

380140

修正
本88年1月30日
補充

申請日期	83.09.02
案 號	83108085
類 別	C07D 519/00, A23K 1/17

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

380140

發 明 專 利 說 明 書
~~新 型~~

一、發明 名稱	中 文	抗 生 素 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, 前 - B 及 T
	英 文	"ANTIBIOTICS 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, PRE-B AND T"
二、發明 人	姓 名	1 查 理 斯 · 彼 得 · 康 尼 爾 2 史 帝 芬 · 霍 華 德 · 葛 洛 迪 3 亨 茲 · 夫 · 梅 耶
	國 籍	美 國
	住、居所	1 美 國 密 西 根 州 波 特 吉 市 溫 吉 伍 路 3907 號 2 美 國 密 西 根 州 波 特 吉 市 希 克 瑞 波 路 7124 號 3 美 國 密 西 根 州 卡 林 麻 梅 族 市 日 落 大 道 4408 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商法瑪西亞-普強公司
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美 國 密 西 根 州 卡 林 麻 梅 族 市 漢 瑞 特 街 301 號
	代 表 人 姓 名	羅 伯 J. 梅 森 海 德

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝
訂
線

380140

修正
本88年1月30日
補充

申請日期	83.09.02
案 號	83108085
類 別	C07D 519/00, A23K 1/17

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

380140

發 明 專 利 說 明 書
~~新 型~~

一、發明 名稱	中 文	抗 生 素 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, 前 - B 及 T
	英 文	"ANTIBIOTICS 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, PRE-B AND T"
二、發明 人	姓 名	1 查 理 斯 · 彼 得 · 康 尼 爾 2 史 帝 芬 · 霍 華 德 · 葛 洛 迪 3 亨 茲 · 夫 · 梅 耶
	國 籍	美 國
	住、居所	1 美 國 密 西 根 州 波 特 吉 市 溫 吉 伍 路 3907 號 2 美 國 密 西 根 州 波 特 吉 市 希 克 瑞 波 路 7124 號 3 美 國 密 西 根 州 卡 林 麻 梅 族 市 日 落 大 道 4408 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美商法瑪西亞-普強公司
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美 國 密 西 根 州 卡 林 麻 梅 族 市 漢 瑞 特 街 301 號
	代 表 人 姓 名	羅 伯 J. 梅 森 海 德

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝
訂
線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

美 國 (地 區) 申 請 專 利 ， 申 請 日 期 : 1993.9.10 案 號 : 08/119,434 有 無 主 張 優 先 權

有 關 微 生 物 已 寄 存 於 : , 寄 存 日 期 : , 寄 存 號 碼 :

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (18)

致 (計算之平均分子量 = 1107.1)。

使用類似於該等上述之程序，本發明其他 10381b 抗生素之結構及平均質量經發覺如下：式 I 之化合物係抗生素 10381v (1037.7 amu)；式 II 之化合物係抗生素 10381w (815.7 amu)；式 III 之化合物係抗生素 10381x (953.9 amu)；式 IV 之化合物如上所記地係抗生素 10381y；式 V 之化合物係抗生素 10381z1 (1201.5 amu)；及式 VI 之化合物係抗生素 10381z2 (1185.7 amu)；式 VII 之化合物係抗生素 10381前-b (1215.1 amu) 及式 IX 之化合物係抗生素 10381t (746.2 amu)。

實施例 5 抗生素 10381B 成分群之最小抑制濃度測定

10381b 成分群之生物活性係使用上述之試管內最小抑制濃度 (MIC) 分析與 10381b 複合物者比較。該分析測定化合物抑制某些型態之厭氣細菌生長之能力，其通常棲息在家禽、豬及牛之腸中。

I. 化合物製備

2 毫克 / 毫升所要測試之藥之溶液於 10% v/v 乙醇 / 水中製成。此母液然後稀釋至每毫升 1 毫克及然後經一系列 10 次 2 倍稀釋液之進一步稀釋。在各濃度下，一部分置於無菌培養皿中。9 體積之熔培養基然後加至各皿，混合及允許在室溫下固化。此些皿然後轉至 Coy 槽及允許乾燥和以無氧氣壓平衡。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明係有關定名為 10381v、w、x、y、z1、z2、前 - b及 t之抗生素，其係自微生物阿金尼氏鏈黴菌 (*Streptomyces arginensis*) 之發酵液之粗萃取液分離。

發明背景

三種含硫之肽抗生素，磺黴素 I、II 和 III 之分離、純化、物理化學及生物性質係於 J. Antibiotics, 22(1): 12-22 (1969) 中揭示。Tetrahedron Lett., 29(12): 1401-4 (1988) 揭示一種修飾之肽抗生素磺黴素 I 之結構。亦建議結構相關之抗生素伯耐黴素 A (berninamycin A) 之修正結構。Tetrahedron Lett., (31): 2791-4 (1978) 揭示磺黴素 I 之甲醇分解產物。Tetrahedron Lett., (9): 735-6 (1977) 揭示磺黴素 I 之酸水解產物。

化學摘要 73(1): 2666c (日本專利第 45006880 號) 揭示磺黴素 I 由綠色產色鏈黴菌磺黴素變種 (*Streptomyces viridochromogenes* var *sulfomycini*) 之培養製備。美國專利第 4,007,090 號揭示及申請一種自微生物燼灰綠鏈黴菌 (*Streptomyces cineroviridis*) 製備磺黴素 I 之新穎發酵方法之專利範圍。化學摘要 73(17): 86558e (日本專利第 45017588 號) 揭示磺黴素 II 和 III 由綠色產色鏈黴菌磺黴素變種之培養製備。其 uv 及抗生素圖譜係與磺黴素 I 者相似。

J. Antibiotics, 45(11): 1809-1811 (1992) 及於

修正
年 月 日
88. 8. 10
補充

五、發明說明 (19)

II. 菌種製備

用於 MIC 測試之生物經接種至培養液及在使用前於 39°C 下培養 18 - 24 小時。培養液然後稀釋至與 0.5 MacFarland 硫酸銀標準相同之濁度，除了以 1:1 稀釋之豬分離物 P108-3C1、P105-1C3 及 P105-1C4。所有接種及稀釋皆在厭氣槽內，使用培養液及注射筒自丁基橡皮塞轉移操作。

新鮮製備及稀釋之培養液載入 Steers 複製裝置之井中。此設備可將各 32 種菌之 10 微升分散至預培養之培養皿上。在接種後 1 小時，接種物已經吸收及培養皿經翻轉和在 38 - 39°C 下培養 48 小時。皿然後自槽中取出及測定測試化合物之 MIC。MIC 係以化合物在培養皿上防止測試生物之可檢出生長之最低濃度。以無法在生長與無生長間產生清楚分界點之化合物而言，其 MIC 被認為係較高濃度之稀釋，其在測試區域內生成生長之不明顯霧團或 3 - 5 個菌落。因此，各組測試培養皿產生 32 個測試生物各自之個別 MIC 值。

III. 結論

在表 III 中，使用上述之分析，比較以下之抗生素：10381b 複合物、10381b2、10381x 成分及 10381y 成分。雖然在成分間活性之實際差異所測試之個別微生物而變，自表 III 很明顯地，"Y 峰" 或抗生素 10381y 較個別 b 和 x 成分或

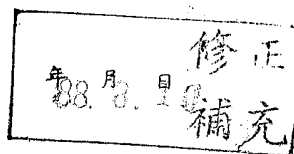
五、發明說明(2)

1988年7月20日公佈之歐洲專利申請案第0 274 873 號揭示一種硫肽抗生素複合物A10255，其含有具胺基酸支鏈之環狀肽核心。J. Antibiotics, 42(10): 1465-9 (1089) 揭示一種肽抗生素噻嗎黴菌(thioxamycin)之分離及特徵化。

資料揭示

10381b抗生素複合物之產生及性質係於1988年1月14日之國際公告第W0 88/00200 號中描述。根據此公告，10381b抗生素複合物係由營養培養基與微生物阿金尼氏鏈黴菌(*Streptomyces arginensis*)發酵產生。再者，此公告陳述10381b複合物包括一群至少5種抗細菌劑，其主要對革蘭氏陽性生物有效及具與磺黴菌群抗生素所報導者相似之物理性質。10381b複合物之主要成分經定名為10381b₂及10381b₃。在此兩個成分中，10381b₂係以足夠量及純度分離而允許生物及化學特徵化。10381b₂之結構被認為與自綠色產色鏈黴菌之肽抗生素磺黴素I完全相同，此已經證實。10381b抗生素複合物展現對革蘭氏陽性細菌之抗菌活性及對產肉動物如家禽、豬及牛如生長促進劑地有用。然而，此公告並未教導或揭示10381b抗生素複合物之其他成分，特別地本發明之抗生素10381v、w、x、y、z1、z2、前-b及t之分離或鑑定。

精黴素(arginomycin)(抗生素10381a₁)之產生及性質係於1986年10月9日之國際公告第W0 86/05785號及於1987



五、發明說明 (y)

10381b 複合物一致地更有效 (較低之 MIC 濃度)，特別地對抗梭菌及鏈球菌屬菌，其已經報導涉及在雞及豬中之生長壓抑，然而其維持低活性對抗瘤胃厭氣菌如埃及巨球形菌及反芻月形單胞菌 (其係在反芻動物中菌相之必要成分)，因此除其在單胃動物如家禽或豬中之生長促進活性外，建議其在反芻動物中用為生長促進劑。

以下之表 IV 給定一些 10381b 成分群及複合物之附加生物活性數據，其數據係使用上述之分析獲得。在表 IV 中所述之研究所發現之成分 x、b2 及 y 之生物活性數據輕微地不同於自在表 III 中所述之研究所得之相當者。如此之差異通常見於比較試管內抗細菌分析之分開實驗間之結果，特別地當測試不同批次之抗生素時。在此些差異 (及 x 成分對抗菌株 P10381C1 所得不一致結果) 之外，兩個分析間之結果係一致的及指出最少在試管內成分 y 和 b2 係最有效的。成分前 -b、v 及 w 如成分 x 地係相當低效力的。

實施例 6 10381B 成分 X、Y、W、V、前 -B、Z1、Z2 及 T 之分離及純化

10381b 複合物係由將阿金尼氏鏈黴菌於營養培養基中發酵產生。粗產物由乙酸乙酯之萃取、隨後濃縮及以庚烷沈澱獲得。所得之物質然後於不同之撐體如下述地層析：

10381x。粗 10381b 複合物於載有 Delta-Pak C18 管柱之 Waters Delta-Prep 中，以 32 毫克量層析，使用 35 毫升 / 分之水 -ACN-THF (67 : 3 : 30) 移動相。層析以設定在 250

五、發明說明(3)

年6月之A.D. Argoudelis 等人之J. Antibiotics, XL (6):750-760中描述。

在此領域中，就申請者所知地並無參考文獻教導或建議本發明之抗生素10381v、w、x、y、z1、z2、前-b及t。

發明簡要

本發明係特別地提供：

一種式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其藥用鹽；

一種飼料組合物，其包括動物飼料及式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合；

一種動物預混料；其包括式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合和合適之惰性載體；及

一種在動物中促進生長之方法，其包括將有效量之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合施用至動物。

此些抗生素之檢測、分離及鑑定係困難和未預期的及需要超過在抗生素技藝之一般技術上之技術。此外，亦有與此些抗生素有關之未預期及有利性質，即抗生素10381y具與成分10381bz 相較下增加之抗菌活性。

完全純之抗生素10381v、w、x、y、z1、z2、前-b及t已經自微生物阿金尼氏鏈黴菌 (*Streptomyces arginensis*) 之發酵液之粗萃取物中分離。亦提供此些化合物之獨特結構。抗生素10381y經發現如以下更全然描述地具較

五、發明說明 (28)

表 III

成分 10381y、x 及 b 之生物活性 (M. I. C. 於微克/毫升)

生物	菌株	複合物	10381x	10381b2	10381y
產氣梭狀桿菌 (<i>C. perfringens</i>)	P1083C1	0.4	1.6	0.4	<0.2
產氣梭狀桿菌	P1051C3	50.0	>100.0	50.0	12.5
糞鏈球菌 (<i>S. faecalis</i>)	P1051C4	12.5	50.0	12.5	1.6
牛鏈球菌 (<i>S. bovis</i>)	JB1	3.1	25.0	3.1	0.4
產氣梭狀桿菌	A83-RKP	0.4	1.6	0.8	0.4
產氣梭狀桿菌	A83-3	0.8	6.3	3.1	<0.2
產氣梭狀桿菌	A82-1	3.1	50.0	3.1	0.8
糞鏈球菌	71A01	50.0	100.0	25.0	6.3
產氣梭狀桿菌	71A02	1.6	6.3	1.6	<0.2
產氣梭狀桿菌	RF1B04	0.4	3.1	0.4	<0.2
糞鏈球菌	CCS1-03	6.3	50.0	12.5	1.6
產氣梭狀桿菌	CCS2-09	0.4	1.6	0.8	<0.2
產氣梭狀桿菌	CCS1-11	3.1	50.0	6.3	0.8
脆弱擬桿菌 (<i>B. fragilis</i>)	UC9370	50.0	100.0	25.0	1.6
產氣梭狀桿菌	UC9452	1.6	6.3	3.1	<0.2
多形擬桿菌 (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	UC9014	25.0	50.0	12.5	<0.2
遲緩真桿菌 (<i>E. lentum</i>)	L-34	NG	NG	NG	NG
<i>B. fibrisolvens</i>	49	0.4	1.6	6.3	<0.2
<i>B. fibrisolvens</i>	D1	0.8	3.1	0.8	<0.2
埃及巨球形菌 (<i>M. elsdenii</i>)	B159	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
多對毛螺菌 (<i>L. multipanus</i>)	40	1.6	6.3	1.6	<0.2
反芻月形單胞菌 (<i>S. ruminantium</i>)	GA192	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
反芻月形單胞菌 <i>R. amylophilus</i>	GA31	50.0	>100.0	100.0	25.0
<i>R. amylophilus</i>	H18	>100.0	>100.0	>100.0	100.0
<i>R. flavefaciens</i>	FD1	0.8	6.3	1.6	<0.2
<i>R. flavefaciens</i>	C94	0.8	3.1	0.8	6.3
嗜齒真桿菌 (<i>E. reuminantium</i>)	GA195	0.8	3.1	0.4	6.3
<i>P. ruminicola</i>	118B	<0.2	0.2	<0.2	<0.2
壞死梭桿菌 (<i>F. necrophorum</i>)	FN5052	100.0	>100.0	100.0	25.0
壞死梭桿菌	FN4070	100.0	>100.0	50.0	25.0
豬赤痢螺旋菌 (<i>S. hyodysenteriae</i>)	B204	NT	NT	NT	NT
豬赤痢螺旋菌	16-4	NT	NT	NT	NT

附註：NG = 無生長，NT = 未測試；所有 MIC 係基於質量而與純度無關。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(4)

10381b 抗生素複合物中其他成份更高之生物活性。

本發明之抗生素係由天然存在之微生物阿金尼氏鏈黴菌 (*Streptomyces arginensis*) 產生。正因為如此，這些抗生素可由此天然狀態存在之微生物產生。本發明如其係有關這些抗生素，並不包含可能存在或天然含有之任何組合物。反而，本發明係以一種使之實際有用之方式提供這些抗生素之產生及分離，即為了藥用及其他抗菌目的和為了獸醫之用途。

在隨後參考物質為 "10381b 成分" 之文內，可瞭解地，此成分係與 10381b₂ 成分相同，及更準確地鑑定為已知之 10381b₂ 成分。

抗生素 10381v、w、x、y、z1、z2、前-b及 t 可自 *S. arginensis* 之培養獲得。此微生物之分類及生長之描述係自 1988 年 1 月 14 日公佈之國際公告第 W0 88/00200 號併入本文供參考。10381b 抗生素複合物之發酵及回收亦自此公告併入本文供參考。對製備 10381b 抗生素複合物之較佳程序係於以下之製備 1 及 2 中描述，而製備 2 係最佳的。

各具較母菌株阿金尼氏鏈黴菌增加滴定度之一群突變種可用以製備 10381b 複合物之成分。新菌株使用標準突變誘生法及選殖技術製成。這些包括以 N-甲基-N'-亞硝基胍 (Delic 等人 (1970) *Mutat. Res.* 9:167) 及亞硝酸 (Crueger 和 Crueger (1984), 生物技術：工業微生物之教科書，第 16 頁，Sinauer Associates 公司，山得蘭 (Sunderland)，麻州，美國) 之化學突變誘生和以紫外線

五、發明說明(5)

照射 (Thrum (1984) 於工業抗生素之生物技術 (Vandamme 編著), Marcel Dekker, 紐約市, 第 373-374 頁。選殖技術包括菌株由分離菌落選擇、特異菌落形態選擇及對被認為在產物 10381b 複合物合成途徑中成分之類似物

(Crueger 和 Crueger (1984), 生物技術: 工業微生物之教科書, 第 24-25 頁, Sinauer Associates 公司, 山得蘭, 麻州, 美國) 之抗性選擇之簡單再分離。此意指僅需少量培養菌生長以獲得分離成分之材料。突變誘生及選殖並不顯著改變在 10381b 複合物中之成分比值。

此些抗生素自 10381b 抗生素複合物之粗產物 (其含已知之 10381b 成分及次要成分, 其鑑定係本發明之部分) 之分離係由於逆相 HPLC 管柱之層析分開完成。較佳之起始物係 10381b 抗生素複合物之第二期粗產物, 因為次要成分在此些第二期產物中強化。同時另一種獲得具此些次要成分強化之區分方法係進行已萃取液之第二個萃取。較佳之管柱係 Zorbax C8, 5 微米, 具水-四氫呋喃 (THF)-乙腈 (ACN) (60:27:3) 之移動相; 其他管柱例如 Waters DeltaPak C18 亦可使用, 但獲得較差之分離。移動相可經修飾以獲得不同之滯留時間 (亦影響分離)。

一般而言, 本發明之抗生素包括大量更純之抗生素 10381y 可由於 Waters DeltaPak C18 管柱 (50 x 300 毫米), 以水-THF-ACN (60:27:3) 作為移動相之連續層析法製備如下: Waters DeltaPrep 3000 係用以處理約 5.2 克粗 10381b 抗生素複合物, 以每次約 32 毫升之層析法 164 次。

五、發明說明(6)

成分 10381b、10381x 等之溶析集中液經形成及處理得不同純度之產物。最初之 10381y 集中液經濃縮至 80-150 毫升及於相同管柱中以完全一樣之移動相再層析；在此程序之變異中，約 2 升之 10381y 溶析液之終集中液濃縮成約 600 毫升之水性濃縮液；此以 60 毫升二氯甲烷萃取；萃取液經蒸發及殘渣溶於移動相以便第二次層析。此程序之變異（為了 10381y 溶析液之終集中液）生成更少之供液體積及其後更佳之層析分開，自其中 18 毫克層析純之 10381y 可由將 10381y 集中液濃縮成水液、以 0.1 體積之二氯甲烷萃取、將萃取液濃縮成約 1 毫升之漿及由添加 3 毫升正庚烷之結晶完成獲得。為求此程序之更詳細內容，請見以下實施例 2。

最純之抗生素 10381y 可由於 Zorbax 5C8 以水 - 四氫呋喃 - 乙腈移動相如在以下實施例 3 中更全然描述地雙層析製備。亦在以下表 IA 及 IB 中給定本發明抗生素 10381v、w、x、y、z1、z2、前 -b 及 t 之分析 HPLC 滯留時間。

本發明抗生素之結構係由 NMR 光譜儀及質譜儀決定。例如，如此之實驗應用及分析導致抗生素 10381y 之鑑定為國際公告第 W0 88/00200 號之成分 10381b₂ 減去 2 個末端去氫丙胺酸殘基。因此，在以下式圖中，抗生素 10381y 已經鑑定為式 IV 之化合物及成分 10381b₂ 已經鑑定為式 VIII 之化合物（其與磺黴素 I 相同）。

亦在以下式圖中，式 I 之化合物係抗生素 10381v；式 II 之化合物係抗生素 10381w；或 III 之化合物係抗生素

五、發明說明(7)

10381x；式IV之化合物如上所記地係抗生素10381y；式V之化合物係抗生素10381z1；式VI之化合物係抗生素10381z2；式VII之化合物係抗生素10381前-b；及式IX之化合物係抗生素t。

將對熟諳此技藝者很明顯地，式I-VII及IX之抗生素含有一些不對稱碳。所有此些化合物之對映及立體異構形式亦包括在本發明之範圍內。

本發明亦提供式I-VII及IX之化合物之藥用鹽。藥用鹽係指該等對藥學者很明顯之鹽，其在如調配、穩定、病人接受性及生物利用性之性質上與母化合物相當。

本發明之所有化合物係用為抗生素及可用以治療某些細菌感染和/或預防或降低某些微生物在不同環境中之生長。例如，抗生素10381y之生物活性經發覺為10381b抗生素複合物或10381b成分對抗多種微生物者之約兩倍。在以下之表III中，3種主要10381b複合物成分(b、x和y)之生物活性相當於10381b複合物者，使用試管內最小抑制濃度分析，如以下實施例5中所述。此分析測定化合物抑制某些型態之厭氣細菌生長之能力，其細菌通常棲息在家禽、豬或牛之腸中。自表III，明顯地“Y峰”或抗生素10381y係較個別b和x峰物質或10381b複合物一致地更有效(較低之MIC濃度)，特別地對抗梭菌及鏈球菌屬菌，其經報導涉及在雞及豬中之生長壓抑，然而其對抗胃厭氣菌如埃及巨球形菌(*M. elsdenii*)及反芻月形單胞菌(*S. ruminantium*) (其係反芻類菌相之必要成分)保持低活性

五、發明說明(8)

，因此除其在單胃動物如家禽或豬中之生長促進活性外，建議其在反芻動物如牛中用為生長促進劑。

以下之表IV給定一些10381b成分及複合物之附加生物活性數據。該等生物活性係使用在以下實施例5中所述之試管內最小抑制濃度分析獲得。在表IV中所述之研究中所發現成分x、b及y之生物活性數據輕微地不同於自在表III中所述之研究所得之相當者。如此之差異通常見於比較試管內抗細菌分析之分開實驗間之結果，特別地當測試不同批次之抗生素時。在此些差異（及x成分對抗菌株P1083C1所得之不一致結果）之外，兩個分析間之結果係一致的及指出最少在試管內成分y和b係最有效的。成分前-b、v及w如成分x地係相當低效力的。

本發明之抗生素亦可用在反芻動物如牛及綿羊和在非反芻動物、單胃動物如家禽（例如烤肉用小雞及火雞）及豬中促進生長。使用本發明抗生素以在動物如家禽、豬及牛中促進生長之施用劑量及施用方式將對熟諳獸醫技藝者很容易確定。典型地，本發明為生長促進之抗生素將在其飼料中施用至動物。

例如，較佳地，抗生素10381y可以粉末或粒狀製備，而內含於具合適惰性載體如黃豆粉、米糠及石灰石之預混料，其然後調和至動物之飼料中。以烤肉用小雞而言，抗生素10381y有效以在小雞中促進生長之量係自約0.5至約11毫克/公斤飼料，較佳地約1至約2毫克/公斤飼料及最佳地約1至約1.5毫克/公斤飼料。以豬而言，抗生素

五、發明說明(9)

10381y有效以在豬中促進生長之量係自約1至約55毫克／公斤飼料，較佳地約2至約6毫克／公斤飼料，最佳地約2至約3毫克／公斤飼料。

較佳具體實施例之說明

不需進一步之推敲，相信熟諳此技藝者可使用前述之說明將本發明實施至其最完全之境界。以下詳述之實施例說明如何製備本發明之不同化合物和／或進行不同之方法及僅作為說明之用而不用以限制前述之揭示。熟諳此技藝者將很快地認知自對反應物和對反應條件及技術兩者之程序之合適變異。

製備 1 10381B 抗生素複合物之分離

自阿金尼氏鏈黴菌發酵之全液以氫氧化鈉調整至 pH 10。該液然後以 2 x 0.5 體積之乙酸乙酯萃取及分析 (HPLC) 以確認萃取完成。合併之萃取液經濃縮 (旋轉裝置、真空、40℃ 水浴) 至 0.4 全液體積 (部份 10381b 複合體會沈澱)。在攪拌時緩慢地加入 1 體積庚烷及混合液允許靜置幾分。其以 1 滴庚烷檢查以確定沈澱完全。當需要時，可再加入些庚烷至漿中。混合液冷至 4℃ 及沈澱由過濾或離心分離。其以庚烷清洗、乾燥 (40℃ / 真空) 至恆重及由 HPLC 分析。

製備 2 10381B 抗生素複合物 (參照圖式 A) 之分離

五、發明說明(10)

自阿金尼氏鏈黴菌發酵之全液以1體積之乙酸乙酯在收獲pH(約7.5)下萃取。生成之乙酸乙酯萃取液濃縮至30克/升。2體積之庚烷加入至濃縮液及其冷卻至-20℃2小時。其然後經離心、傾倒、以庚烷清洗及再離心和傾倒及最後乾燥以獲得粗10381b複合物。

實施例1 抗生素10381Y(少量)之製備

少量之不純10381y可由於Zorbax 5C8以水-乙腈(ACN)(55:45)作為移動相之層析法製備如下:

20毫克由類似於該等在以上製備1及2中描述之程序製備之粗10381b複合物(具如HPLC所測定之85%10381b成分及未知量之10381y成分)溶於1.0毫升移動相水-乙腈(ACN)(55:45);此溶液之100微升注射係於21x250毫米Zorbax 5C8管柱以8毫升/分移動相層析;含10381y峰(RT=17分)之溶析液經收集及合併。集中液經冷凍;有機液自冰傾倒及蒸發;殘渣自100微升甲醇及300微升甲醚中由添加800微升正庚烷結晶。

依此程序,可獲得1.5毫克57%純度之10381y。

實施例2 10381X、10381Y(較大量)、10381B及其他次要10381成分之分離

A. Delta Prep 3000 之分離

製備層析法於Waters Delta Prep 3000製備層析系統中進行。使用Waters Delta-Pak C18輻射狀壓縮管柱(50x

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(11)

300 毫米，具 100 埃孔徑之 15 微米粒子)。Delta Prep 3000 系統經組合，使得溶析液流通過 Pharmacia LKB Bromma 型號 2238 UVICORD SII UV 偵檢器 (在 250 毫微米之吸光度)，其界面連接 Pharmacia LKB Bromma 型號 2210，2 軌徑線圖記錄器及 Waters MAXIMA 820 電子層析數據收集系統。層析法以 600 psi 輻射狀壓縮於管柱內進行及流速為 35 毫升 / 分。此些條件在層析期間造成系統中約 350 psi 反壓。

B. 管柱供料之製備

供料由將 500 毫克由類似於該等在以上製備 1 及 2 中所述之程序製備之粗 10381b 複合物溶於 31.25 毫升乙腈 (ACN)-milli-Q 水 (水) - 二甲基甲醯胺 (DMF) (25 : 5 : 1.25) 之混合液中。使用渦動混合器及超音波振盪以幫助溶解。溶液在 4℃ 下貯存過夜，在其間暗色物質沈澱。混合物在 Beckman 型號 J2-21 離心機中心 5000 rpm 離心 15 分。固體片由 HPLC 分析及發現含 < 1 毫克 10381b 成分。澄清供液經傾倒及在 4℃ 下貯存直至層析法之需要。此澄清液之固形物含量係由將 1 毫升溶液在稱重之鋁盤中以氮氣流蒸發測定，同時經蒸氣加熱之熱板施熱至盤上直至溶劑蒸發，然後將盤置於蒸氣加熱之真空塔內 10 分。盤然後再稱重。

在本實驗中，固形物經測定為 16 毫克 / 毫升。

五、發明說明 (12)

C. 移動相之製備

可使用包括 60 : 3 : 27 比值之水 - ACN-四氫呋喃 (THF) 之移動相。然而，移動相之組成亦可為 68 : 3.3 : 28.7 之比值或任何相似之比值。使用第一個比值，樣品在 10 毫升 / 分之流速下載入 1 分，接著以 35 毫升 / 分之流速溶析 50 分。使用第二個比值，管柱溶析 60 至 70 分之總時數，如所需地以完成 b 成分之層析。

除水 - ACN - THF 移動相外，亦可應用含醋酸銨 - ACN 之移動相。然而，此移動相經發覺較不有效。

預期在更大量之高成本 UV 級四氫呋喃 (THF) 下，在移動相中使用 "非光譜" THF (Burdick & Jackson)。其他成分則如前述。此實驗之 HPLC 追蹤導致結論，即為此實驗之目的，UV 級與非光譜級 THF 間並無感知之差異和非光譜級 THF 並不干擾在 10381b 成分之 254 毫微米之吸光。先前之實驗已顯示非光譜 ACN 同樣地不干擾高於 220 毫微米之 UV 吸光值。

D. 樣品收集及集中液形成

管柱流出液於 Pharmacia LKB Bromma 型號 2211 SuperRac 區分收集器中以 30 秒區分收集。使用線圖記錄作為指引 v-、w-、x-、y-、z1、z2 及前 -b 成分區分形成集中液。

1) 成分 10381x 及 10381b 之處理

五、發明說明(13)

成分 10381x 及 10381b 經收集及分開集中直至各可達到 4 升。各集中液然後在 Buchi 型號 RE-121 減壓濃縮器中接受旋轉蒸發，在 40°C 浴溫及 ~40 Torr 之真空下以除去有機層。減壓濃縮器之冷凝單元由 Endocal RTE-5B 冷循環浴在 4°C 下冷卻。各集中液濃縮至約 1/5 體積，在其濃縮期間形成沈澱。濃縮液然後在 4°C 下貯存過夜。第二天各濃縮液在具 JA-10 頭之 Beckman J2-21 冷凍離心機內以 5000 rpm 離心 20 分。上清液倒入分開之集中液。沈澱片再以少量（幾毫升）上清液成漿，然後轉入 50 毫升無菌可丟棄離心管。每次獲得 4 升溶析集中液，其如上述地處理及加入沈澱片。當試管約 1/2 滿時，其於具 JA-14 頭及 50 毫升連接杯之 Beckman J2-21 冷凍離心機內以 5000 rpm 離心 20 分。上清液經傾倒及加入至原上清液集中液。沈澱片以幾毫升 milli-Q 水（足以將片成漿）清洗，然後以 5000 rpm 再離心 20 分及上清液經傾倒和如前地加入至上清液集中液。清洗之沈澱片於 Virtis Unitrap II 冷凍乾燥機內乾燥。

在本實驗中，上清液由 PHLC 分析及發現含僅少量之成分 10381b 和 10381x，較沈澱之產物不純。其因此棄置。

2) "y" 峰集中液之處理

y-峰區分集中至 2 升、如上述為 x-及 b-集中液地接受旋轉蒸發、然後再層析。y-濃縮液載入 Delta Prep 之體積可每次不同，但通常自 80 至 150 毫升，根據可得物質之總量而定。區分係如上收集及含 x-和 b-成分之區分再加入其各

五、發明說明 (14)

自之集中液。含純化 γ -成分之區分經集中、在旋轉裝置內在 40°C 浴溫及 40 Torr 真空下濃縮成水層及以 2 x 0.1 體積二氯甲烷萃取。萃取液根據純度 (HPLC) 集中、濃縮、轉至 20 毫升小藥瓶、蒸發及自少量丙酮中以 3 體積庚烷結晶。漿液經離心、傾倒上清液、結晶以庚烷清洗及在約 40 Torr / 30°C 下乾燥。

以一次層析成分 10381 γ 之最後 2 升集中液而言，改進之方法可使用如下：集中液經濃縮成水層及以 0.1 體積二氯甲烷萃取 2 次；萃取液經合併、濃縮至少量，較至稱重之 20 毫升閃爍藥瓶及以濾過之氮在室溫下吃乾。乾燥之物質再溶於 5 毫升移動相水-ACN-THF (68 : 3.3 : 28.7)，以便第二次層析。 γ -峰區分經集中及如上進行。

在本實驗中可得 97% 純之 10381 γ 。

為分析起始物溶出液及純化 10381 γ ，可使用 Whatman 5-C8 管柱及在 1 毫升 / 分之 0.01 莫耳濃度 pH 5.5 磷酸鈉-ACN (55 : 45) 且在 248 毫微米下偵測。然而，具有 1 毫升 / 分之 0.01 莫耳濃度 pH 5.5 磷酸鈉-ACN-THF (60 : 3 : 27) 之移動相且在 248 毫微米下側測之 Nucleosil 5-C18 管柱允許成分 10381b 自成分 10381 γ 之較佳分開。

E. 結論

為本實驗，使用 Delta Prep 3000 以在 180 次進行中處理約 5.2 克粗 10381b 抗生素複合物，包括 10381 γ 之 16 次第二次層析，導致以下成分之總生產：約 1484 毫克 10381b、

五、發明說明 (15)

約 379 毫克 10381x 及約 50 毫克 10381y。

實施例 3 抗生素 10381Y (純式) 之製備

最純之 10381y 可由於 Zorbax 5C8 中以水 - 四氫呋喃 - 乙腈移動相雙層析製備如下：

21 x 250 毫升 Zorbax 5C8 管柱以水 - 四氫呋喃 - 乙腈移動相平衡；200 微升含 9.5% 10381y 及由類似於該等在以上製備 1 及 2 中所述之程序所製備之粗 10381b 複合物之 100 毫克 / 毫升二甲基甲醯胺 (DMF) 溶液經注入及在 8 毫升 / 分下展開；具 10381y 之析出液經收集；及管柱在下一供液注入前以 80% 水性乙腈清洗 15 分 (管柱亦於此溶液中貯存過液)。自一系列分開之 10381y 析出液經集中、濃縮成水層及以二氯甲烷萃取；萃取液經蒸發及殘渣再溶於二甲基甲醯胺，以便第二次層析。10381y 析出液再濃縮及以二氯甲烷萃取；萃取液濃縮成漿及結晶由添加正庚烷完成。少量 (其難以此方式分離) 可替代地由將萃取溶劑蒸發及將殘渣自第三丁醇溶液冷凍乾燥分離。

在本實驗中，可自 300 毫克粗 10381b 複合物獲得 65 毫克分析純之 10381y。

本發明之 10381 成分之分析 HPLC 滯留時間 (其由使用 4.6 x 250 毫米 Zorbax 5C8 管柱以 1 毫升 1 分水 - THF - ACN (60 : 27 : 3) 獲得) 係給定於以下之表 IA。

實施例 4 抗生素 10381Y (式 IV) 及其他 10381 抗生素

五、發明說明(16)

之結構之測定

抗生素 10381y 之結構係由 NMR 光譜儀及質譜儀決定。由 NMR 鑑定之標準方法係由相關性光譜法 (COSY) 使所有 H-H 連接性相關，及藉異核相關性光譜法 (HETCOR) 實驗將此資料轉至碳主幹。在高度不飽和分子 (如 10381y) 上形成之困難，係因為大量之未質子化碳代表在序列上之中斷點。在此些情形下，使用較不敏感之交互作用如核過豪撒 (Overhauser) 增強 (NOE) 及廣效 C-H 相關性以連接許多分離自轉分裂系統。如此實驗之應用及分析導致抗生素 10381y 之鑑定為 10381b 減去 2 個末端去氫丙胺酸殘渣。

因此，抗生素 10381y 已經鑑定為式 IV 之化合物，其在以下之圖式中係 52-去 [1-[[[1-(胺基羧基) 次乙基] 胺基] 羧基] 次乙基] - 磺黴素 I。所有 ^1H 及 ^{13}C 在分子中共振之完全分配係呈現於以下之表 II。

使用類似之程序，其他成分之 ^1H 共振經發覺如下：

式 I 之抗生素 10381v：8.14、8.46、8.29 / 7.84、8.81、9.86、5.60 / 5.65、6.41 / 5.73、9.15、9.89、6.51、1.78、2.58、8.43、6.43、8.50、3.29、9.40、6.25、4.48、1.21、5.36、2.55、4.37、8.10、4.16、1.10、5.18、8.47。

式 VII 之抗生素 10381 前 -b：7.49 / 7.91、5.63 / 6.10、9.10、5.71 / 5.71、10.03、6.52 / 5.94、10.48、8.24、8.48、8.64、9.97、5.57 / 5.53、6.49 / 5.76、9.21、9.71、6.57、1.76、2.62、8.21、4.73 - 4.84、8.75、

五、發明說明 (17)

9.50、6.27、4.49 - 4.58、1.20、4.95、2.54、4.49 -
4.58、8.10、4.18 - 4.27、1.13、5.23、8.42。

式 VI 之抗生素 10381z2： 7.50 / 7.91、5.64 / 6.10、
9.09、5.72 / 5.72、10.04、6.53 / 5.94、10.48、8.24、
8.47、8.66、9.88、5.62 / 5.53、6.49 / 5.73、9.22、
9.71、6.56、1.77、2.55、8.23、4.76、8.78、9.46、
6.44、1.77、2.62、4.59、8.07、4.25、1.12、5.17、
8.44。

式 III 之抗生素 10381x： 7.50 / 7.91、5.66 / 6.12、
9.09、5.70 / 5.75、10.12、6.67 / 5.96、10.49、8.20、
8.56、5.02、8.25、1.49、2.59、8.25、5.42、8.15、
1.60、4.18 / 4.57、8.85、2.53、4.37、8.03、2.17、
1.04、1.05、8.37。

式 II 之抗生素 10381w： 7.67 / 8.15、5.81 / 6.57、
10.69、8.20、8.53、5.01、8.24、1.48、2.66、8.24、
5.43、8.16、1.60、4.18 / 4.56、8.70、2.53、4.37、
8.04、2.17、1.00、1.00、8.38。

式 IX 之抗生素 10381t： 8.01、7.82、8.49、8.13、
2.53、5.02、1.49、8.19、8.23、5.43、1.60、8.15、
2.53、4.55、4.20、8.86、4.38、2.18、0.96、0.96、
7.90、8.36。

質譜數據係使用電噴霧離子化獲得及在 m/e 1130.0 之離子顯示與 $M+Na^+$ 加成物相對應。抗生素 10381y 為平均質量因此測定為 1084.0 amu，其與式 $C_{48}H_{48}O_{14}N_{14}S_2$ 之分子一

五、發明說明 (18)

致 (計算之平均分子量 = 1107.1)。

使用類似於該等上述之程序，本發明其他 10381b 抗生素之結構及平均質量經發覺如下：式 I 之化合物係抗生素 10381v (1037.7 amu)；式 II 之化合物係抗生素 10381w (815.7 amu)；式 III 之化合物係抗生素 10381x (953.9 amu)；式 IV 之化合物如上所記地係抗生素 10381y；式 V 之化合物係抗生素 10381z1 (1201.5 amu)；及式 VI 之化合物係抗生素 10381z2 (1185.7 amu)；式 VII 之化合物係抗生素 10381前-b (1215.1 amu) 及式 IX 之化合物係抗生素 10381t (746.2 amu)。

實施例 5 抗生素 10381B 成分群之最小抑制濃度測定

10381b 成分群之生物活性係使用上述之試管內最小抑制濃度 (MIC) 分析與 10381b 複合物者比較。該分析測定化合物抑制某些型態之厭氣細菌生長之能力，其通常棲息在家禽、豬及牛之腸中。

I. 化合物製備

2 毫克 / 毫升所要測試之藥之溶液於 10% v/v 乙醇 / 水中製成。此母液然後稀釋至每毫升 1 毫克及然後經一系列 10 次 2 倍稀釋液之進一步稀釋。在各濃度下，一部分置於無菌培養皿中。9 體積之熔培養基然後加至各皿，混合及允許在室溫下固化。此些皿然後轉至 Coy 槽及允許乾燥和以無氧氣壓平衡。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

修正
年 月 日
88. 8. 10
補充

五、發明說明 (19)

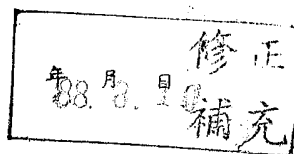
II. 菌種製備

用於 MIC 測試之生物經接種至培養液及在使用前於 39°C 下培養 18 - 24 小時。培養液然後稀釋至與 0.5 MacFarland 硫酸銀標準相同之濁度，除了以 1:1 稀釋之豬分離物 P108-3C1、P105-1C3 及 P105-1C4。所有接種及稀釋皆在厭氣槽內，使用培養液及注射筒自丁基橡皮塞轉移操作。

新鮮製備及稀釋之培養液載入 Steers 複製裝置之井中。此設備可將各 32 種菌之 10 微升分散至預培養之培養皿上。在接種後 1 小時，接種物已經吸收及培養皿經翻轉和在 38 - 39°C 下培養 48 小時。皿然後自槽中取出及測定測試化合物之 MIC。MIC 係以化合物在培養皿上防止測試生物之可檢出生長之最低濃度。以無法在生長與無生長間產生清楚分界點之化合物而言，其 MIC 被認為係較高濃度之稀釋，其在測試區域內生成生長之不明顯霧團或 3 - 5 個菌落。因此，各組測試培養皿產生 32 個測試生物各自之個別 MIC 值。

III. 結論

在表 III 中，使用上述之分析，比較以下之抗生素：10381b 複合物、10381b2、10381x 成分及 10381y 成分。雖然在成分間活性之實際差異所測試之個別微生物而變，自表 III 很明顯地，"Y 峰" 或抗生素 10381y 較個別 b 和 x 成分或



五、發明說明 (y)

10381b 複合物一致地更有效 (較低之 MIC 濃度)，特別地對抗梭菌及鏈球菌屬菌，其已經報導涉及在雞及豬中之生長壓抑，然而其維持低活性對抗瘤胃厭氣菌如埃及巨球形菌及反芻月形單胞菌 (其係在反芻動物中菌相之必要成分)，因此除其在單胃動物如家禽或豬中之生長促進活性外，建議其在反芻動物中用為生長促進劑。

以下之表 IV 給定一些 10381b 成分群及複合物之附加生物活性數據，其數據係使用上述之分析獲得。在表 IV 中所述之研究所發現之成分 x、b2 及 y 之生物活性數據輕微地不同於自在表 III 中所述之研究所得之相當者。如此之差異通常見於比較試管內抗細菌分析之分開實驗間之結果，特別地當測試不同批次之抗生素時。在此些差異 (及 x 成分對抗菌株 P10381C1 所得不一致結果) 之外，兩個分析間之結果係一致的及指出最少在試管內成分 y 和 b2 係最有效的。成分前 -b、v 及 w 如成分 x 地係相當低效力的。

實施例 6 10381B 成分 X、Y、W、V、前 -B、Z1、Z2 及 T 之分離及純化

10381b 複合物係由將阿金尼氏鏈黴菌於營養培養基中發酵產生。粗產物由乙酸乙酯之萃取、隨後濃縮及以庚烷沈澱獲得。所得之物質然後於不同之撐體如下述地層析：

10381x。粗 10381b 複合物於載有 Delta-Pak C18 管柱之 Waters Delta-Prep 中，以 32 毫克量層析，使用 35 毫升 / 分之水 -ACN-THF (67 : 3 : 30) 移動相。層析以設定在 250

五、發明說明(21)

毫微米之 Pharmacia 2238 UVICORD SII UV 偵檢器監視以切取 10381b、10381x 及其他次要成分之區分。10381x 析出液經集中及在 4℃ 下貯存。當已收集多於 50 毫克化合物時，集中液經濃縮至水漿及離心。含少量 10381b 之上清液棄置及固體片轉至小藥瓶和冷凍乾燥。

物理特徵係如下：

此物質經由 HPLC 發覺 >90% 純，含有微量 10381b、10381y 及未知之極性不純物。其用以 MS 及 NMR 實驗，而不，再由第二次層析純化。

10381y。此化合物係由如 10381x 之相同層析法分離；然而，雖然 10381y 析出液較 10381x 者較不純，其先濃縮成水層及以 2 x 0.1 體積二氯甲烷萃取。萃取液經合併、蒸發及再溶於移動相作第二次層析。新析出區分再集中、濃縮成水層及萃取至二氯甲烷中。萃取液以 0.2 體積水連續清洗、合併及蒸發。殘渣 (43 毫克) 轉至閃爍藥瓶及自 1 毫升二氯甲烷以 3 毫升正庚烷作為對溶劑結晶。漿經離心，上清液以吸管移走及結晶以 1 毫升庚烷清洗。

物理特徵係如下：

所得 35 毫克 10381y 根據 HPLC 分析為 98% 純。

10381w。此化合物由所述為 10381y 之雙層析法分開及純化。自第二次層析所得之固體 (34 毫克) 較相對之 10381y 區分不純，因為在粗複合物中 10381w 較 10381y 含得更少。大量物質自層析管柱剝離因此污染此些固體，使其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

固體困難。其先溶於1.5毫升甲醇+1.5毫升丙酮，濾掉僅含少量10381w之脂狀物質(HPLC)；加入2毫升正庚烷+0.1毫升甲苯(避免形成二層)，然後沈澱生成終產物，10381w。

物理特徵係如下：

3.3毫克10381w係以74%純度獲得。

10381v。此化合物如10381w地由雙層析法及萃取適當之析出集中液分離。在蒸發溶劑後所得之固體係足夠純，而自1毫升丙酮以2毫升正庚烷結晶。漿經離心、除去上清液及殘渣以庚烷清洗和乾燥。

物理特徵係如下：

可得19毫克82%純之10381v。

10381前-b。此化合物自含18%10381前-b之粗10381由單一層析製備，於21x250毫米Zorbax(7微米)C8管柱中，以水-ACN-THF(70:3:27)作為移動相；400毫克起始物溶於8毫升DMF及在4次下以8毫升/分之極低流速通過管柱。含10381前-b之析出液經集中(約1.2升)，濃縮成~300毫升水層及冷凍乾燥生成終產物10381前-b。

物理特徵係如下：

可得11.5毫克層析純之10381前-b固體。

10381z1。此化合物係由單一層析法於PrepPak C18管柱中製備。具10381z1之最後析出集中液濃縮成含26毫克10381z1之500毫升水層(HPLC假定與10381b相同之反應

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(23)

因子)。二氯甲烷萃取液僅含少量之化合物，乙酸乙酯在 pH 6及 pH 9下僅略佳。部分萃取之水層因此經冷凍乾燥。

物理特徵係如下：

可得 21毫克 91% 純之 10381z1。

10381z2。此化合物自產生 10381z1 之相同層析之 10381z2 析出液分離。析出集中液濃縮成 470 毫升水層；生成之沈澱由離心分離及冷凍乾燥。

物理特徵係如下：

所得 16毫克 10381z2 係 80% 純。

10381t。此化合物自複合物分開及然後由上述為 10381y之雙層析法純化：30毫克量於載有 DeltaPack C18 管柱之 Waters DeltaPrep中層析，使用 35毫升/分之水-ACN-THF (67:3:30)移動相。具 10381t之析出區分經集中，在 4°C 下貯存直至收集足夠之析出液（具約 5 毫克之約 1 升）及然後濃縮成水層和以二氯甲烷萃取）。萃取液經合併及蒸發；殘渣溶於 DMF 及於 21x 250 毫米 Zorbax C8管柱中以 8 毫升/分之水-ACN-THF (70:3:27)移動相層析。含層析純 10381t之析出區分經合併及蒸發生成固體終產物 10381t。

物理特徵係如下：

可得如由 HPLC測定之 4 毫克 10381t固體。

本發明 10381t成分之分析 HPLC滯留時間（其由使用 4.6 x 250 毫米 Zorbax 5C8管柱，以 1 毫升/分水-THF-ACN (70:27:3) 獲得）係給定於以下之表 IB中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(24)

表 IA

10381B 成分之分析 HPLC 滯留時間

10381	RT(分)	RT _b *
v	7.7	0.56
w	8.8	0.66
x	10.2	0.76
y	11.9	0.89
前 - b	12.6	0.94
b	13.3	1.00
z1	14.9	1.11
z2	16.9	1.25

* 相對於 10381b 成分滯留時間之滯留時間，相同之 HPLC 系統。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(25)

表 IB

10381T成分之分析 HPLC 滯留時間

10381	RT(分)	RT _b *
b	54	1.00
t	19	0.35

* 相對於10381b成分滯留時間之滯留時間，相同之HPLC系統。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(26)

表 II

10381Y在 d_6 -DMSO中之NMR化學位移

位置	^1H	^{13}C	位置	^1H	^{13}C
7b	8.12 br s		31		154.1 ^b
7a	7.61 br s				
8		164.9	31'	2.57 ^a s	11.5 ^b
9		133.7	32		123.5
9'b	5.80 s	103.0	32'b	1.76 d	13.7
9'a	6.55 s		32'a	6.50 q	129.7
10	10.56 br s		33	10.03 br s	
11		161.1	34		159.2
12		149.3	35		148.8
14		146.7	37		167.5
15		130.8	38	8.45 s	127.0
16	8.71 d	140.1	39	6.46 d	77.1
17	8.29 d	121.8	39'	3.24 s	55.4
18		138.7	40	8.35 br d	
20		158.3	41		161.3
21	8.59 s	140.0	42		129.1 ^b
22		129.6	44		156.3
22'b	5.68 s	112.9	45		153.5 ^b
22'a	5.80 s				
23	9.98 br s		45'	2.56 ^a s	11.5 ^b
24		162.7	46		120.6
25		133.4	46'b	4.46 sext	62.5
			46'a	6.27 d	136.7
25'b	5.78 s	105.2	46'b2	4.93 d	
25'a	6.40 s		46'b1	1.21 d	22.8
26	9.18 br s		47	9.37 br s	
27		159.8	48		169.7
28		128.6 ^b	49	4.34 dd	59.3
30		156.8	49'	4.15 sext	66.2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

表 II (續前)

10381Y在 d_6 -DMSO 中之 NMR 化學位移

位置	^1H	^{13}C
49'b	5.22d	
49'a	1.10d	20.2
50	8.17 br d	
51		160.6
52		148.8
54		162.3
55	8.53 s	127.6

a. 可互換之分配。

b. 28、31及31'系列之分配可與42、45及45'系列之分配互換。

五、發明說明 (28)

表 III

成分 10381y、x 及 b 之生物活性 (M. I. C. 於微克/毫升)

生物	菌株	複合物	10381x	10381b2	10381y
產氣梭狀桿菌 (<i>C. perfringens</i>)	P1083C1	0.4	1.6	0.4	<0.2
產氣梭狀桿菌	P1051C3	50.0	>100.0	50.0	12.5
糞鏈球菌 (<i>S. faecalis</i>)	P1051C4	12.5	50.0	12.5	1.6
牛鏈球菌 (<i>S. bovis</i>)	JB1	3.1	25.0	3.1	0.4
產氣梭狀桿菌	A83-RKP	0.4	1.6	0.8	0.4
產氣梭狀桿菌	A83-3	0.8	6.3	3.1	<0.2
產氣梭狀桿菌	A82-1	3.1	50.0	3.1	0.8
糞鏈球菌	71A01	50.0	100.0	25.0	6.3
產氣梭狀桿菌	71A02	1.6	6.3	1.6	<0.2
產氣梭狀桿菌	RF1B04	0.4	3.1	0.4	<0.2
糞鏈球菌	CCS1-03	6.3	50.0	12.5	1.6
產氣梭狀桿菌	CCS2-09	0.4	1.6	0.8	<0.2
產氣梭狀桿菌	CCS1-11	3.1	50.0	6.3	0.8
脆弱擬桿菌 (<i>B. fragilis</i>)	UC9370	50.0	100.0	25.0	1.6
產氣梭狀桿菌	UC9452	1.6	6.3	3.1	<0.2
多形擬桿菌 (<i>B. thetaiotaomicron</i>)	UC9014	25.0	50.0	12.5	<0.2
遲緩真桿菌 (<i>E. lentum</i>)	L-34	NG	NG	NG	NG
<i>B. fibrisolvens</i>	49	0.4	1.6	6.3	<0.2
<i>B. fibrisolvens</i>	D1	0.8	3.1	0.8	<0.2
埃及巨球形菌 (<i>M. elsdenii</i>)	B159	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
多對毛螺菌 (<i>L. multipanus</i>)	40	1.6	6.3	1.6	<0.2
反芻月形單胞菌 (<i>S. ruminantium</i>)	GA192	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0
反芻月形單胞菌 <i>R. amylophilus</i>	GA31	50.0	>100.0	100.0	25.0
<i>R. amylophilus</i>	H18	>100.0	>100.0	>100.0	100.0
<i>R. flavefaciens</i>	FD1	0.8	6.3	1.6	<0.2
<i>R. flavefaciens</i>	C94	0.8	3.1	0.8	6.3
嗜齒真桿菌 (<i>E. reuminantium</i>)	GA195	0.8	3.1	0.4	6.3
<i>P. ruminicola</i>	118B	<0.2	0.2	<0.2	<0.2
壞死梭桿菌 (<i>F. necrophorum</i>)	FN5052	100.0	>100.0	100.0	25.0
壞死梭桿菌	FN4070	100.0	>100.0	50.0	25.0
豬赤痢螺旋菌 (<i>S. hyodysenteriae</i>)	B204	NT	NT	NT	NT
豬赤痢螺旋菌	16-4	NT	NT	NT	NT

附註：NG = 無生長，NT = 未測試；所有 MIC 係基於質量而與純度無關。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (29)

表 IV

生物	菌株	複合物	x	前 .b	b2	y
產氣梭狀桿菌	P1083C1	0.8	100.	25.0	1.6	0.8
產氣梭狀桿菌	P1051C3	25.0	>100	>100	12.5	6.3
糞鏈球菌	P1051C4	3.1	>100	>100	3.1	0.8
牛鏈球菌	JB1	1.6	>100	50.0	0.8	0.8
產氣梭狀桿菌	A83-RKP	0.4	50.0	1.6	0.8	<0.2
產氣梭狀桿菌	A83-3	<0.2	25.0	1.6	<0.2	<0.2
產氣梭狀桿菌	A82-1	12.5	>100	>100	12.5	12.5
糞鏈球菌	71A01	12.5	>100	>100	12.5	6.3
產氣梭狀桿菌	71A02	<0.2	nt	nt.	<0.2	<0.2
產氣梭狀桿菌	RF1B04	<0.2	50.0	1.6	<0.2	<0.2
糞鏈球菌	CCS1-03	12.5	>100	>100	6.3	3.1
產氣梭狀桿菌	CCS2-09	1.6	100	50.0	0.8	<0.2
產氣梭狀桿菌	CCS1-11	<0.2	nt	nt	<0.2	<0.2
脆弱擬桿菌	UC9370	25.0	>100	>100	50.0	50.0
產氣梭狀桿菌	UC9452	1.6	50.0	25.0	1.6	0.8
多形擬桿菌	UC9014	50.0	>100	>100	25.0	50.0
遲緩真桿菌	L-34	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
<i>B. fibrisolvens</i>	49	1.6	>100	50.0	1.6	0.4
<i>B. fibrisolvens</i>	D1	0.4	100.	12.5	0.8	<0.2
埃及巨球形菌	B159	>100	>100	>100	>100	>100
多對毛螺菌	40	3.1	>100	>100	1.6	12.5
反芻月形單胞菌	GA192	1.6	6.3	6.3	1.6	<0.2
反芻月形單胞菌	GA31	nt	6.3	50.0	0.8	<0.2
<i>R. amylophilus</i>	H18	1.6	25.0	>100	1.6	<0.2
<i>R. flavefaciens</i>	FD1	0.8	100	25.0	1.6	0.4
<i>R. flavefaciens</i>	C94	1.6	>100	25.0	0.8	0.8
嗜齒真桿菌	GA195	12.5	100	12.5	12.5	0.8
<i>P. ruminicola</i>	118B	<0.2	12.5	<0.2	<0.2	<0.2
壞死梭桿菌	FN5052	100.	>100	>100	100.	50.0
壞死梭桿菌	FN4070	>100	>100	>100	100.	50.0
豬赤痢螺旋菌	B204	>100	>100	>100	>100	>100
豬赤痢螺旋菌	16-4	>100	>100	>100	>100	>100

附註：nt = 未測試

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (30)

表 IV (續前)

生物	菌株	v	w
產氣梭狀桿菌	P1083C1	100	>100
產氣梭狀桿菌	P1051C3	100	>100
糞鏈球菌	P1051C4	>100	>100
牛鏈球菌	JB1	>100	>100
產氣梭狀桿菌	A83-RKP	1.6	>100
產氣梭狀桿菌	A83-3	0.8	12.5
產氣梭狀桿菌	A82-1	>100	>100
糞鏈球菌	71A01	>100	>100
產氣梭狀桿菌	71A02	nt	nt
產氣梭狀桿菌	RF1B04	0.8	100
糞鏈球菌	CCS1-03	>100	>100
產氣梭狀桿菌	CCS1-09	>100	>100
產氣梭狀桿菌	CCS1-11	nt	nt
脆弱擬桿菌	UC9370	>100	>100
產氣梭狀桿菌	UC9452	6.3	>100
多形擬桿菌	UC9014	>100	>100
遲緩真桿菌	L-34	25.0	25.0
<i>B. fibrisolvens</i>	49	50.0	>100
<i>B. fibrisolvens</i>	D1	25.0	>100
埃及巨球形菌	B159	>100	>100
多對毛螺菌	40	>100	>100
反芻月形單胞菌	GA192	100	12.5
反芻月形單胞菌	GA31	25.0	1.6
<i>R. amylophilus</i>	H18	3.1	>100
<i>R. flavefaciens</i>	FD1	25.0	>100
<i>R. flavefaciens</i>	C94	25.0	100
嗜齒真桿菌	GA195	12.5	25
<i>P. ruminicola</i>	118B	<0.2	<0.2
壞死梭桿菌	FN5052	>100	>100
壞死梭桿菌	FN4070	100	>100
豬赤痢螺旋菌	B204	>100	>100
豬赤痢螺旋菌	16-4	>100	>100

附註：nt = 未測試

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

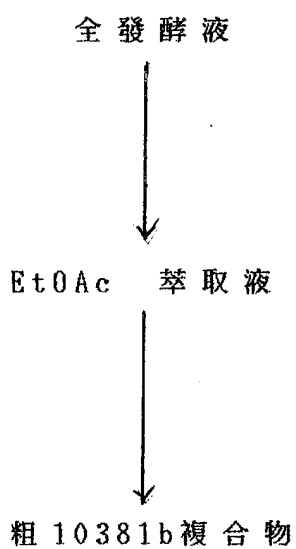
裝

訂

線

五、發明說明 (31)

式 A



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)



裝

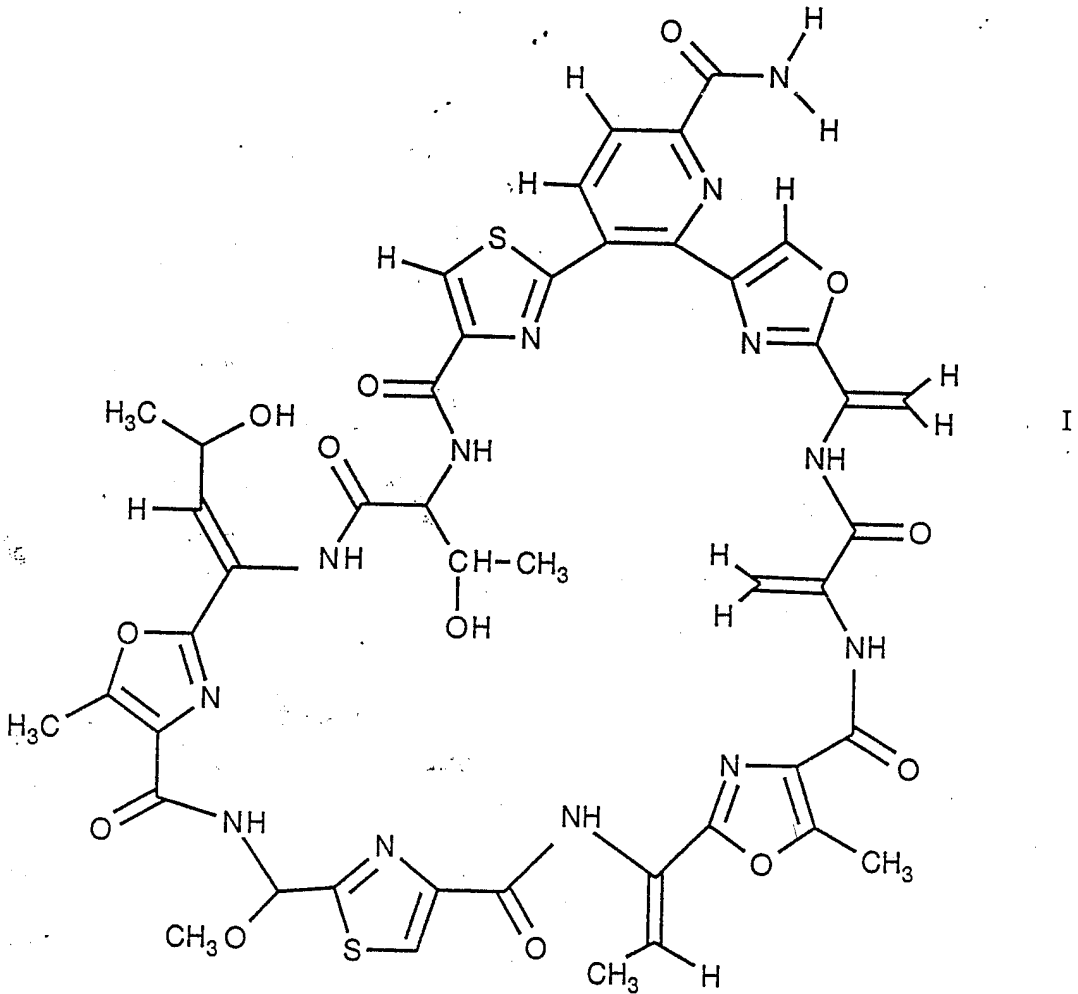
訂



線

五、發明說明 (32)

圖式



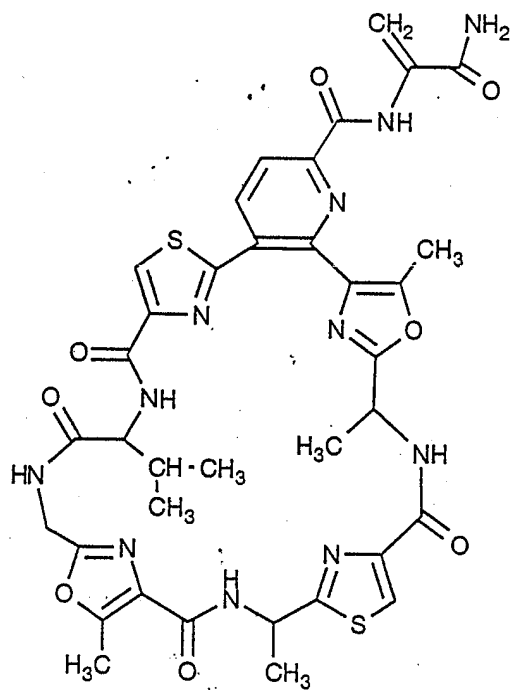
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

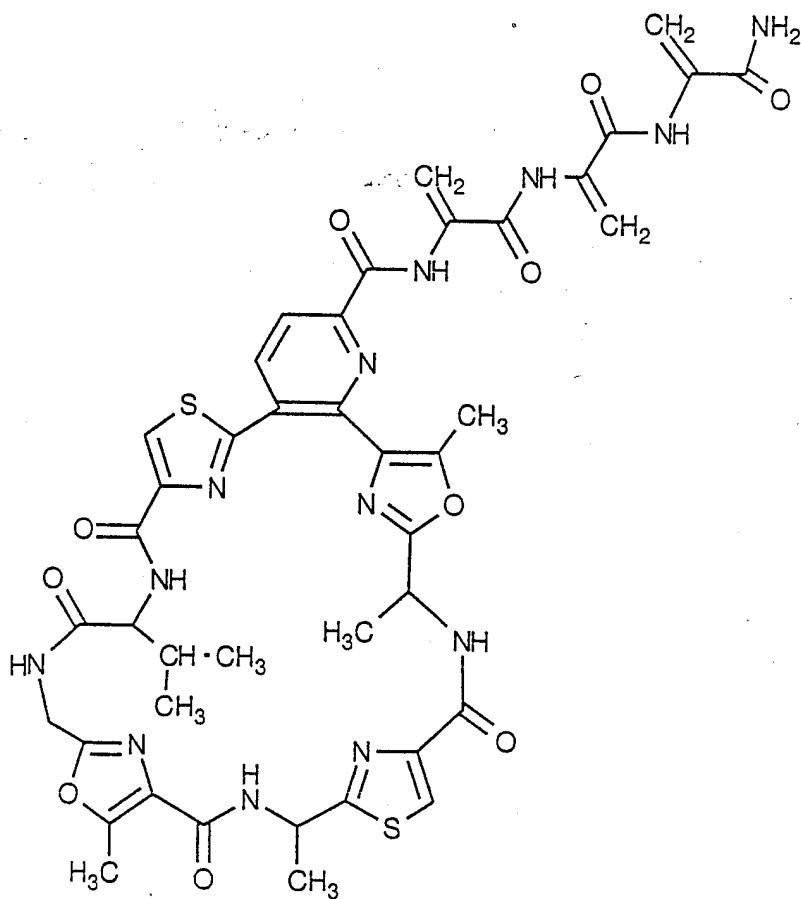
訂

線

五、發明說明 (33)



II



III

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

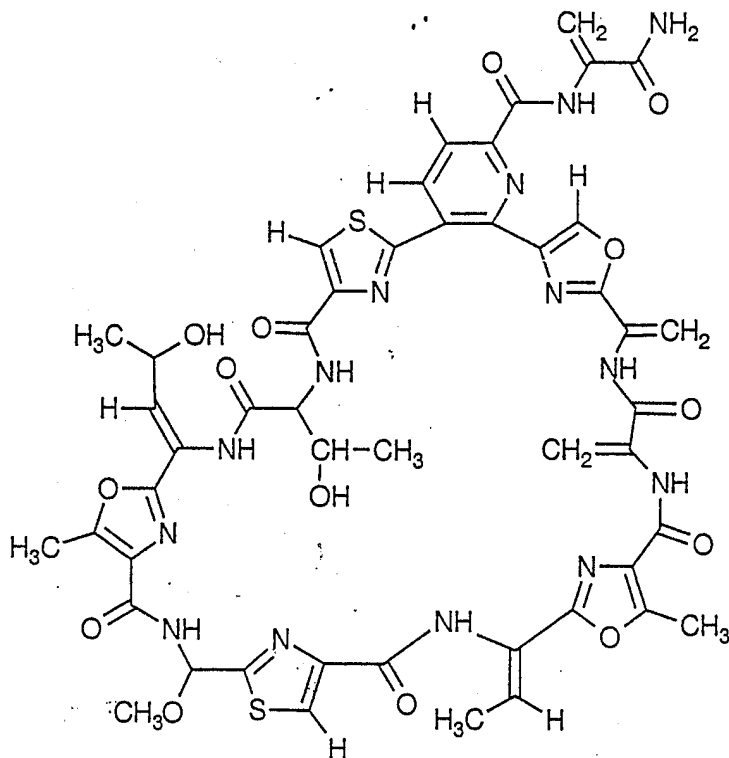
訂

線

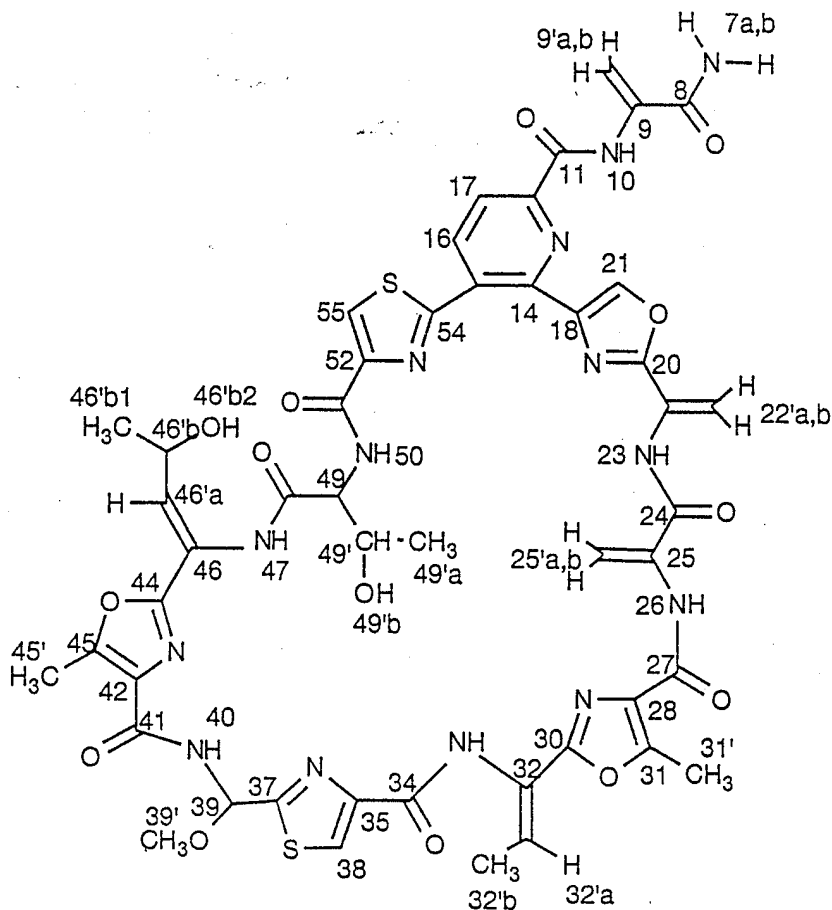
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (34)

圖式 (續前)



IV



IVA

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)



裝

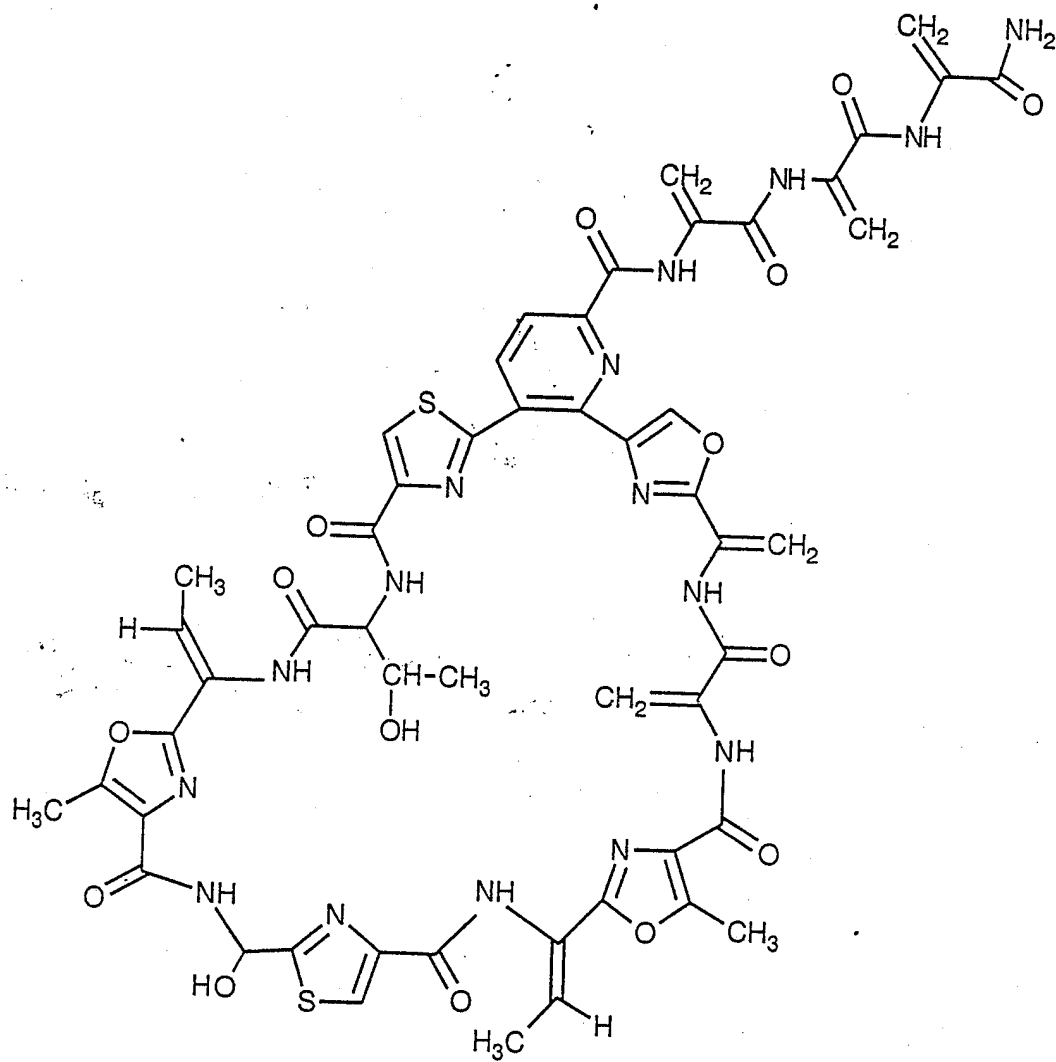
訂



線

五、發明說明 (35)

圖式 (續前)



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

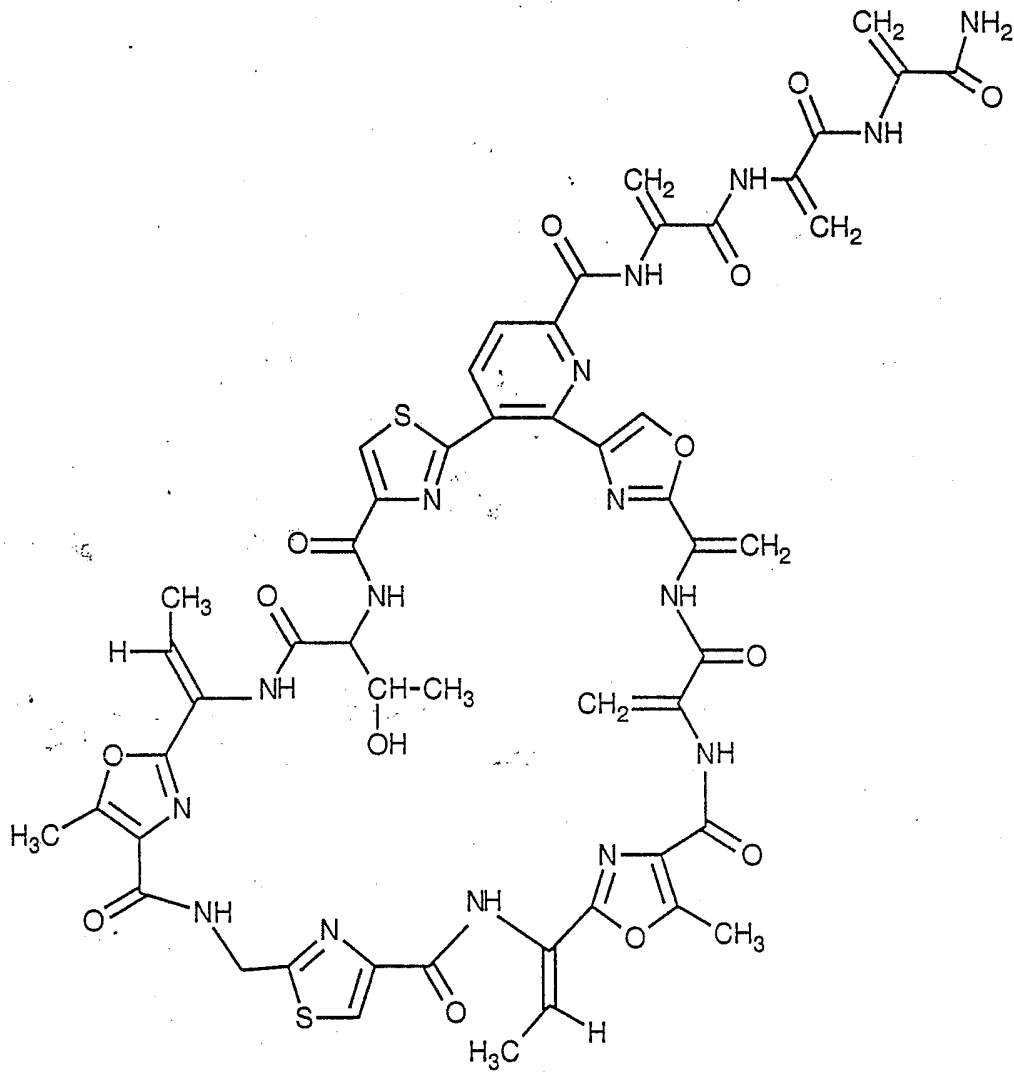
訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (36)

圖式 (續前)



VI

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

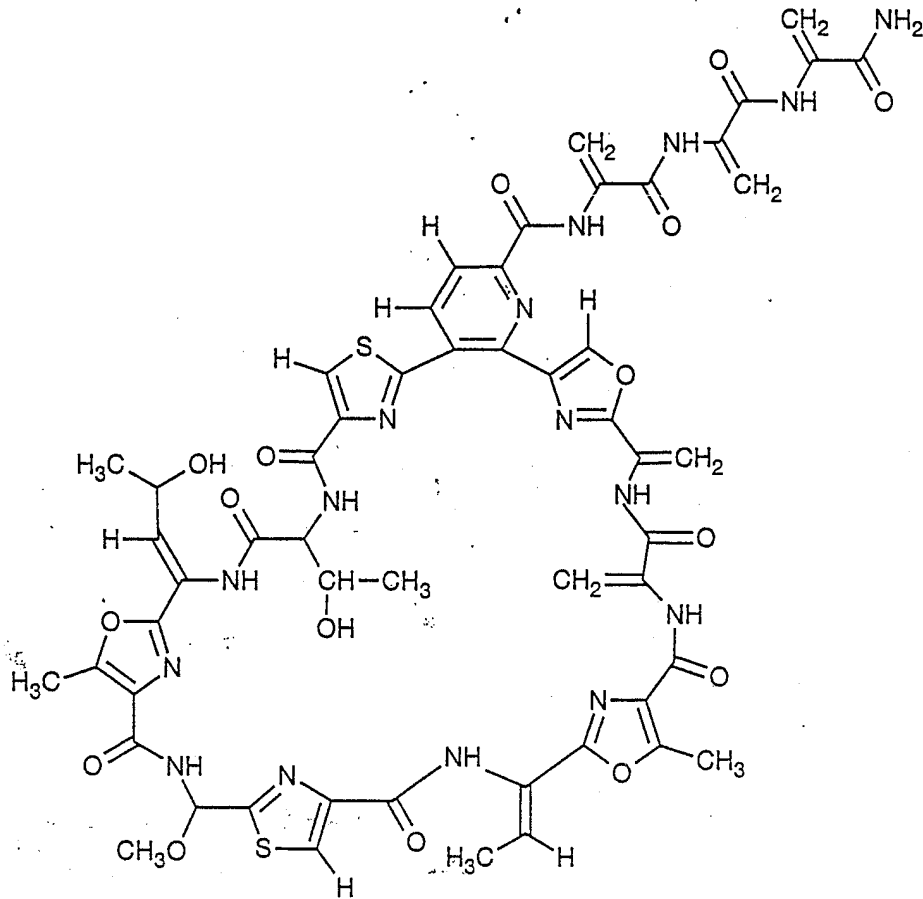
裝

訂

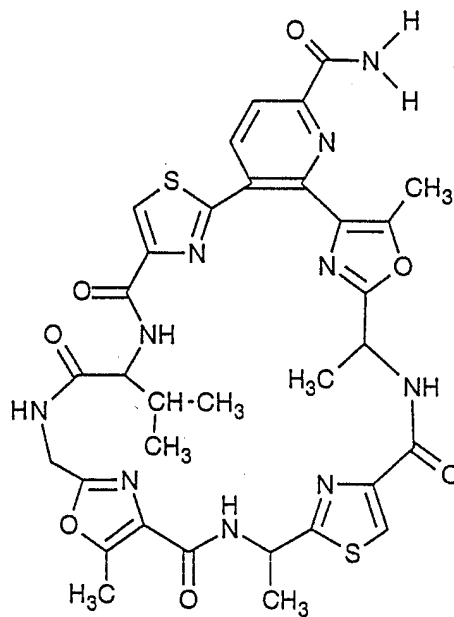
線

五、發明說明 (38)

圖式 (續前)



VIII



IX

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱: 抗生素 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, 前 - B 及 T)

抗生素 10381v、w、x、y、z1、z2、前 - b 及 t 係可由將微生物阿金尼氏鏈黴菌 (*Streptomyces arginensis*) 培養於水性培養基中並分離而產生之抗生素。抗生素 10381y 之結構如下式 IV 所示。該等抗生素可抑制選定之細菌種之生長及亦做為動物生長促進劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

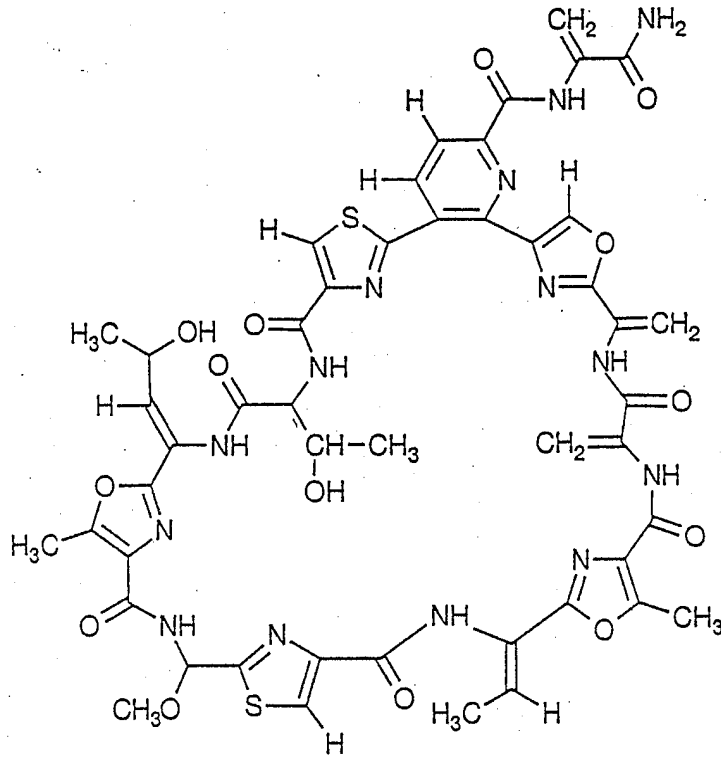
英文發明摘要(發明之名稱: "ANTIBIOTICS 10381V, W, X, Y, Z1, Z2, PRE-B AND T")

Antibiotics 10381v, w, x, y, z1, z2, pre-b and t are antibiotics producible by culturing the microorganism *Streptomyces arginensis* in an aqueous medium and isolation thereof. The structure of Antibiotic 10381y is given below as formula IV. These antibiotics inhibit the growth of selected species of bacteria and may also be useful as a growth promotant in animals.

訂

線

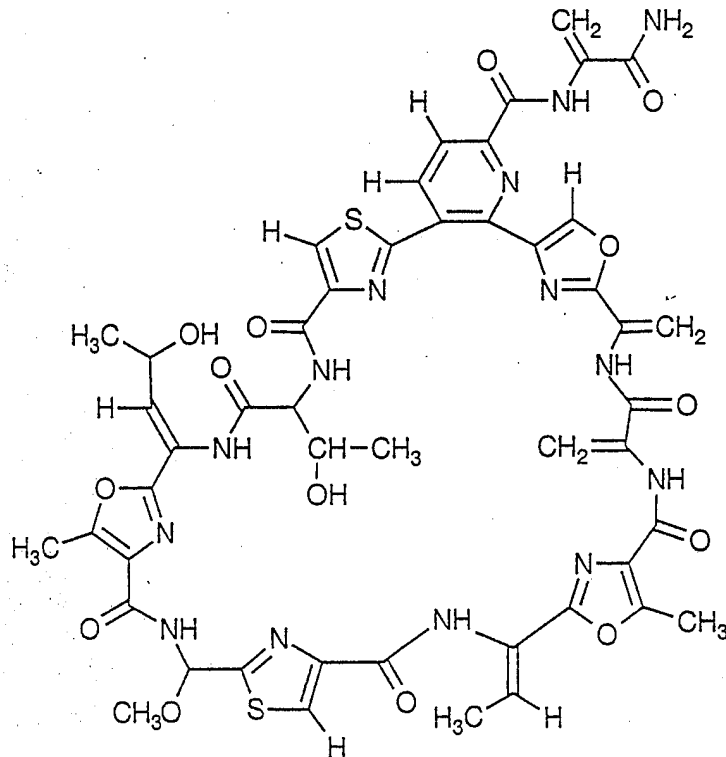
四、中文發明摘要 (發明之名稱:)



IV

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要 (發明之名稱:)



IV

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

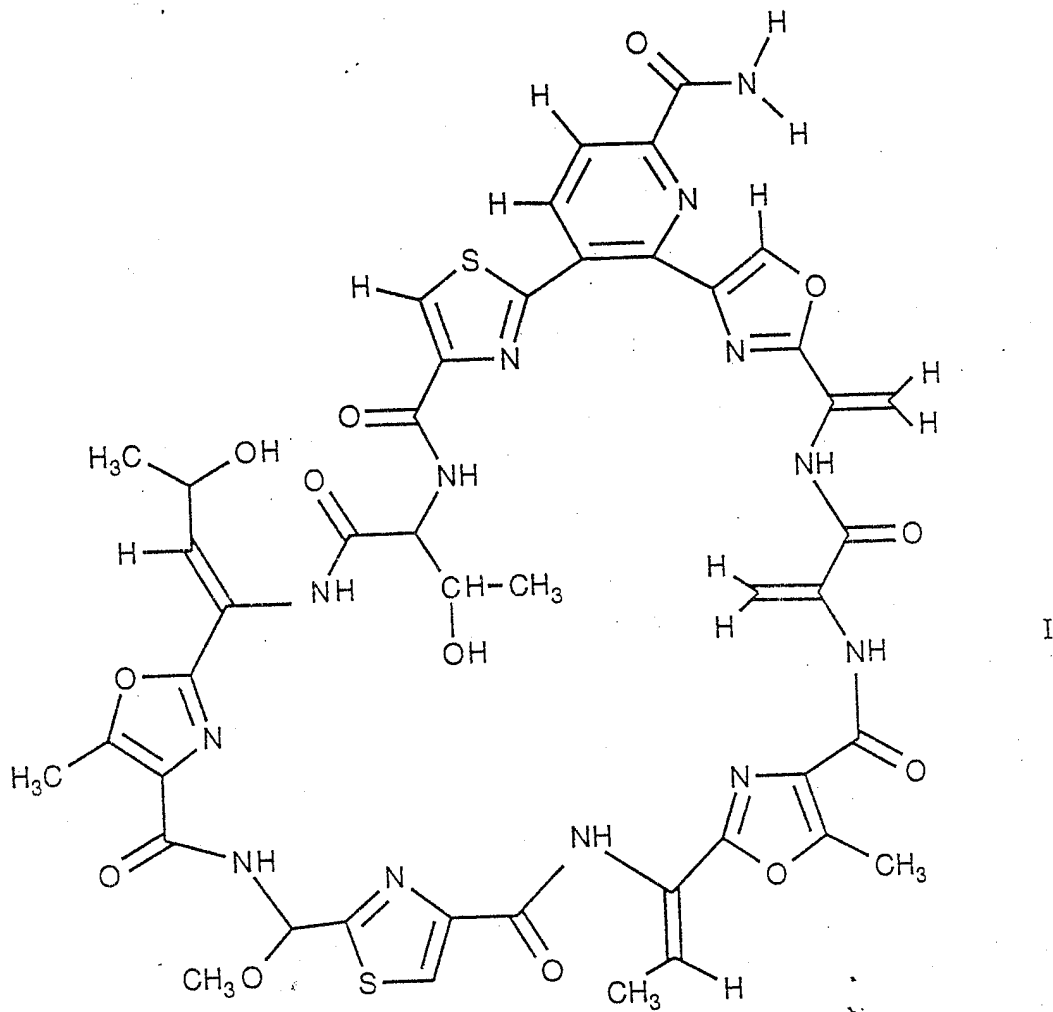
裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物：



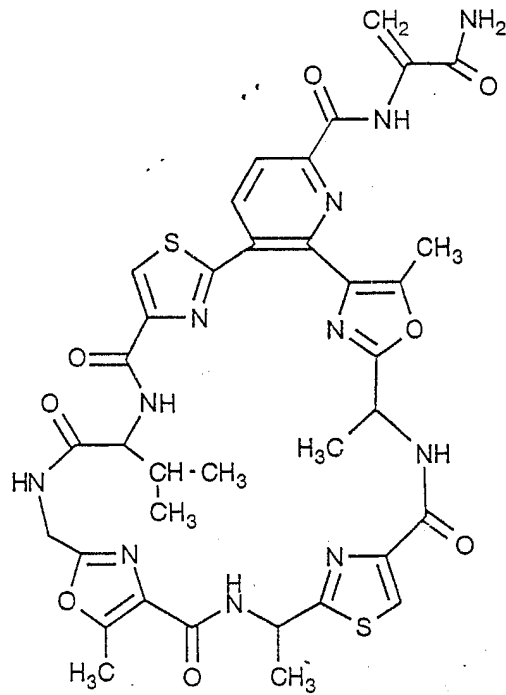
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

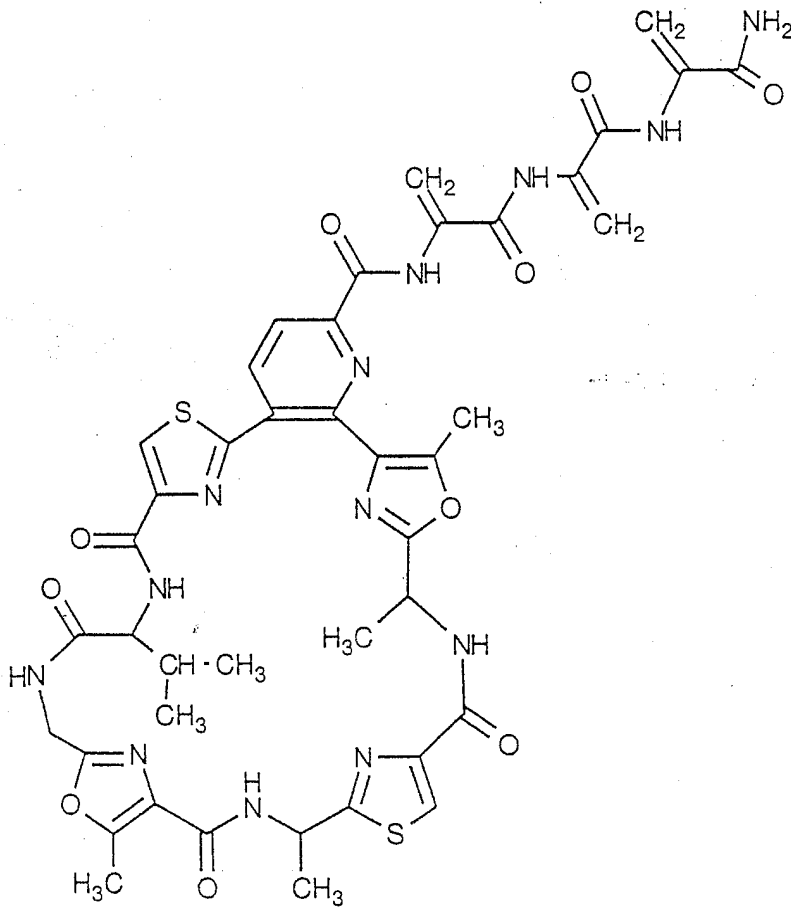
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍



II



III

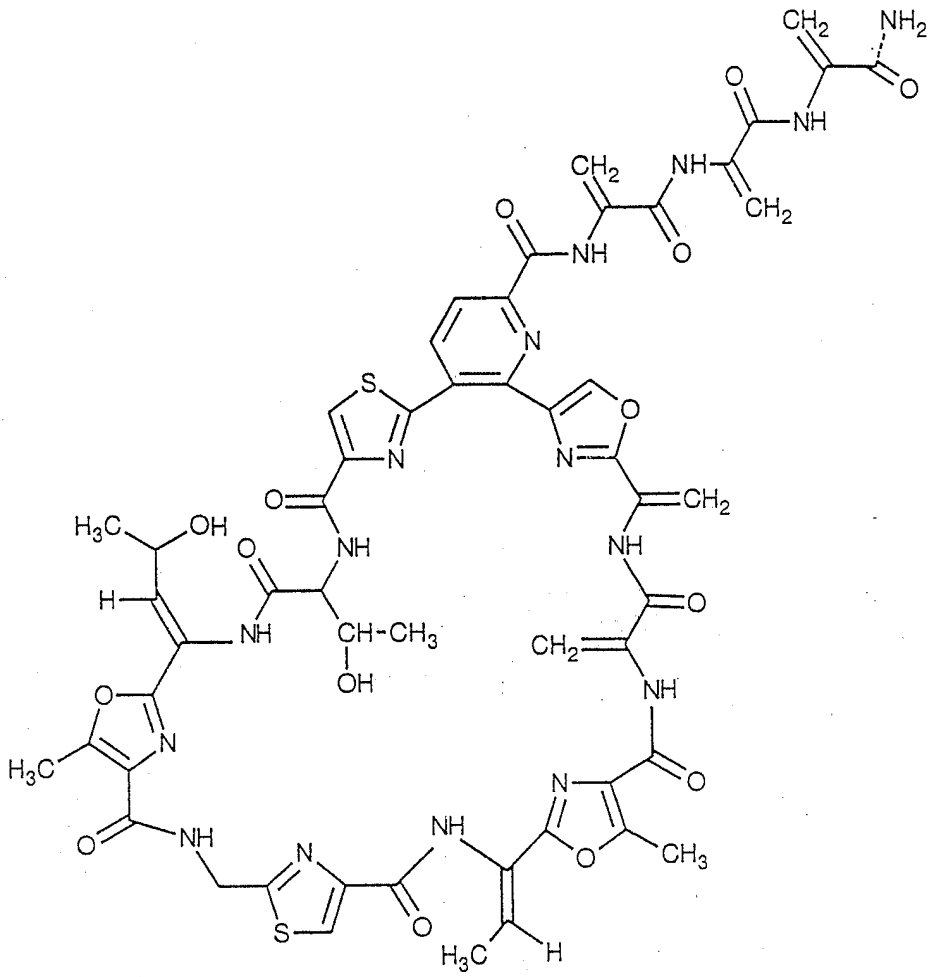
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

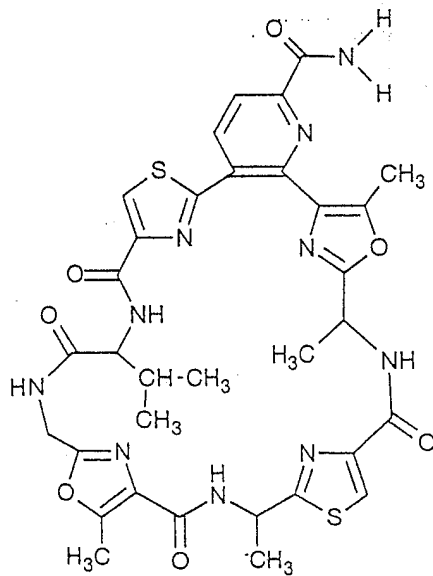
訂

線

六、申請專利範圍



VII



IX

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

- 或其藥用鹽。
2. 根據申請專利範圍第1項之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物，除其自然存在或發生者。
 3. 根據申請專利範圍第2項之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物，係呈實質純之形態。
 4. 根據申請專利範圍第1項之式 IV 之化合物，其係 52 - 去 [1 - [[[1 - (胺基羰基) 次乙基] 胺基] 羰基] 次乙基] - 磺徽素 I。
 5. 一種飼料組合物，其包括動物飼料及根據申請專利範圍第1項之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合。
 6. 一種動物預混料，其包括根據申請專利範圍第1項之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合及合適之惰性載劑。
 7. 一種促進動物生長之方法，其包括將有效量之式 I、II、III、IV、V、VI、VII 或 IX 之化合物或其任何組合施至動物。
 8. 根據申請專利範圍第7項之方法，其中該等動物係選自禽類、綿羊、牛及豬。
 9. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該動物係雞。
 10. 根據申請專利範圍第9項之方法，其中該化合物係以約 0.5 至約 11 毫克 / 公斤飼料之量口服。
 11. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該動物係豬。
 12. 根據申請專利範圍第11項之方法，其中該化合物係以約 1 至約 55 毫克 / 公斤飼料之量口服。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線