12}$

精確質量： 934.5303

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值：935.5390；計算值：935.5382

m/z 之 ESI-MS/MS 935.5 ($R_t = 24.4$ 分鐘，碰撞能量：25, 40,

75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (45), 112.1 (11), 140.1 (22), 172.1 (28), 182.1 (65), 200.1 (100), 218.1 (10), 248.1 (12), 258.1 (55), 276.1 (28), 334.2 (12), 348.2 (12), 434.3 (11), 461.3 (22), 475.3 (12), 533.4 (12), 551.4 (12), 660.4 (12), 708.5 (22), 935.5 (20)。

m/z 之 ESI-MS/MS 935.5 (R_t = 26 分鐘, 碰撞能量: 25, 40, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (40), 140.1 (5), 158.1 (8), 172.1 (15), 182.1 (40), 200.1 (22), 216.1 (10), 248.1 (28), 258.1 (100), 276.1 (60), 348.2 (20), 433.3 (9), 461.3 (10), 475.3 (12), 533.4 (6), 632.4 (8), 660.4 (8), 709.4 (5), 736.4 (6), 760.4 (5), 808.4 (8), 907.5 (6), 935.5 (8)。

2.2. 球孢白殭菌素及其新穎衍生物 (XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-D940、XRB-D974、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060) 包括彼等之異構物之分析數據

2.2.1. 球孢白殭菌素(2)

實驗式: $C_{48}H_{84}N_4O_{12}$

精確質量: 908.6086

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值: 909.6166; 計算值: 909.6164

H/D 交換實驗: $[M+D]^+$ m/z 910.63, $[M+Na]^+$ m/z 931.6 (R_t = 49.7 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 909.6 (R_t = 70 分鐘, 碰撞能量: 25 與 85

V) [m/z (rel. int.)] : 100.1 (55), 126.1 (15), 168.1 (11), 200.1 (13), 210.1 (100), 228.1 (65), 328.2 (8), 455.3 (18), 473.3 (8), 555.4 (5), 600.4 (5), 654.4 (<5), 682.4 (10), 700.4 (7), 782.4 (5), 909.6 (21)。

2.2.2. XRB-C894 (5)

實驗式： $C_{47}H_{82}N_4O_{12}$

精確質量：894.5929

$[M+H]^+$ (m/z)：實測值：895.5987；計算值：895.6008

m/z 之 ESI-MS/MS 895.6 ($R_t = 79.8$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)] : 86.1 (5), 100.1 (48), 126.1 (8), 168.1 (5), 200.1 (8), 210.1 (100), 228.1 (38), 313.2 (<5), 328.2 (8), 413.3 (5), 441.3 (8), 455.3 (7), 541.3 (<5), 555.4 (<5), 640.4 (6), 668.4 (6), 686.4 (6), 768.4 (<5), 895.5 (10)。

2.2.3. XRB-C942 (6)

實驗式： $C_{51}H_{82}N_4O_{12}$

精確質量：942.5929

$[M+H]^+$ (m/z)：實測值：943.6023；計算值：943.6008

H/D 交換實驗： $[M+D]^+$ m/z 944.61， $[M+Na]^+$ m/z 965.59 ($R_t = 47.5$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 943.6 ($R_t = 67$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)] : 100.1 (52), 126.1 (10), 134.1 (22), 168.1 (5), 200.1 (10), 210.1 (100), 228.1 (68), 244.1 (21), 262.1 (20), 328.2 (8), 455.3 (13), 473.3 (5), 489.3 (11), 507.3 (5), 555.4 (<5), 589.4 (<5), 634.4 (<5), 682.4 (5), 716.4 (8), 734.4

(6), 816.4 (<5), 943.6 (25)。

2.2.4. XRB-C976 (7)

實驗式： $\text{C}_{54}\text{H}_{80}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：976.5773

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：977.5874；計算值：977.5851

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{D}]^+$ m/z 977.59， $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 999.57 (R_t = 45.3 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 977.6 (R_t = 64.5 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (50), 126.1 (12), 134.1 (58), 168.1 (10), 200.1 (15), 210.1 (100), 228.1 (60), 244.1 (68), 262.1 (50), 328.2 (10), 362.2 (10), 455.3 (5), 489.3 (30), 507.3 (10), 589.4 (8), 716.4 (8), 750.4 (9), 850.4 (5), 977.6 (40)。

2.2.5. XRB-C1011 (8)

實驗式： $\text{C}_{57}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：1010.5616

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：1011.5710；計算值：1011.5695

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1033.58 (R_t = 43.3 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1011.6 (R_t = 61.8 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (36), 134.1 (100), 168.1 (5), 200.1 (8), 210.1 (58), 228.1 (36), 244.1 (100), 262.1 (78), 328.2 (5), 362.2 (10), 489.3 (18), 507.3 (5), 523.3 (15), 589.4 (5), 623.4 (5), 668.4 (6), 722.4 (5), 750.4 (10), 768.4 (5),

1011.6 (18)。

2.2.6. XRB-C1044 (9)

實驗式： $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：1044.5460

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：1045.5552；計算值：1045.5538

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1067.536 ($R_t = 41.4$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1045.6 ($R_t = 59.4$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 134.1 (60), 216.1 (9), 234.1 (16), 244.1 (100), 262.1 (70), 362.2 (17), 523.3 (12), 541.3 (9), 623.4 (5), 702.4 (6), 756.5 (7), 784.5 (7), 802.5 (8), 884.5 (5), 1045.6 (15)。

2.2.7. XRB-E922 (10)

實驗式： $\text{C}_{49}\text{H}_{86}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：922.6242

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：923.6338；計算值：923.6321

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{D}]^+$ m/z 924.64， $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 945.61 ($R_t = 64.4$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 923.6 ($R_t = 93.6$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (62), 126.1 (12), 168.1 (5), 200.1 (10), 210.1 (100), 224.1 (33), 228.1 (50), 242.2 (19), 328.2 (5), 342.2 (<5), 455.3 (10), 469.3 (10), 487.3 (<5), 555.4 (<5), 569.4 (<5), 600.4 (<5), 614.4 (<5), 668.4 (<5), 682.4 (<5), 696.4 (7), 714.4 (6), 796.5 (5), 923.6 (23)。

2.2.8. XRB-E956 (11)

實驗式： $\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：956.6086

 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：957.6178；計算值：957.6164H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 979.6 ($R_t = 61.5$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 957.6 ($R_t = 88$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (60), 126.1 (13), 134.1 (25), 168.1 (10), 200.1 (10), 210.1 (100), 224.1 (<5), 228.1 (50), 258.1 (19), 276.1 (12), 328.2 (7), 342.2 (<5), 455.3 (12), 473.3 (<5), 503.3 (7), 521.3 (<5), 569.4 (<5), 682.4 (<5), 730.4 (6), 748.4 (5), 830.4 (<5), 957.6 (23)。

m/z 之 ESI-MS/MS 957.6 ($R_t = 89.4$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (85), 126.1 (13), 134.1 (35), 168.1 (8), 200.1 (11), 210.1 (100), 224.1 (45), 228.1 (60), 242.1 (25), 244.1 (28), 262.1 (21), 328.2 (<5), 342.2 (5), 455.3 (10), 469.3 (10), 489.3 (8), 503.3 (<5), 521.3 (<5), 569.4 (<5), 682.4 (<5), 714.4 (5), 730.4 (7), 748.4 (5), 830.4 (5), 957.6 (23)。

m/z 之 ESI-MS/MS 957.6 ($R_t = 98.1$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (55), 126.1 (33), 134.1 (40), 168.1 (8), 200.1 (11), 210.1 (100), 224.1 (25), 228.1 (51), 242.1 (25), 244.1 (35), 262.1 (28), 328.2 (8), 342.2 (5), 362.2 (<5), 455.3 (8), 469.3 (12), 489.3 (10), 503.3 (<5), 521.3 (<5), 569.4 (<5), 648.4 (<5), 696.4 (<5), 716.4 (8), 730.4 (7), 748.4 (5), 830.4 (8), 957.6 (33)。

2.2.9. XRB-E990 (12)實驗式： $\text{C}_{55}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：990.5929

 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：991.6018；計算值：991.6008H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1013.58 ($R_t = 57.9$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 991.6 ($R_t = 85.6$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (88), 126.1 (15), 134.1 (100), 168.1 (8), 200.1 (19), 210.1 (92), 224.1 (65), 228.1 (55), 242.1 (32), 244.1 (78), 258.1 (18), 262.1 (58), 276.1 (15), 328.2 (5), 342.2 (5), 362.2 (8), 376.2 (5), 489.3 (21), 503.3 (22), 521.3 (8), 603.4 (8), 730.4 (9), 764.4 (8), 782.4 (6), 864.4 (6), 991.6 (60)。

m/z 之 ESI-MS/MS 991.6 ($R_t = 93.4$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (32), 126.1 (45), 134.1 (100), 168.1 (8), 200.1 (8), 210.1 (60), 224.1 (55), 228.1 (35), 242.1 (45), 244.1 (70), 262.1 (58), 342.2 (6), 362.2 (9), 489.3 (22), 503.3 (18), 589.4 (8), 648.4 (8), 730.4 (9), 764.4 (8), 782.4 (6), 864.4 (6), 991.6 (55)。

2.2.10. XRB-E1024 (13)實驗式： $\text{C}_{58}\text{H}_{80}\text{N}_4\text{O}_{12}$

精確質量：1024.5773

 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：1025.5865；計算值：1025.5851

m/z 之 ESI-MS/MS 1025.6 ($R_t = 81.6$ 分鐘，碰撞能量：25 與 85 V) [m/z (rel. int.)]: 100.1 (30), 134.1 (100), 210.1 (35),

224.1 (20), 228.1 (20), 234.1 (10), 242.1 (25), 244.1 (80), 258.1 (21), 262.1 (55), 276.1 (15), 362.2 (5), 376.2 (5), 489.3 (9), 503.3 (8), 523.3 (10), 537.3 (8), 603.4 (<5), 764.4 (15), 782.4 (6), 816.4 (5), 864.4 (6), 898.5 (6), 1025.6 (48)。

2.2.11. XRB-S958 (14)

實驗式： $\text{C}_{47}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}$

精確質量：958.5548

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：959.5628；計算值：959.5627 (FT-ICR-MS)

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 981.54 ($R_t = 16.0$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 959.6 ($R_t = 21.2$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (5), 100.1 (35), 126.1 (5), 150.1 (8), 168.1 (8), 180.1 (25), 200.1 (18), 210.1 (100), 228.1 (53), 260.1 (11), 278.1 (14), 328.2 (9), 378.2 (5), 455.3 (5), 505.3 (7), 523.3 (5), 555.4 (<5), 605.4 (<5), 732.4 (<5), 750.4 (<5), 832.5 (<5), 959.6 (12)。

m/z 之 ESI-假- MS^3 150.1 [m/z (rel. int.)]: 54 (4), 55 (8), 68 (2), 70.1 (69), 71.1 (17), 80.1 (2), 121.1 (2)。

2.2.12. XRB-S992 (15)

實驗式： $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}$

精確質量：992.5392

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：993.5480；計算值：993.5470

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1015.53 ($R_t = 14.9$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 993.5 ($R_t = 19.9$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (8), 100.1 (40), 126.1 (5), 134.1 (18), 150.1 (15), 168.1 (8), 180.1 (31), 200.1 (20), 210.1 (100), 228.1 (62), 244.1 (36), 260.1 (18), 262.1 (19), 278.1 (25), 328.2 (12), 360.3 (5), 455.3 (8), 505.3 (9), 539.3 (8), 605.4 (<5), 650.4 (5), 732.4 (<5), 766.4 (<5), 866.5 (<5), 993.6 (30)。

m/z 之 ESI-MS/MS 993.5 ($R_t = 21.4$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (5), 100.1 (25), 126.1 (8), 134.1 (25), 150.1 (12), 168.1 (5), 180.1 (35), 200.1 (18), 210.1 (100), 228 (48), 244.1 (19), 260.1 (15), 262.1 (22), 278.1 (21), 328.2 (8), 360.3 (5), 378.2 (8), 455.3 (5), 505.3 (9), 784.4 (5), 866.5 (5), 993.6 (18)。

2.2.13. XRB-S1026 (16)

實驗式: $C_{53}H_{78}N_4O_{14}S$

精確質量: 1026.5235

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值: 1027.5321; 計算值: 1027.5314

H/D 交換實驗: $[M+Na]^+$ m/z 1049.51 ($R_t = 14.0$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1027.5 ($R_t = 18.7$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (7), 100.1 (30), 117.1 (5), 134.1 (35), 150.1 (10), 168.1 (5), 180.1 (30), 200.1 (15), 210.1 (40), 228 (40), 234.1 (20), 244.1 (100), 260.1 (18), 262.1 (41), 278.1 (24), 328.2 (10), 362.3 (12), 378.2 (9), 523.3 (11), 539 (8), 639.4 (6), 684.4 (5), 784.4 (5), 900.5 (8), 1027.6 (28)。

m/z 之 ESI-MS/MS 1027.5 ($R_t = 20$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45,

75 V) [m/z (rel. int.)] : 70.1 (10), 100.1 (22), 134.1 (65), 150.1 (12), 168.1 (6), 180.1 (45), 200.1 (13), 210.1 (78), 228 (48), 234.1 (19), 244.1 (100), 260.1 (15), 262.1 (68), 278.1 (38), 328.2 (5), 362.2 (15), 378.2 (9), 439.3 (5), 457.3 (5), 489.3 (11), 505.3 (5), 523.3 (5), 539.3 (15), 639.4 (5), 684.4 (5), 750.4 (8), 768.4 (5), 784.4 (<5), 800.4 (5), 866.4 (5), 900.5 (8), 1027.6 (28)。

2.2.14. XRB-S1060 (17)

實驗式： $\text{C}_{56}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}$

精確質量：1060.5079

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：1061.5165；計算值：1061.5157

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1083.50 ($R_t = 13.2$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1061.5 ($R_t = 18.9$ 分鐘，碰撞能量：25, 45, 85 V) [m/z (rel. int.)] : 134.1 (58), 150.1 (13), 180.1 (27), 234.1 (35), 244.1 (100), 260.1 (15), 262.1 (78), 278.1 (13), 362.2 (15), 523.3 (9), 539.3 (18), 557.3 (15), 639.4 (9), 772.4 (8), 818.4 (8), 1061.6 (22)。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

(2006.01)

※申請案號： 99147150

A61K 38/12

※申請日： 99. 12. 10

※IPC 分類：

A61K 36/06 (2006.01)

A61P 33/10 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

來自真菌菌株之新穎 24 員環八縮酚酸肽類

(cyclooctadepsipeptides)及其作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途

NOVEL 24-MEMBERED CYCLOOCTADEPSIPEPTIDES
FROM FUNGAL STRAINS AND THEIR USE AS
ANTHELMINTICS OR ENDOPARASITICIDES

二、中文發明摘要：

本發明首先乃有關先前未知之 24 員環八縮酚酸肽類 PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060 (呈各種異構物型)之發現，及有關利用得自炭角菌(*Xylariaceae*)科家族特別是座間殼菌(*Rosellinia*)屬與康紐拉菌(*Coniolaria*)屬之真菌菌株、利用得自鐮胞菌(*Fusarium*)屬、白殭菌屬(*Beauveria*)與輪枝孢菌屬(*Verticillium*)[肉座菌目(*Hypocreales*)]與黑痣菌目(*Phyllachorales*)]群組之有絲分裂孢子真菌菌株、及利用自彼等真菌菌株分離之酵素製劑製備上述環八縮酚酸肽類之

方法；其次係有關使用彼等菌製備上述新穎環八縮酚酸肽類之用途及有關單獨或呈混合物使用球孢白殭菌素與上述環八縮酚酸肽類作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑之用途。

三、英文發明摘要：

The present invention relates firstly to the discovery of the previously unknown 24-membered cyclooctadepsipeptides PF1022-V, PF1022-W, XRB-C894, XRB-C942, XRB-C976, XRB-C1010, XRB-C1044, XRB-E922, XRB-E956, XRB-E990, XRB-E1024, XRB-S958, XRB-S992, XRB-S1026, XRB-S1060 (in various isomeric forms) and to the processes for the preparation of the abovementioned cyclooctadepsipeptides by means of the fungal strains from the family *Xylariaceae*, in particular the genera *Rosellinia* and *Coniolaria*, and by means of the mitosporic fungal strains from the groups *Fusarium*, *Beauveria* and *Verticillium* (orders *Hypocreales* and *Phyllachorales*), and by means of the enzymatic preparations isolated from these fungal strains, and secondly to the use of these strains for the preparation of the abovementioned novel cyclooctadepsipeptides and to the use of bassianolide and of the abovementioned novel cyclooctadepsipeptides individually or as a mixture, as anthelmintics or endoparasitocides.

七、申請專利範圍：

1. 一種先前未知之 24 員環八縮酚酸肽類 (PF1022-V、PF1022-W、XRB-C894、XRB-C942、XRB-C976、XRB-C1010、XRB-C1044、XRB-E922、XRB-E956、XRB-E990、XRB-E1024、XRB-S958、XRB-S992、XRB-S1026、XRB-S1060)，包括彼等之異構物。
2. 一種用於製備根據申請專利範圍第 1 項之環八縮酚酸肽類之方法，該方法係藉由
 - a) 使用及培養得自炭角菌(*Xylariaceae*)科，特別是座間殼菌(*Rosellinia*)屬與康紐拉菌(*Coniolaria*)屬之真菌菌株，及得自鐮胞菌(*Fusarium*)屬、白殭菌屬(*Beauveria*)與輪枝孢菌屬(*Verticillium*)[肉座菌目(*Hypocreales*)]與黑痣菌目(*Phyllachorales*)]群組之有絲分裂孢子真菌菌株，
 - b) 使用自彼等真菌菌株分離之酵素製劑，
 - c) 接著從培養物中分離環八縮酚酸肽類。
3. 一種根據申請專利範圍第 1 項之環八縮酚酸肽類及球孢白殭菌素之用途，其係單獨或呈混合物使用作為抗蠕蟲藥或殺內寄生蟲劑。

八、圖式：

圖：所發現 24 員環八縮酚酸肽類之結構式

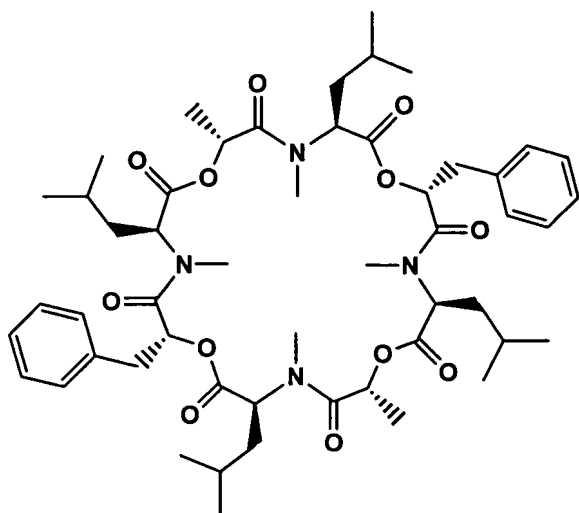


圖 1：PF1022-A (1)

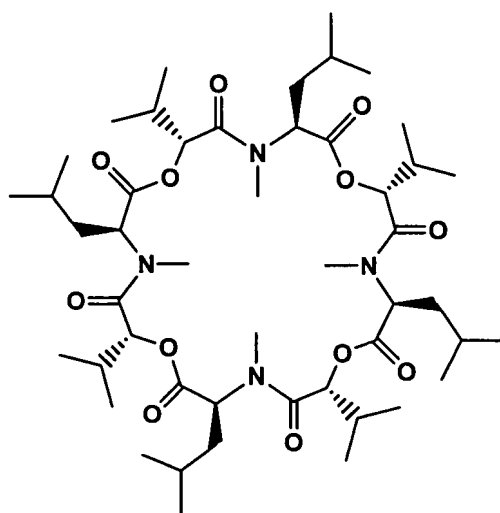


圖 2：球孢白殭菌素(2)

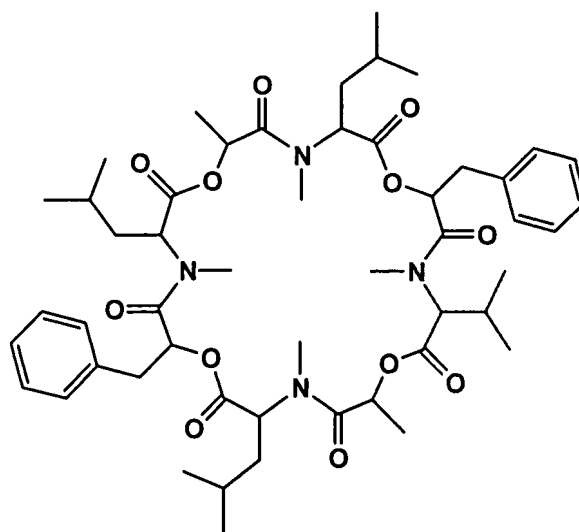


圖 3：PF1022-Va (3a)

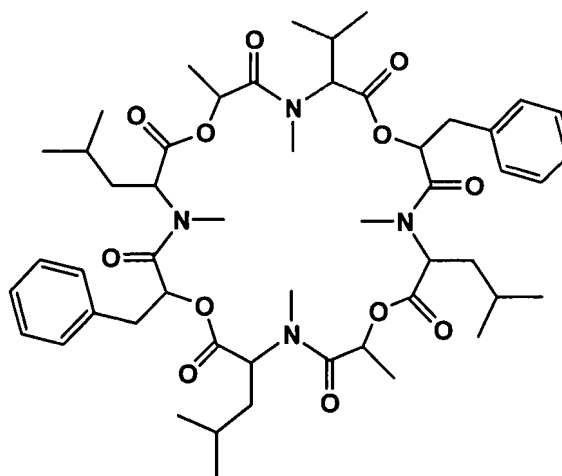


圖 4：PF1022-Vb (3b)

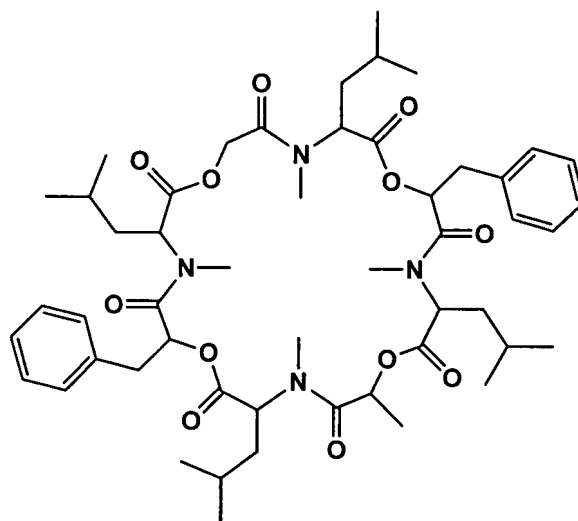


圖 5 : PF1022-W (4)

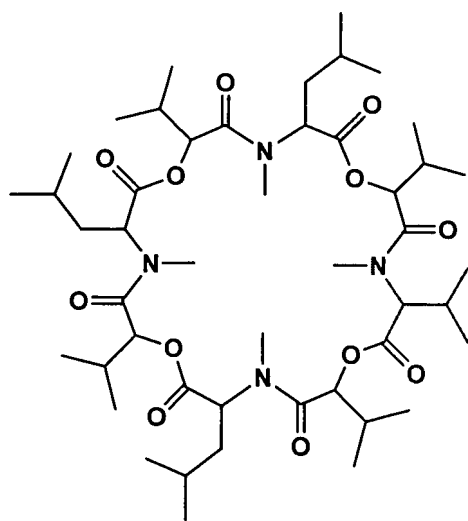


圖 6 : XRB-C894 (5)

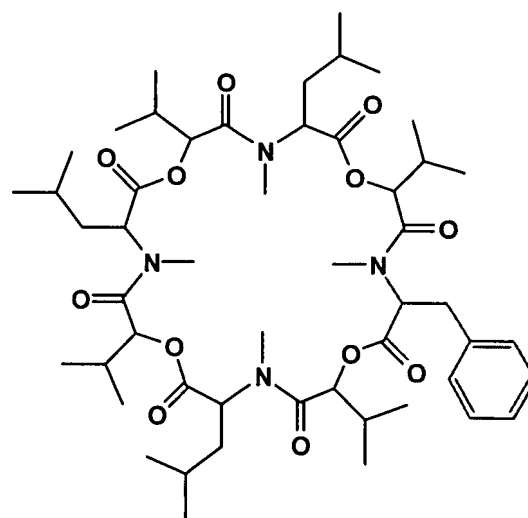


圖 7 : XRB-C942 (6)

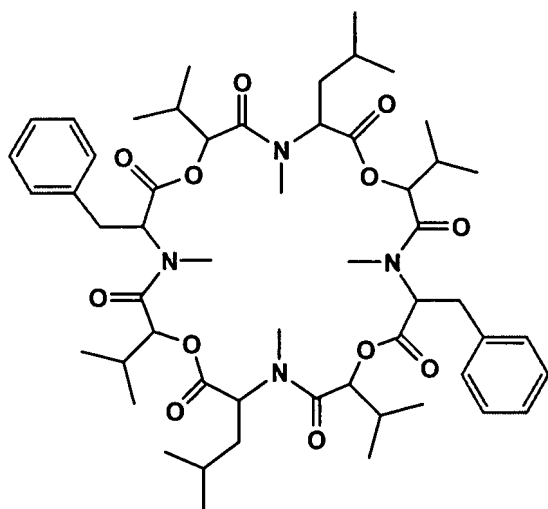


圖 8 : XRB-C976a (7a)

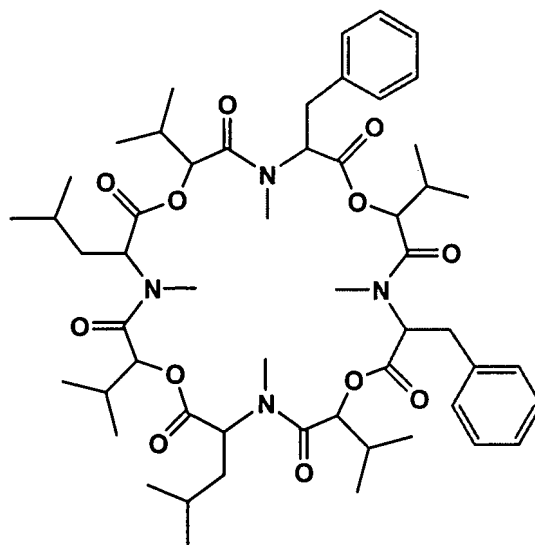


圖 9 : XRB-C976b (7b)

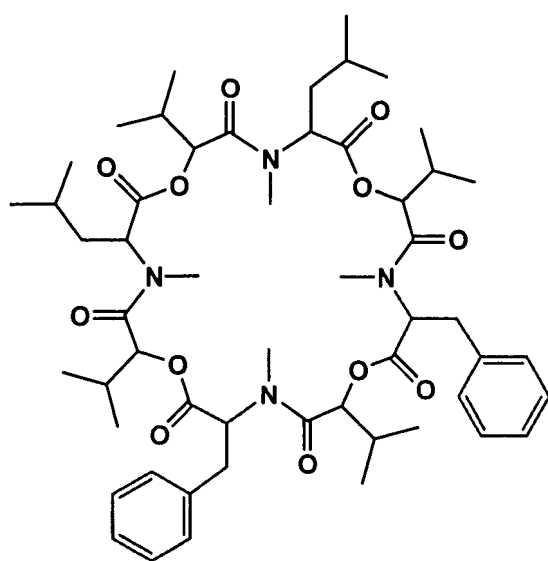


圖 10 : XRB-C976c (7c)

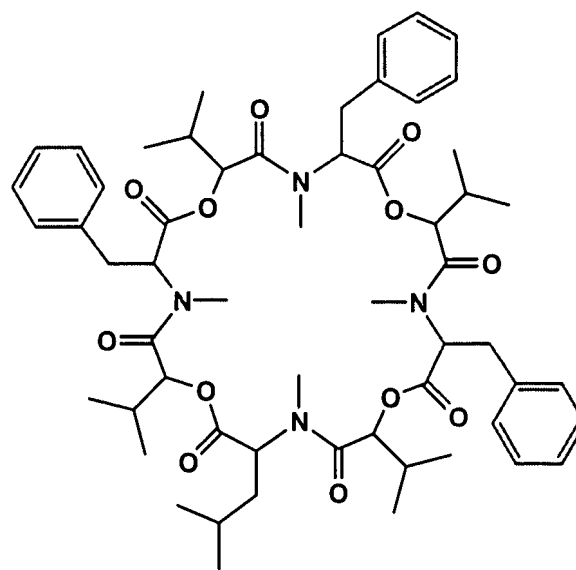


圖 11 : XRB-C1010a (8a)

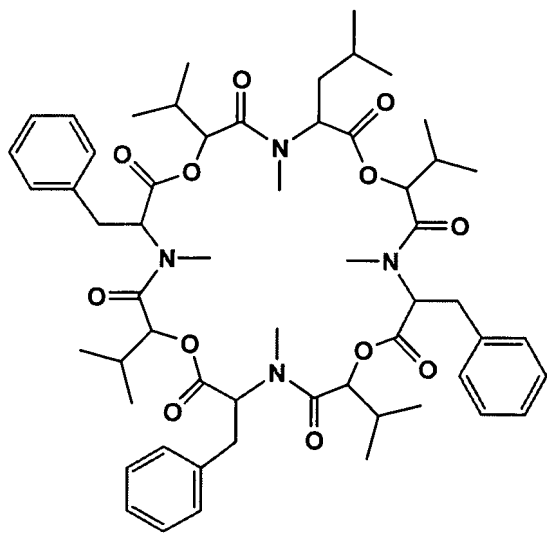


圖 12 : XRB-C1010b (8b)

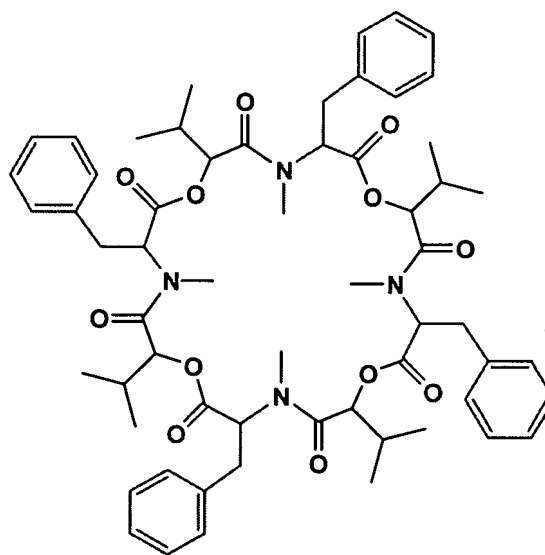


圖 13 : XRB-C1044 (9)

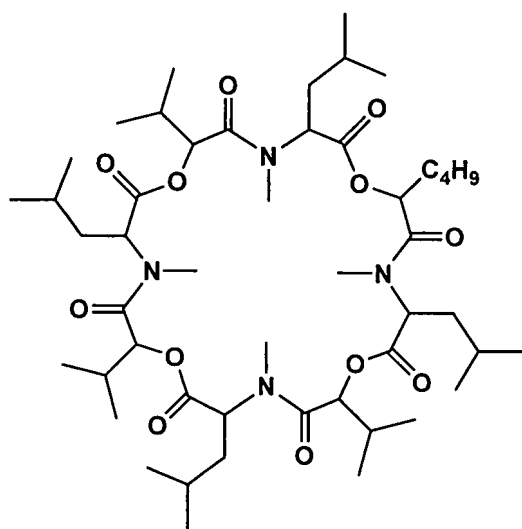


圖 14 : XRB-E922a (10a)

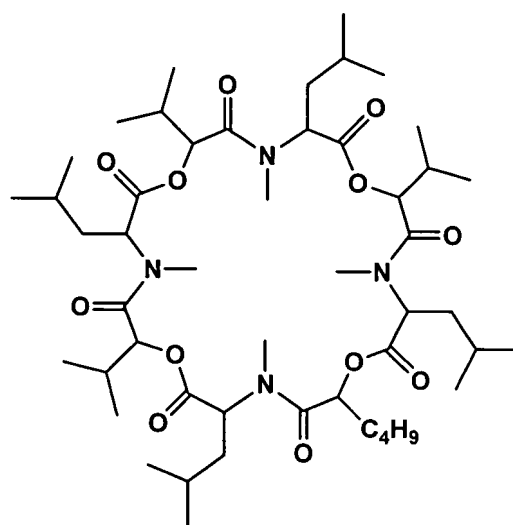


圖 15 : XRB-E922b (10b)

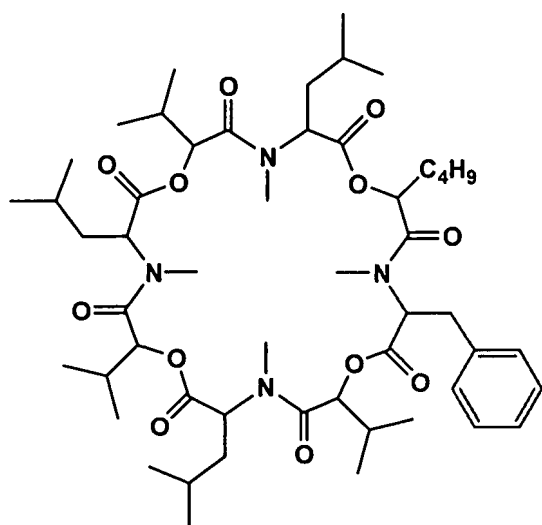


圖 16 : XRB-E956a (11a)

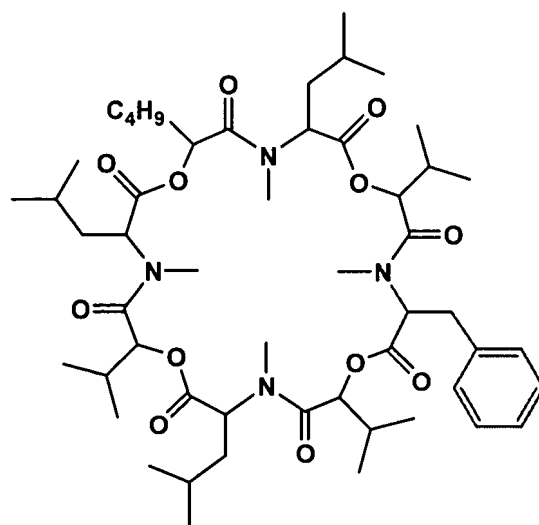


圖 17 : XRB-E956b (11b)

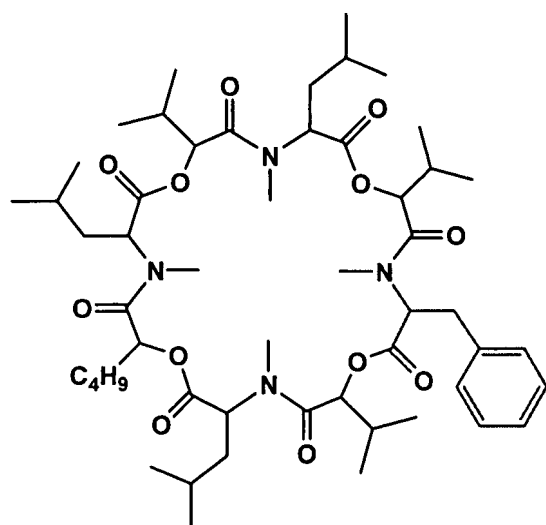


圖 18 : XRB-E956c (11c)

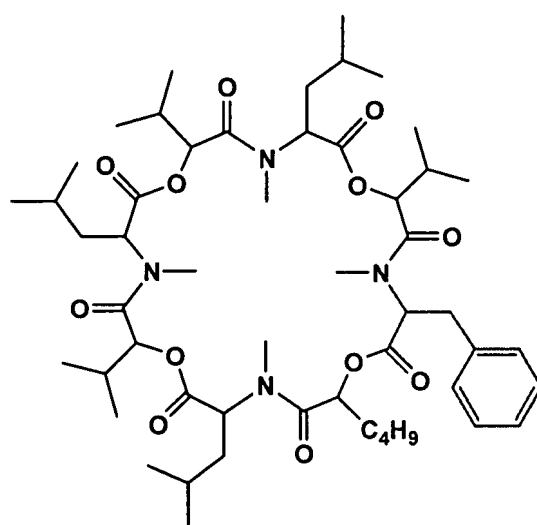


圖 19 : XRB-E956d (11d)

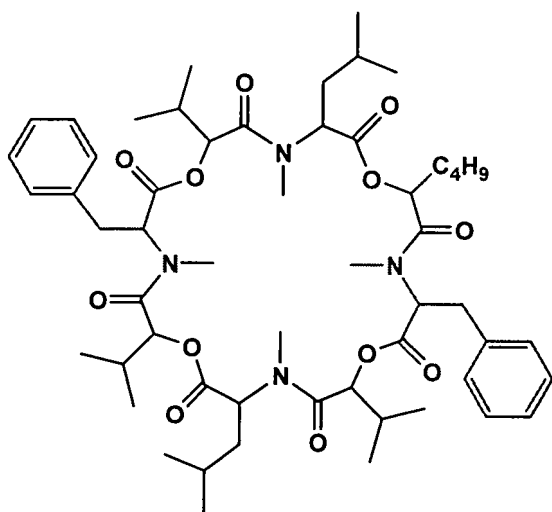


圖 20 : XRB-E990a (12a)

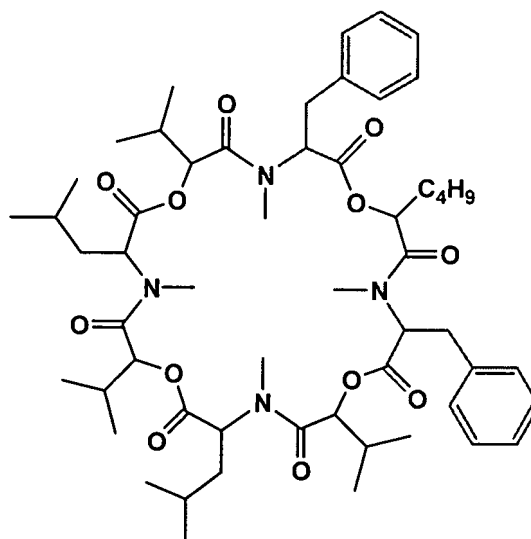


圖 21 : XRB-E990b (12b)

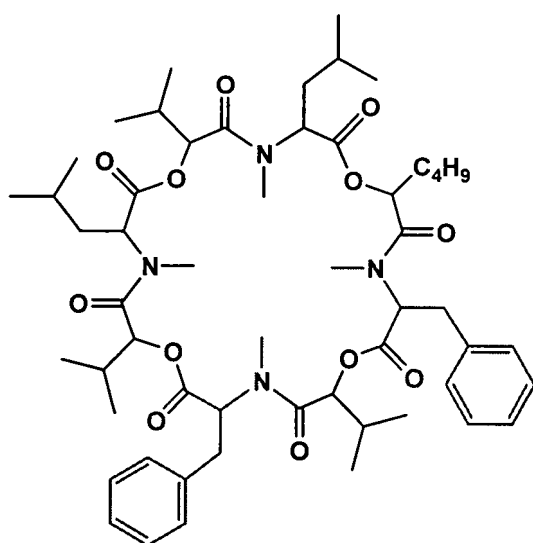


圖 22 : XRB-E990c (12c)

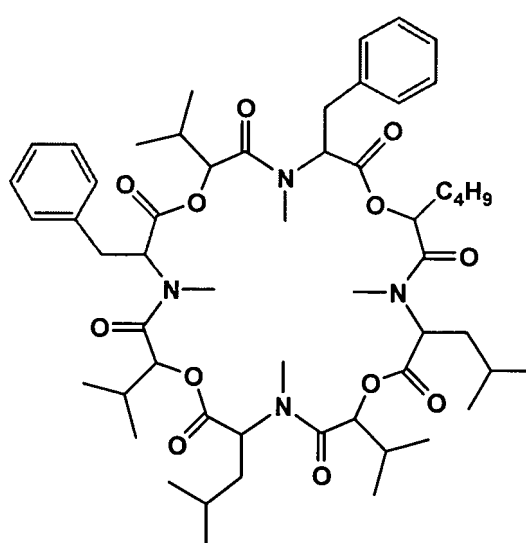


圖 23 : XRB-E990d (12d)

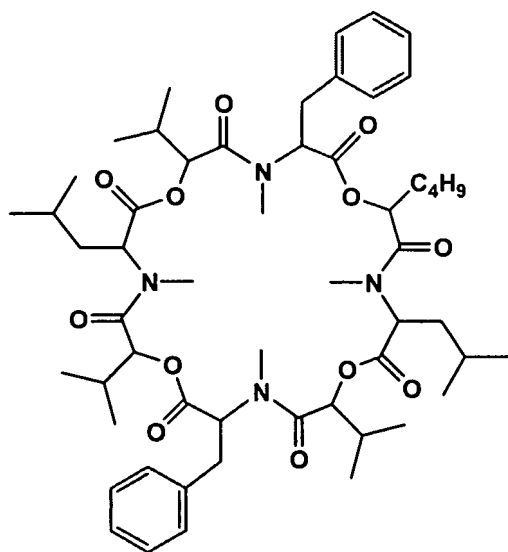


圖 24 : XRB-E990e (12e)

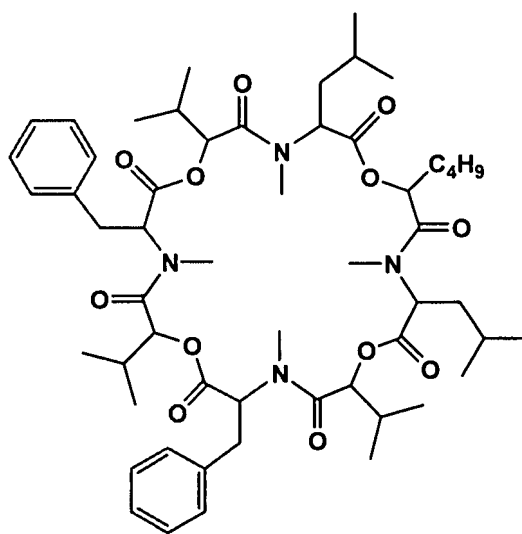


圖 25 : XRB-E990f (12f)

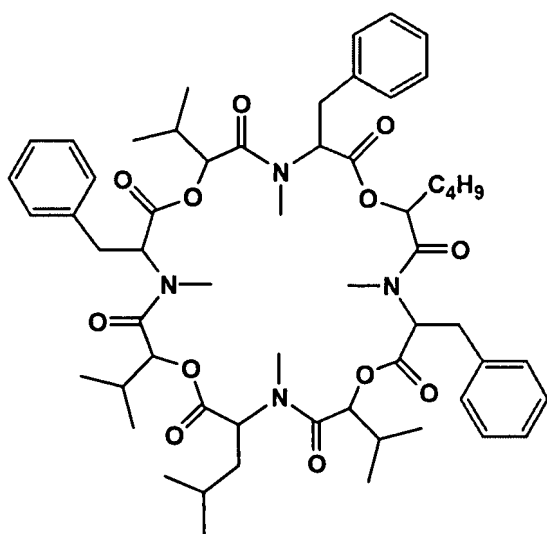


圖 26 : XRB-E1024a (13a)

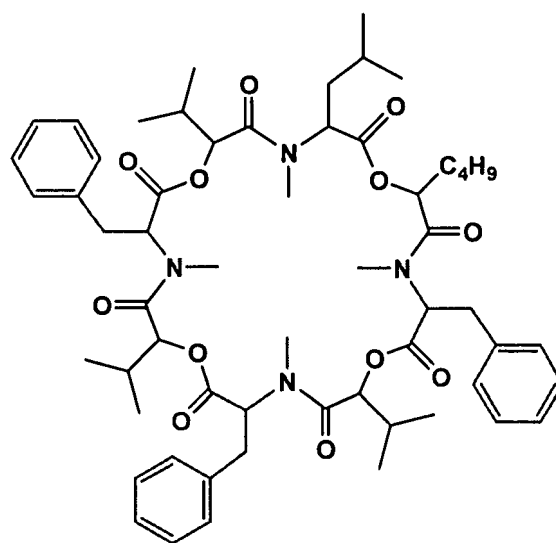


圖 27 : XRB-E1024b (13b)

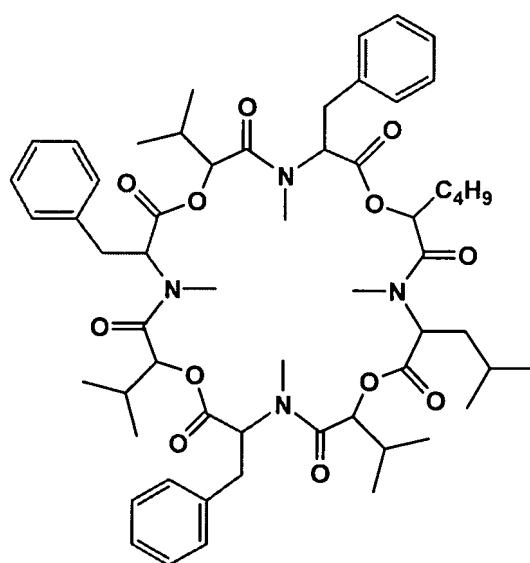
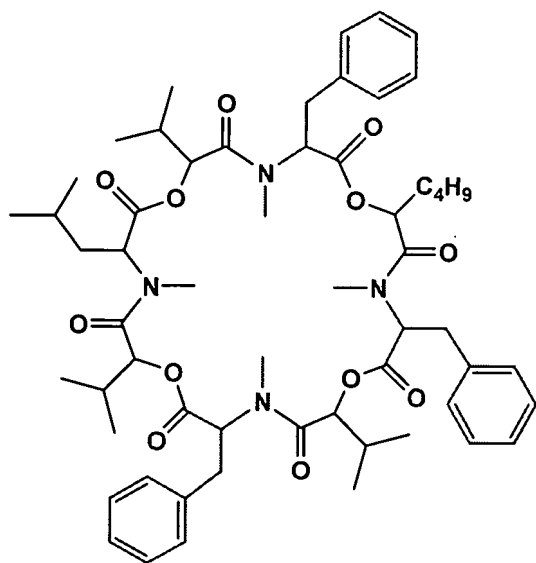


圖 28 : XRB-E1024c (13c) 圖 29 : XRB-E1024d (13d)

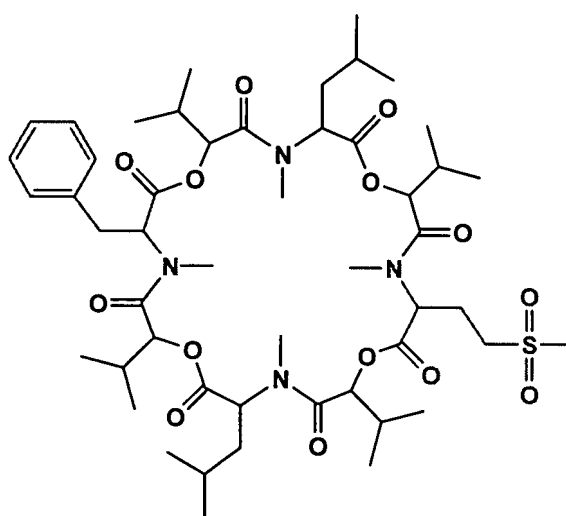
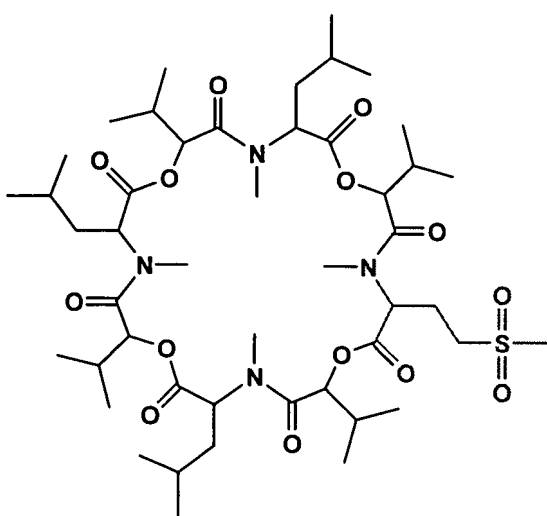


圖 30 : XRB-S958 (14) 圖 31 : XRB-S992a (15a)

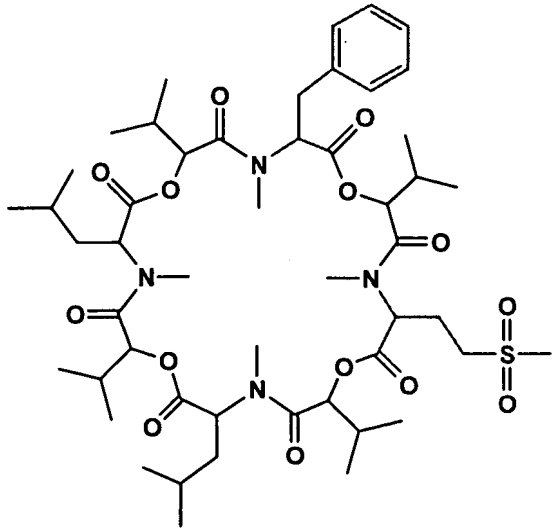


圖 32 : XRB-S992b (15b)

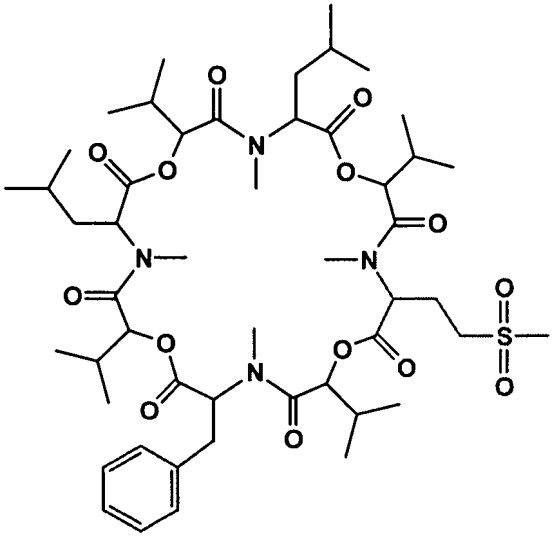


圖 33 : XRB-S992c (15c)

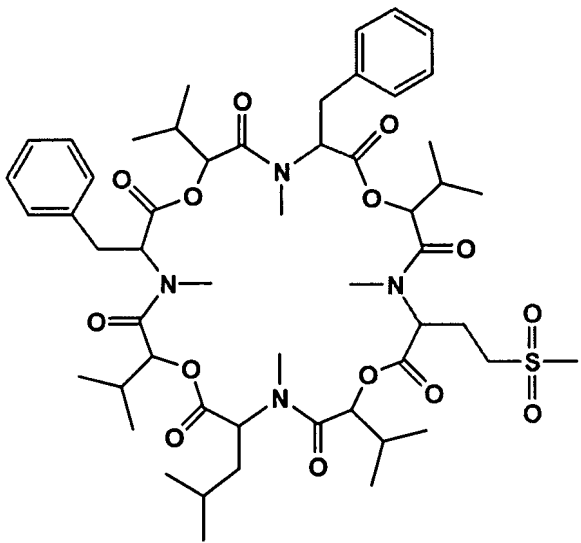


圖 34 : XRB-S1026a (16a)

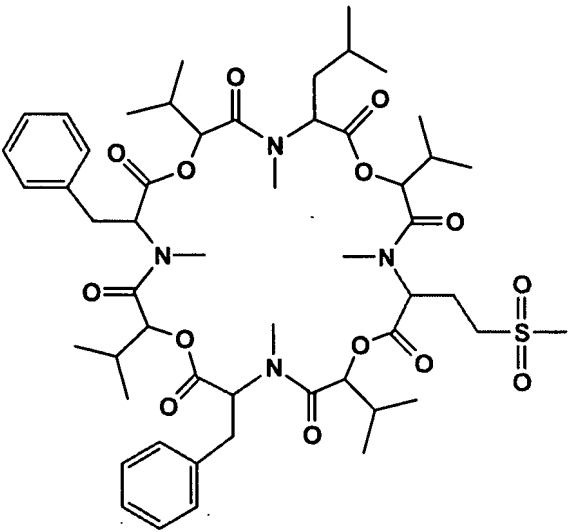


圖 35 : XRB-S1026b (16b)

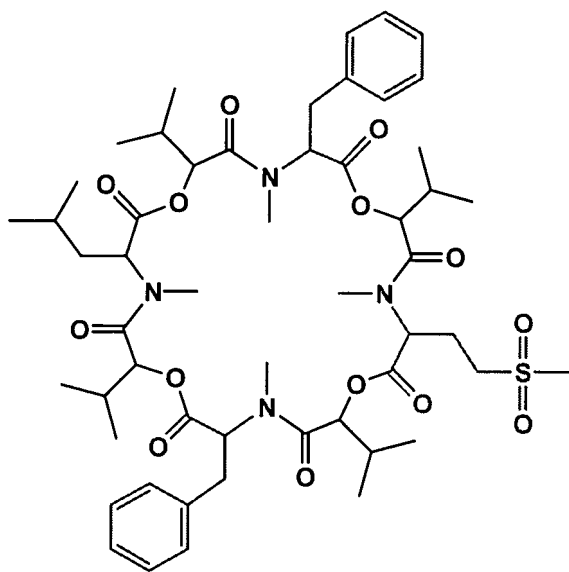


圖 36 : XRB-S1026c (16c)

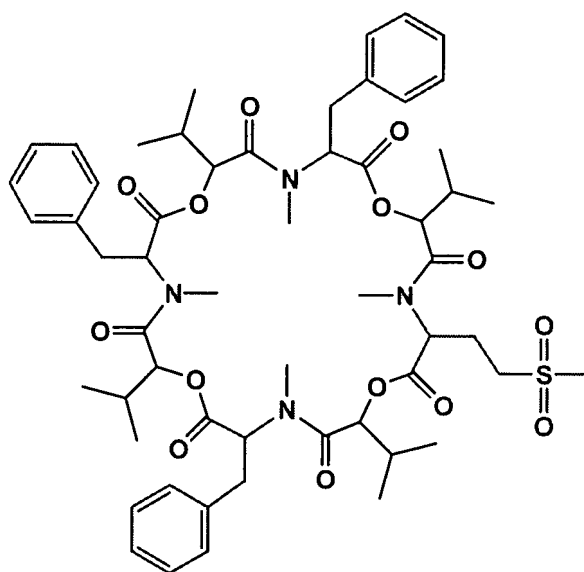


圖 37 : XRB-S1060 (17)

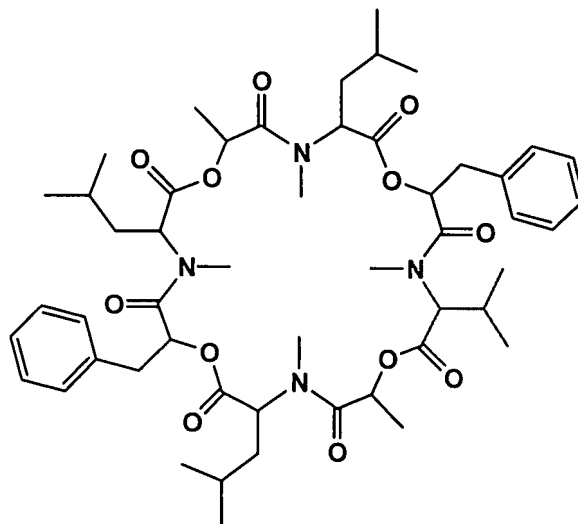
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



PF1022-Va (3a)

m/z 之 ESI-MS/MS 993.5 ($R_t = 19.9$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (8), 100.1 (40), 126.1 (5), 134.1 (18), 150.1 (15), 168.1 (8), 180.1 (31), 200.1 (20), 210.1 (100), 228.1 (62), 244.1 (36), 260.1 (18), 262.1 (19), 278.1 (25), 328.2 (12), 360.3 (5), 455.3 (8), 505.3 (9), 539.3 (8), 605.4 (<5), 650.4 (5), 732.4 (<5), 766.4 (<5), 866.5 (<5), 993.6 (30)。

m/z 之 ESI-MS/MS 993.5 ($R_t = 21.4$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (5), 100.1 (25), 126.1 (8), 134.1 (25), 150.1 (12), 168.1 (5), 180.1 (35), 200.1 (18), 210.1 (100), 228 (48), 244.1 (19), 260.1 (15), 262.1 (22), 278.1 (21), 328.2 (8), 360.3 (5), 378.2 (8), 455.3 (5), 505.3 (9), 784.4 (5), 866.5 (5), 993.6 (18)。

2.2.13. XRB-S1026 (16)

實驗式: $C_{53}H_{78}N_4O_{14}S$

精確質量: 1026.5235

$[M+H]^+$ (m/z): 實測值: 1027.5321; 計算值: 1027.5314

H/D 交換實驗: $[M+Na]^+$ m/z 1049.51 ($R_t = 14.0$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1027.5 ($R_t = 18.7$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (7), 100.1 (30), 117.1 (5), 134.1 (35), 150.1 (10), 168.1 (5), 180.1 (30), 200.1 (15), 210.1 (40), 228 (40), 234.1 (20), 244.1 (100), 260.1 (18), 262.1 (41), 278.1 (24), 328.2 (10), 362.3 (12), 378.2 (9), 523.3 (11), 539 (8), 639.4 (6), 684.4 (5), 784.4 (5), 900.5 (8), 1027.6 (28)。

m/z 之 ESI-MS/MS 1027.5 ($R_t = 20$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 75 V) [m/z (rel. int.)]: 70.1 (10), 100.1 (22), 134.1 (65), 150.1 (12), 168.1 (6), 180.1 (45), 200.1 (13), 210.1 (78), 228 (48), 234.1 (19), 244.1 (100), 260.1 (15), 262.1 (68), 278.1 (38),

328.2 (5), 362.2 (15), 378.2 (9), 439.3 (5), 457.3 (5), 489.3 (11), 505.3 (5), 523.3 (5), 539.3 (15), 639.4 (5), 684.4 (5), 750.4 (8), 768.4 (5), 784.4 (<5), 800.4 (5), 866.4 (5), 900.5 (8), 1027.6 (28)。

2.2.14. XRB-S1060 (17)

實驗式： $\text{C}_{56}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}$

精確質量：1060.5079

$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 實測值：1061.5165；計算值：1061.5157

H/D 交換實驗： $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1083.50 ($R_t = 13.2$ 分鐘)

m/z 之 ESI-MS/MS 1061.5 ($R_t = 18.9$ 分鐘, 碰撞能量: 25, 45, 85 V) [m/z (rel. int.)]: 134.1 (58), 150.1 (13), 180.1 (27), 234.1 (35), 244.1 (100), 260.1 (15), 262.1 (78), 278.1 (13), 362.2 (15), 523.3 (9), 539.3 (18), 557.3 (15), 639.4 (9), 772.4 (8), 818.4 (8), 1061.6 (22)。

【圖式簡單說明】

圖 1-37 係為化合物 PF-1022-A (1)、球孢白殭菌素(bassianolide) (2)、PF1022-Va (3a)、PF1022-Vb (3b)、1022-W (4)、XRB-C894 (5)、XRB-C942 (6)、XRB-C976a (7a)、XRB-C976b (7b)、XRB-C976c (7c)、XRB-C1010a (8a)、XRB-C1010b (8b)、XRB-C1044 (9)、XRB-E922a (10a)、XRB-E922b (10b)、XRB-E956a (11a)、XRB-E956b (11b)、XRB-E956c (11c)、XRB-E956d (11d)、XRB-E990a (12a)、XRB-E990b (12b)、XRB-E990c (12c)、XRB-E990d (12d)、XRB-E990e (12e)、XRB-E990f (12f)、XRB-E1024a (13a)、XRB-E1024b (13b)、XRB-E1024c (13c)、XRB-1024d (13d)、XRB-S958 (14)、XRB-S992a (15a)、XRB-S992b (15b)、XRB-S992c (15c)、XRB-S1026a (16a)、XRB-S1026b (16b)、XRB-S1026c (16c)及 XRB-S1060 (17)之化學式。