(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102404993 B
(45)授权公告日 2015.08.26

(21)申请号 201080017385.2
(22)申请日 2010.04.20
(30)优先权数据
61/170,790 2009.04.20 US
61/170,686 2009.04.20 US
61/285,525 2009.12.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.10.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/031746 2010.04.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/123894 EN 2010.10.28
(73)专利权人 马罗内生物创新公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 雷特那卡·阿索卡 萨拉汉·雷克尔
黄华章 玛佳·考伊夫尤恩
帕米拉·玛洛尼 斯蒂芬妮·舒
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 沈锦华
(51)Int.Cl.
A01N 63/02(2006.01)
A01N 43/08(2006.01)
A01N 43/72(2006.01)
A01N 35/06(2006.01)
A01P 9/00(2006.01)
(56)对比文件
US 6194194 B1,2001.07.27,说明书第5栏.
US 5393781 A,1992.02.28,全文.
Diane L. Waller et al.Toxicity of Candidate Molluscicides to Zebra Mussels (Dreissena polymorpha) and Selected Nontarget Organisms.《Journal of Great Lakes Research》.1993,第19卷(第4期),695-702.
审查员 赵永江

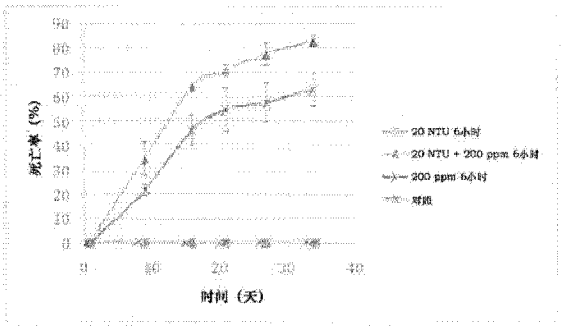
权利要求书1页 说明书29页 附图5页

(54)发明名称

用于控制软体动物的化学剂和生物学剂

(57)摘要

用于控制软体动物——腹足纲和双壳纲类的成员的组合物和方法,这些组合物包括但不限于作为活性成分的包含内酯、内酰胺、氨基甲酸酯、酰胺和/或羧酸的化合物和/或源自假单胞菌属和/或欧文氏菌属的化合物。还提供用于增加对在冷水条件下开放水域、发电厂和饮用水处理设施中的侵入性软体动物的化学控制和生物学控制的功效的方法和组合物。



CN 102404993 B

1. 一种组合物，包含有效用于控制腹足纲和双壳纲类的成员的源自荧光假单胞菌的细胞悬浮液和选自高岭石、蒙脱石和绿坡缕石的粘土矿物；其中所述细胞悬浮液包含 piliferolide A 或 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸。

2. 一种用于控制期望控制的位置中的一种或多种软体动物的方法，包括以有效控制所述软体动物的量将权利要求 1 所述的组合物引入到所述位置。

3. 一种用于控制一种或多种软体动物的方法，包括在期望控制的位置以有效用于控制所述软体动物的量引入包含源自荧光假单胞菌的细胞悬浮液和选自高岭石、蒙脱石和绿坡缕石的粘土矿物的组合物，其中所述位置是液体或固体表面，其中所述液体是水体或油漆，所述固体表面选自下组：塑料、混凝土、木、玻璃纤维、由铁和聚氯乙烯制成的管、覆盖有涂层材料和 / 或油漆的表面；其中所述细胞悬浮液包含 piliferolide A 或 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸。

4. 一种用于增加用于控制软体动物的包含 piliferolide A 或 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的组合物的功效的方法，其中所述方法包括在期望控制的位置中以当被引入到所述位置时有效增加所述 piliferolide A 或 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的功效的量引入一种或多种惰性材料，其中所述惰性材料增加所述 piliferolide A 或 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的所述功效至少 20％，且其中所述惰性材料源自粘土矿物。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中所述惰性材料是高岭石、蒙脱石、绿坡缕石或前述的组合。

6. 一种防污油漆，包含在油漆载体中的抗生长性的、杀生物有效量的权利要求 1 所述的组合物。

7. 权利要求 1 所述的组合物用于配制用于控制软体动物的组合物和 / 或防污油漆的用途。

用于控制软体动物的化学剂和生物学剂

发明领域

[0001] 用于控制软体动物例如贻贝和/或蜗牛和/或蛞蝓的组合物和方法，该组合物包括但不限于作为活性成分的包含内酯、内酰胺、氨基甲酸酯、酰胺和/或羧酸的化合物和/或源自微生物（例如，假单胞菌属(Pseudomonas)和/或欧文氏菌属(Erwinia)）的化合物。还提供了用于在冷水条件下或固体表面在开放水域、发电厂和饮用水处理设施增加对软体动物例如贻贝和/或蜗牛和/或蛞蝓的化学控制和生物学控制的功效的方法和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 斑马纹贻贝(Dreissena polymorpha)最初生长在亚洲的里海和乌拉尔河。在十九世纪，它传播到西方，且现在出现在欧洲的大部分、独联体（前苏联）的西部和土耳其。在二十年以前，贻贝例如斑马纹贻贝(Dreissena polymorpha)和斑驴贻贝(Dreissena bugensis)被引入到北美洲。它们通过内陆水体的广泛传播已经引起了在美国东部大部分地区的覆盖[U.S.Army Engineer Waterways Experiment Station.1995.Zebra mussels：Biology，Ecology，and Recommended Control Strategies.Technical Note.ZMR-1-01.Zebra Mussel Research Program，Vicksburg，MS(美国陆军工程师水道试验站.1995.斑马纹贻贝：生物学、生态学和推荐的控制策略.技术备忘录.ZMR-1-01.斑马纹贻贝研究项目，Vicksburg，MS)]。同样地，沼蛤(Limnoperna fortune)影响到亚洲和南美的国家(Golden Mussel-Limnoperna fortune)。河蚬(Corbicula fluminea)几乎传播了所有亚洲国家和美国[Non-indigenous species information bulletin：Asian clam，Corbicula fluminea(Müller，1774)(Mollusca：Corbiculidae)(非本土物种信息公告：河蚬Corbicula fluminea(Müller，1774)(软体动物：蚬科))]。且诸如珠蚌贻贝等的其他贻贝存在于美国和其他国家。

[0004] 贻贝快速在新的区域繁殖、迅速达到高的密度以及结合到任何硬的基层（例如，岩石、木头、水生植物、本土贻贝的壳以及小龙虾的外甲、塑料、混凝土、木、玻璃纤维、由铁和聚氯乙烯制成的管和由常规油漆覆盖的表面）的能力使得它们造成严重的不良后果。这些后果包括水相关的基础设施的损坏、增加数百万美元的操作费用和生态系统的严重破坏[O'Neill，C.R.，Jr.1997，Economic impact of zebra mussels-results of the 1995national zebra mussel information clearing house study(斑马纹贻贝的经济影响-1995国家斑马纹贻贝信息资料室研究结果)Gt.Lakes Res.Rev.3，35-44；Karatayev，A.Y.，L.E.Burlakova，D.K.，Padilla，1997，the effects ofDreissena polymorpha(Pallas)invasion on aquatic communalities in eastern Europe(斑马纹贻贝(Pallas)入侵对东欧的水生共体的影响).Journal Shellfi Research，16，187-203；MacIsaac，H.J.，1996.Potential abiotic and biotic impacts ofzebra mussels on the inland waters of North America(斑马纹贻贝对北美洲的内陆水域的潜在的非生物和生物的影响).American Zoology，36，289-299；D.P. Molloy，the potential for using biological control technologies in the management of Dreissena SPP(在斑贻贝的管理上使用生物学控制技术的潜力)，Journal of Shelfish Research，1998(17)177-183]

以及在收入损失方面耗费上亿美元的生产力降低 (Connelly, N.A., C.R.O' Neill, Jr 等人 (2007),“Economic impacts of Zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities(斑马纹贻贝对饮用水处理和发电设施的经济影响)”, Environmental Management 90 :10。Economic impacts of Zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities(斑马纹贻贝对饮用水处理和发电设施的经济影响).Environmental Management 40 :105-112)。另外,这些侵入性贻贝快速侵入水生生态系统已经造成地方性珠蚌贻贝的丰度和多度 (abundance) 的下降,这是生物多样性的一个重要的部分 (Ricciardi, A, Neves, R.J., Rasmussen, J.B.1998.Impending extinctions of North American freshwater mussels(Unionidae) following the zebra mussel(Dreissena polymorpha)invasion(在斑马纹贻贝 (Dreissena polymorpha) 侵入之后北美淡水贻贝 (珠蚌科) 的即将到来的灭绝).Journal of Animal Ecology 67 :613-619)。

[0005] 贻贝的管理对保护水相关的基础设施和水生态系统至关重要。存在许多减少贻贝种群的方式。这些方法包括预活化方法和反应性方法。反应性除去包括机械除去、捕食者除去以及化学的和生物化学的除去。例如,鱼、鸟、小龙虾、螃蟹、水蛭和哺乳动物已经证明捕食贻贝。然而,通过自然捕食来控制贻贝种群是不可能的,尤其在人造结构例如管或水泵装置中。

[0006] 应用软体动物杀灭剂是减少贻贝种群的另一个有效方式。例如,在欧洲、美国和加拿大,次氯酸钠是通常使用的控制剂。然而,贻贝通过关闭它们的壳可以经得起该处理达若干天,且由于氯的环境毒性,氯仅可以用在容纳压力传感设备或其他设备的管或管道中 [U.S.Army Engineer Waterways Experiment Station.1995.Zebra mussels : Biology, Ecology, and Recommended Control Strategies.Technical Note.ZMR-1-01. Zebra Mussel Research Program, Vicksburg, MS(美国陆军工程师水道试验站 .1995. 斑马纹贻贝 :生物学、生态学和推荐的控制策略 . 技术备忘录 .ZMR-1-01. 斑马纹贻贝研究项目, Vicksburg, MS)]。此外,存在许多其他商业化的软体动物杀灭剂,例如表面活性剂铵盐、油漆中的丁基化羟基甲苯 (BHT)、N- 三苯基甲基 - 吗啉等。这些化学品在水生态系统中具有低的选择性或效果。例如,以Bayluscide® (Bayer) 销售的 4- 三氟乙基 -4- 硝基酚是用于控制这样的侵入性外来物种的可能的候选物。然而,这样的化学品的毒性机理是影响贻贝细胞呼吸,这实质上将限制它在贻贝和其他水生物种例如鱼之间的选择性 [Karen Perry Æ John Lynn, Detecting physiological and pesticide-induced apoptosis in early developmental stages of invasive bivalves(在侵入性双壳类的早期发育阶段检测生理学的和杀虫剂诱导的细胞调亡), Hydrobiologia(2009)628 :153-164 ; I Takougang, J Meli, F Angwafo, Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of schistosome and selected non-target organisms in sahelian Cameroon(在 sahelian Cameroon 低剂量贝螺杀对血吸虫的蜗牛宿主和所选择的非靶生物体的野外试验), Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006, 101(4) :355-358]。

[0007] 以安全的、环境友好的和廉价的方式来管理侵入性贻贝是至关重要的。为了找到毒性较低的方法来控制这些侵入性贻贝,纽约州博物馆的 (NYSM) 野外研究实验室筛选超过 700 种细菌分离物作为用于对抗斑马和斑驴贻贝的潜在的生物学控制剂。结果,他们发

现，荧光假单胞菌 (Pseudomonas fluorescens) 的菌株 CL145A 分离物对这些贻贝是致命的（参见 Molloy，D.P. 美国专利第 6,194,194 号，2001 年 2 月 27 号授权）。该细菌是全世界分布的且存在于所有北美水体中。实质上，该细菌是无害的细菌物种，其被发现保护植物的根免于腐烂和发霉。其是如此的普遍存在，以至于其是一般家用冰箱中的普通的食物腐败生物体 [Daniel P. Molloy 和 Denise A. Mayer，Overview of a Novel Green Technology：Biological Control of Zebra and Quagga Mussels with Pseudomonas fluorescens（新颖的绿色技术综述：用荧光假单胞菌生物学控制斑马和斑驴贻贝），第 6 版：2007 年 8 月 24 日更新]。

[0008] 内酯、内酰胺、氨基甲酸酯和酰胺

[0009] 内酯广泛分布在食物和饮料中，且还是动物（例如，海绵动物）和微生物（例如，酵母、真菌）的次级代谢产物。一些内酯具有特殊的香味（例如，γ - 癸内酯），导致食物工业中对天然产物的增加的需求，可以通过使用生物技术工艺来生产这些内酯 [Mohamed Alchihab，Jacqueline Destain，Mario Aguedo，Lamia Majad，Hakim Ghalfi，Jean-Paul Wathelet，Philippe Thonart，Production of γ-Decalactone by a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of the Yeast Rhodotorula aurantiaca（通过酵母橙黄红酵母的嗜冷和嗜温菌株生产 γ - 癸内酯），Appl Biochem Biotechnol(2009)158：41-50]。不同的内酯的其他功能与以下活性相关：抗菌活性 [Ikuko Shimizu，Yasunori Isshiki，Hame Nomura，Keisuke Sakuda，Katsuya Sakuma，Seiichi Kondo，The Antibacterial Activity of Fragrance Ingredients against Legionella pneumophila（香料成分对抗嗜肺军团菌的抗菌活性），Biol. Pharm. Bull. 2009,32(6)1114-1117]、保肝活性 [Yumiko Itoh，Hiroshi Shimura，Mayumi Ito，Naoharu Watanabe，Michio Yamagishi，Masaharu Tamai 和 Kazunori Hanada，novel hepatoprotective γ-lactone，MH-031，I. Discovery，Isolation，Physical-Chemical properties and structural elucidation（新颖的保肝药 γ - 内酯 MH-031，I. 发现、离析、物理化学性质和结构说明），The Journal of Antibiotics 1991,832-837]、抗痨活性 [Ma，G.Y. 等人，anti-tuberculosis constituents from the stem bark of Micromelum hirsutum（来自小芸香木属植物的茎皮的抗痨成分），Planta Med. 2005,71,261-267]、抗 HIV 活性 [zhang 等人，sesquiterpenes and butenolides，natural anti-HIV constituents from Litse verticillata（来自轮叶木姜子的天然抗 HIV 成分，倍半萜和丁烯羟酸内酯），Planta Med，2005,71,452-457]、性信息素 [J.H. Tumlinson，Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer（由对映体雄性响应识别雌性日本甲虫性信息素抑制），Science，1977,197,789-792]、细胞毒素活性 [Fan，X.N. 等人，Chemical Constituents of Heteroplexis micocephala（小花异裂菊的化学成分），J. Nat. Prod. 2009,72,1184-1190]、信号分子 [M.K. Vinson 等人，Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in Pseudomonas aeruginosa（铜绿假单胞菌中的毒力决定子和次级代谢产物的多个 N- 酰基 -L- 高丝氨酸内酯信号分子调节生产），Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1995,92,9427-9431] 和杀虫活性 [John A. Findlay 等人，Insect toxins from spruce endophytes（来自 spruce endophytes 的昆虫毒素），Can. J. Chem. 2003,81,284-292]。

[0010] 虽然内酰胺存在于一些植物和海洋生物中，它们常常是真菌代谢产物。在最近的出版物中评述了许多生物学活性（例如，细胞毒素活性和抗癌活性、血管生长抑制、神经活性、抗感染活性）[Bastien Nay，Nassima Riache 和 Laurent Evanno，Chemistry and biology of non-tetramic～hydroxy--lactams and-alkylidene--lactams from natural sources（来自天然源的非－四氨基 γ－羟基－γ－内酰胺和 γ－亚烷基－γ－内酰胺的化学和生物学），Natural Product reports，2009，26，1044-1062]。

[0011] 氨基甲酸酯存在于植物、微生物和海绵动物中，但与内酯、酰胺相比，很少报道这些化合物的生物学活性，因为这些化合物中许多在水溶液中不稳定。具有天然的氨基甲酸酯的杀真菌活性的一个实例 [Richard J.Clark 等人，Antifungal Alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge Haliclona n.sp.（来自热带海洋海绵动物南海海绵物种的抗真菌烷基氨基醇），J.Nat.Prod.2001，64，1568-1571]。]。酰胺广泛分布在植物、微生物和海绵动物中。例如，来自海洋衍生的真菌桔青霉 (Penicillium citrinum) 的 Scalusamide A 展示抗菌活性和抗真菌活性 [Masashi Tsuda 等人，Scalusamides A-C，New Pyrrolidine Alkaloids from the Marine-Derived Fungus Penicillium citrinum（来自海洋衍生的真菌桔青霉的新的吡咯烷生物碱 Scalusamides A-C），J.Nat.Prod.2005，68，273-276]。

[0012] 酰胺的另一个实例是植物衍生的称为假蒟亭碱的化合物，该化合物展示许多生物活性。如在 2009 年 7 月 21 日的申请系列第 61/227,412 号所描述的，在 1987 年首次从假蒟 (Piper sarmentosum) 的果实中离析出假蒟亭碱 [Likhitwitayawuid，K.，Ruangrungsi，N，Lange，G 和 Decicco，C.，Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from Piper Samentosum（从假蒟离析出的新组分的结构说明和合成），Tetrahedron 1987(43)3689-3694] 且还在 1988 年从胡椒 (Piper nigrum) 离析出假蒟亭碱 [Kiuchi，F.，Nakamura，N.，Tsuda，Y.，Kondo，K 和 Yoshimura，H.Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans.IV.Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper（对内脏幼虫移行症有效的生药的研究.IV. 胡椒中杀幼虫成分的离析和鉴定）Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1988(36)：2452]，且在 1995 年首次合成假蒟亭碱 [Bernabeu，M.，Chinchilla，R. 和 Najera，C.，(2E,4E)-5-Tosyl-2,4-pentadienamides：New Dienic Sulfones for the Stereoselective Synthesis of(2E,4E)-Dienamides((2E,4E)-5- 甲苯磺酰基 -2,4- 戊二烯酰胺：用于 (2E,4E)- 二烯酰胺的立体选择性合成的新的二烯砜），Tetrahedron Letter，1995(36)3901-3904]。假蒟亭碱已经被发现作为保护光老化皮肤的体内皮肤抗氧化剂 [Cornacchione，S.；Sadick，N.S.；Neveu，M.；Talbourdet，S.；Lazou，K.；Viron，C.；Renimel，I.；de Quéral，D.；Kurfurst，R.；Schnebert，S.；Heusèle，C.；André，P.；Perrier E.In vivo skin antioxidant effect of a new combination based on a specific Vitis vinifera shoots extract and a biotechnological extract（基于具体的葡萄枝条提取物和生物技术提取物的新组合的体内皮肤抗氧化效果）。J.Drugs in Dermatol.2007，6S，8-13]，展示了抗血小板聚集活性 [Li，C.Y.；Tsai，W；Damu，A.G.；Lee，E.J.；Wu，T.S.；Dung.N.X.；Thang，T.D.；Thanh，L.Isolation and identification of antiplatelet aggregatory principles from the leaves of Piper lolot（来自罗洛胡

椒的叶子的抗血小板聚集成分的离析和鉴定），J.Agric.Food Chem.2007,55,9436-9442]，具有抗疟原虫和抗分支杆菌活性[Tuntiwachwuttikul,P.;Phansa,P.;Pootaeng-on,Y.;Taylor,W.C.Chemical constituents of the roots of Piper Sarmentosum(假蒟的根的化学成分），Chem.Pharm.Bull.2006,54,149-151]和抗结核活性[Rukachaisirikul,T.;Siriwattanakit,P.;Sukcharoenphol,K.;Wongvein,C.;Ruttanaweang,P.;Wongwattanavuch,P.;Suksamrarn,A.Chemical constituents and bioactivity of Piper sarmentosum(假蒟的化学成分和生物活性），J.Ethnopharmacol.,2004,93,173-176]。假蒟亭碱在化妆品和药物中用作疏水性化合物的增溶剂(Stephen,T.;Andrew,H.Compositions comprising macromolecular assembles of lipid surfactant(包含脂类表面活性剂的大分子集合物的组合物），PCT公布号WO/2008/065451)。2009年7月21日的申请系列第61/227,412号还公开了假蒟亭碱和其类似物可以用于控制植物害虫。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明涉及用于控制软体动物,特别地腹足纲和/或双壳纲类的成员且更具体地贻贝、蜗牛和蛞蝓的化合物、组合物和方法。本发明涉及以下经离析的化合物:可获自或源自(a)微生物,特别地,假单胞菌属物种,更具体地,荧光假单胞菌,或可选择地,具有假单胞菌属ATCC 55799的识别特征的生物体;(b)对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒:双壳纲,特别地,贻贝(例如,Dreissana物种)和/或腹足纲,特别地,蜗牛,包括但不限于水生蜗牛(例如,贝罗比属物种(Biomphalaria sp.))和花园蜗牛,包括但不限于褐色花园蜗牛(brown garden snail)、白色花园蜗牛(例如,Cantareus物种、Cornu物种、Theba物种),和/或蛞蝓,包括但不限于庭院灰蛞蝓(例如,Deroceras物种)、带状的或三带蛞蝓(例如,Lehmannia物种)、黄褐色蛞蝓(例如,Limacus物种),和温室蛞蝓(例如,Milax物种)和(c)具有选自由以下组成的组的分子量:通过液相色谱法/质谱法(LC/MS)测定的约540-550和约1280-1335。这些组合物可以被配制成可以用于控制软体动物特别地腹足纲和/或双壳纲类的成员且更具体地贻贝、蜗牛和蛞蝓的组合物。在一个实施方式中,所述化合物:(a)可从微生物,特别地假单胞菌属获得;(b)对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒:双壳纲,特别地,贻贝(例如,Dreissana物种)和/或腹足纲,特别地,蜗牛,包括但不限于水生蜗牛(例如,贝罗比属物种)和花园蜗牛,包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛(例如,Cantareus物种、Cornu物种、Theba物种),和/或蛞蝓,包括但不限于庭院灰蛞蝓(例如,Deroceras物种)、带状的或三带蛞蝓(例如,Lehmannia物种)、黄褐色蛞蝓(例如,Limacus物种)和温室蛞蝓(例如,Milax物种);(c)具有通过液相色谱法/质谱法(LC/MS)测定的约1280-1310和更具体地1295的分子量;(d)具有δ9.25、8.36、8.06、7.82、7.71、7.52、7.45、6.82、6.36、6.08、5.42、5.39、5.30、5.14、4.68、4.42、4.31、4.16、4.11、4.07、3.95-3.86、3.83、3.72、3.66、3.53、3.48、3.37、3.17、3.06、2.56、2.53、2.45、2.32、2.21、2.02、1.96、1.84、1.72、1.65、1.61、1.51、1.48-1.37、1.32、1.12、0.94、0.91、0.68的1H NMR值;(e)具有在使用2.5mL/min流速的水:乙腈(CH_3CN)梯度溶剂系统(0-10min;30-40％含水的CH_3CN,10-20min;40-60％含水的CH_3CN,20-60min;60-80％含水的CH_3CN,60-65min;80-100％含水的CH_3CN)和210nm的UV检测的反相C-18HPLC(例如,Thermo Scientific,Hydersil Gold,100×10mm)柱上约50-55分钟,更具体地约52分钟和甚至更具体地约51.66min的高压液相色谱法(HPLC)保留时间。

[0015] 在另一个实施方式中，所述化合物具有以下特征：(a) 可获自微生物，特别地假单胞菌属；(b) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和 / 或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和 / 或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）；(c) 具有通过 LC/MS 测定的约 1310-1335 和更具体地 1321 的分子量；(d) 具有在使用 2.5mL/min 流速的乙腈：水梯度使用水：乙腈 (CH_3CN) 梯度溶剂系统 (0-10min；30-40％含水的 CH_3CN，10-20min；40-60％含水的 CH_3CN，20-60min；60-80％含水的 CH_3CN，60-65min；80-100％含水的 CH_3CN) 和 210nm 的 UV 检测的反相 C-18(Thermo Scientific，Hydersil Gold，100×10mm)HPLC 柱上约 55-60 分钟，更具体地约 60 分钟和甚至更具体地 59.61min 的 HPLC 保留时间。在又一个实施方式中，本发明涉及具有以下特征的经离析的化合物：(a) 可获自微生物，特别地，假单胞菌属；(b) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和 / 或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和 / 或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）；(c) 具有通过 LC/MS 测定的约 540-550 和更具体地约 546 的分子量；(d) 具有在使用 10mL/min 流速的水：乙腈梯度溶剂系统 (0-10min；35-45％含水的 CH_3CN，10-20min；45-60％含水的 CH_3CN，20-50min；60-85％含水的 CH_3CN，50-60min；85-100％含水的 CH_3CN，60-70min；100％ CH_3CN) 和 210nm 的 UV 检测的反相 C-18HPLC 柱 (Phenomenex，luna C18(2)10μ，100 Å Axia，A250×30mm) 上约 50-55 分钟，更具体地约 52 分钟和甚至更具体地约 51.54min 的 HPLC 保留时间。

[0016] 本发明还涉及用于获得本发明的化合物的方法，该方法包括 (a) 获得源自假单胞菌属物种的细胞的悬浮液和 (b) 通过色谱方法从所述悬浮液离析化合物。

[0017] 本发明还涉及包含所述化合物的组合物以及包含以 10mL/min 流速的水：乙腈溶剂系统 (0-10min；35-45％含水的 CH_3CN，10-20min；45-60％含水的 CH_3CN，20-50min；60-85％含水的 CH_3CN，50-60min；85-100％含水的 CH_3CN，60-70min；100％ CH_3CN) 和可通过 HPLC 从假单胞菌属物种细胞悬浮液获得的具有约 45-50min 的保留时间的 210nm UV 检测级分的组合物，所述级分包含以下至少两种化合物：(a) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和 / 或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和 / 或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）；(b) 具有通过 LC/MS 测定的在约 630-660 之间和在约 970-1000 之间的分子量。

[0018] 本发明涉及一种用于在期望控制的位置中控制一种或多种软体动物的方法，该方法包括将以下中的至少一种引入所述位置：(a) 源自欧文氏菌属物种细胞的细胞悬浮液或

提取物；(b) 一种或多种化合物，其中所述化合物是内酯、内酰胺、氨基甲酸酯、羧酸和/或酰胺化合物或包含所述化合物的组合物，条件是所述化合物不是 γ-辛内酯、γ-壬内酯、γ-癸内酯、γ-十一碳烷酸内酯、N-环戊基肉桂酰胺、N-(反式肉桂酰基)吡咯烷、N-(反式肉桂酰基)哌啶和N-(反式肉桂酰基)六亚甲基亚胺、4-羟基十二烷酸和十二烷酸，且条件是组合物不是假单胞菌属培养物、提取物或悬浮液；(c) 一种或多种化合物，其可获自或源自 (i) 假单胞菌属物种，(ii) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝(例如，Dreissana 物种)和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛(例如，贝罗比属物种)和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛(例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种)，和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓(例如，Deroceras 物种)、带状的或三带蛞蝓(例如，Lehmannia 物种)、黄褐色蛞蝓(例如，Limacus 物种)和温室蛞蝓(例如，Milax 物种)和 (iii) 具有通过液相色谱法/质谱法 (LC/MS) 测定的选自由约 540-550 和约 1280-1335 组成的组的分子量；(d) 组合物，其包含以 10mL/min 流速的水：乙腈溶剂系统 (0-10min；35-45％含水的 CH_3CN，10-20min；45-60％含水的 CH_3CN，20-50min；60-85％含水的 CH_3CN，50-60min；85-100％含水的 CH_3CN，60-70min；100％ CH_3CN) 和可通过 HPLC 从假单胞菌属物种细胞悬浮液获得的具有约 45-50min 的保留时间的 210nm UV 检测级分，所述级分包含以在所述位置中有效控制所述软体动物的量的以下至少两种化合物：(i) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝(例如，Dreissana 物种)和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛(例如，贝罗比属物种)和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛(例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种)，和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓(例如，Deroceras 物种)、带状的或三带蛞蝓(例如，Lehmannia 物种)、黄褐色蛞蝓(例如，Limacus 物种)和温室蛞蝓(例如，Milax 物种)；(ii) 具有通过 LC/MS 测定的在约 630-660 之间和在约 970-1000 之间的分子量。在一个实施方式中，该控制可以通过诱导一种或多种软体动物的死亡来实现，包括使所述软体动物与上面提出的化合物接触。软体动物可以在水体或固体表面被接触。同样地，本发明涉及上文提及的化合物、悬浮液和组合物用于配制用于在某位置控制软体动物类例如腹足纲和/或双壳纲的组合物的用途。

[0019] 在相关的方面，本发明还涉及用于在期望控制的位置控制一种或多种软体动物，特别地贻贝和/或蜗牛(例如，白色花园蜗牛和/或褐色花园蜗牛、水生蜗牛)和/或蛞蝓和/或在所述位置诱导一种或多种软体动物，特别地贻贝和/或蜗牛(例如，白色花园蜗牛和/或褐色花园蜗牛、水生蜗牛)和/或蛞蝓的死亡的组合物，该组合物包含一种或多种内酯、内酰胺、氨基甲酸酯、羧酸和/或酰胺，此外条件是所述化合物不是 γ-辛内酯、γ-壬内酯、γ-癸内酯、γ-十一碳烷酸内酯、N-环戊基肉桂酰胺、N-(反式肉桂酰基)吡咯烷、N-(反式肉桂酰基)哌啶和N-(反式肉桂酰基)六亚甲基亚胺、4-羟基癸酸和癸酸，且条件是组合物不是假单胞菌属培养物、提取物或悬浮液。

[0020] 在一个特定的实施方式中，本发明涉及一种用于控制一种或多种软体动物，特别地贻贝和/或蜗牛(例如，白色花园蜗牛和/或褐色花园蜗牛、水生蜗牛)和/或蛞蝓的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 制备源自欧文氏菌属物种细胞的细胞悬浮液或提取物；和 (b) 将所述悬浮液或提取物以有效控制所述软体动物的量引入到期望控制的位置。

[0021] 欧文氏菌属提取物可以包含上文陈述的活性成分，例如内酯和酰胺。同样地，可以

将源自欧文氏菌属物种细胞的细胞悬浮液或提取物配制成用于控制软体动物，特别地选自由以下组成的组的软体动物类的组合物：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）。

[0022] 本发明还涉及一种组合物，所述组合物包含有效控制一种或多种软体动物，特别地选自由以下组成的组的软体动物类的至少一种或多种物质：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）；和优选地用于控制一种或多种软体动物的任选的惰性材料。此外，本发明涉及这些物质和本发明的其他化合物和组合物用于配制用于控制一种或多种软体动物，特别地选自由以下组成的组的软体动物类的组合物的用途：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）。物质可以源自氯或假单胞菌属物种，更具体地源自荧光假单胞菌或可选择地具有假单胞菌属 ATCC 55799 的识别特征的生物体（例如，假单胞菌属菌株）。在另一个特定的实施方式中，组合物可以包含是源自假单胞菌属物种（例如，荧光假单胞菌）的细胞悬浮液的物质，且甚至在一个更特定的实施方式中，细胞悬浮液可以包含具有假单胞菌属 ATCC 55799 的毒素产生特征的细胞。在又一个特定的实施方式中，所述组合物中的物质可以是源自假单胞菌属物种或可选择地源自具有假单胞菌属 ATCC55799 的识别特征的生物体的一种或多种毒素。组合物可以可选择地包含在上文陈述的本发明方法中使用的化合物以及上文陈述的本发明的化合物，且可以用于控制腹足纲和双壳纲类的成员。惰性材料可以是粘土矿物（高岭石、蒙脱石、绿坡缕石）。本发明还涉及一种用于在期望控制的位置控制一种或多种软体动物，特别地贻贝和/或蜗牛（例如，水生蜗牛、花园蜗牛和/或蛞蝓的方法，该方法包括在所述位置引入有效控制所述软体动物的物质和以在包含所述软体动物的所述位置处有效控制所述软体动物的量的任选的一种或多种惰性材料。特别地，用于控制所述软体动物的物质以有效导致相对于未经处理的对照的至少约 20％死亡率，通常约 50-95％的量存在，且所述惰性材料以足以或有效增加用于控制所述软体动物的所述物质的死亡率至少约 20％，通常 25-40％的量存在。在一个特定的实施方式中，在引入用于控制所述软体动物的物质之前将惰性材料引入到所述位置中；在一个更特定的实施方式中，在引入所述物质之前至少约一个小时将惰性材料引入。在另一个特定的实施方式中，将惰性材料与上文陈述的用于控制软体动物，特别地贻贝、蜗牛和/或蛞蝓的物质同时地引入到所述位置中。

[0023] 在相关的方面，本发明涉及惰性材料在期望控制的位置中用于增加用于控制一种

或多种软体动物，特别地选自由以下组成的组的软体动物类的一种或多种物质的功效的用途：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）。位置可以是液体（例如，水体或油漆）或固体表面，例如塑料、混凝土、木、玻璃纤维、由铁和聚氯乙烯制成的管、覆盖有涂层材料和/或油漆的表面。特别地，本发明涉及一种用于增加用于控制所述软体动物中的一种或多种，特别地选自由以下组成的组的软体动物类的一种或多种物质的功效的方法：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和/或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和/或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种），该方法包括将当被引入所述位置时有效增加所述物质的功效的量的一种或多种惰性材料引入期望控制的位置。在一个特定的实施方式中，这些惰性材料增加所述物质的功效至少约 20％。

[0024] 此外，本发明涉及包含在油漆载体中的抗生长性的、杀生物有效量的本发明组合物和化合物的防污油漆。本发明还涉及本发明化合物和组合物在配制这样的防污油漆中的用途。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1a 和图 1b 示出在本发明方法中使用的天然产物的结构。

[0027] 图 2 示出用于离析活性级分的方案。

[0028] 图 3 示出用于从假单胞菌属细胞培养物获得本发明化合物的纯化方案的一个示意图。

[0029] 图 4 示出对于在生物盒 (biobox) 中用粘土和荧光假单胞菌生物杀虫剂产品处理的贻贝，死亡率随时间的发展。

[0030] 发明详细描述

[0031] 当提供值的范围时，应理解，除非上下文另外清楚地规定，否则在该范围的上限和下限之间的每一个插入值至下限单位的十分之一和在该所述范围内的任何其他所述值或插入值被包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围内也可以被包括在本发明内，取决于在所述范围内任何特别地被排除的极限。当所述范围包括极限中的一个或两个时，排除了那些被包括的极限中的两个的范围也被包括在本发明内。

[0032] 除非另外定义，否则本文使用的所有的技术术语和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的意思相同的意思。虽然在本发明的实践或测试中还可以使用与本文描述的那些方法和材料相似或等效的任何方法和材料，但现在描述优选的方法和材料。

[0033] 必须注意，如在本文和在所附的权利要求使用，除非上下文另外清楚地规定，否则单数形式“a（一）”、“an（一）”和“the（该）”包括复数对象。

[0034] 如本文所定义，“控制贻贝”意指通过杀死贻贝或使贻贝丧失能力来控制贻贝

的卵、幼虫、面盘幼体和后期面盘幼体 (post-veliger)，使得它们不能在给定的位置拓殖 (colonize)。

[0035] 如本文所定义，“源自”意指直接地从特定的源离析或获得或可选择地具有从特定的源离析或获得的物质或生物体的识别特征。

[0036] 如下文使用，术语“烷基”是指可以是直链或支链的饱和的烃基（例如，乙基、异丙基、叔戊基或 2,5- 二甲基已基等）。当该术语被单独使用时和当该术语用作化合物术语的一部分时，该定义都适用。

[0037] 术语“环烷基”和“环烯基”是指饱和的烃环且包括双环和多环。同样地，具有代替碳环原子的杂原子（例如，N、O 或 S）的环烷基和环烯基可以分别地被称为“杂环烷基”、“杂环基”和“杂环烯基”。

[0038] 如本文使用的术语“烯基”是指包含为双键的一个或多个不饱和部位的如上所述的烷基。同样地，如本文使用的术语“炔基”是指包含为三键的一个或多个不饱和部位的如上所述的烷基。

[0039] 术语“烷氧基”是指还带有能够共价连接于另一个烃基的氧取代基的如上所述的烷基（例如，诸如甲氧基、乙氧基、芳氧基、和叔丁氧基）。

[0040] 术语“芳基”是指可以是单环或稠合在一起、共价地键合的或键合至共同的基团例如乙烯或亚甲基部分的多环的芳族碳环取代基。同样地，具有代替碳环原子的杂原子（例如，N、O 或 S）的芳基被称为“杂芳基”。

[0041] 术语“芳烷基”、“芳基烯基”和“芳氧基烷基”是指分别地直接连接于烷基、烯基或与烷基附接的氧原子的芳基。为了简洁，作为以上组合术语的一部分的芳基意指也包括杂芳基。

[0042] 如在“包含杂原子的烷基”（即，“杂烷基”基团）或“包含杂原子的芳基”（即，“杂芳基”基团）中使用的术语“杂”是指其中一个或多个碳原子被不同于碳的原子例如氮、氧、硫、磷或硅取代的分子、键合或取代基。

[0043] 如本文所定义，“源自”和“可获自”意指直接地从特定的源离析或获得的或可选择地具有从特定的源离析或获得的物质或生物体的识别特征。这些术语在整个说明书中可互换地使用。

[0044] 如本文所定义，“经离析的化合物”基本上不含其他化合物或物质，例如，如通过分析方法测定的至少约 20％纯的，优选地至少约 40％纯的，更优选地约 60％纯的，甚至更优选地约 80％纯的，最优选地约 90％纯的，和甚至最优选地约 95％纯的，所述分析方法包括但不限于色谱方法、电泳方法。

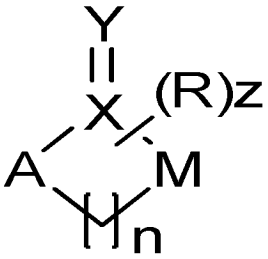
[0045] 化合物

[0046] 本发明的组合物和方法中使用的化合物可以是以下三个家族的成员。

[0047] 家族 I 化合物

[0048] 在一个特定的实施方式中，家族 I 具有以下化学结构：

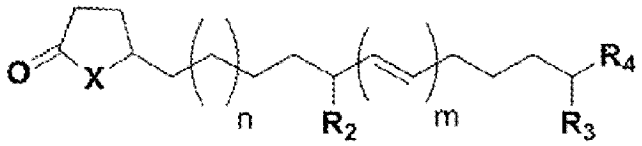
[0049]



[0050] 其中X包括但不限于，碳、硫、磷；Y包括但不限于，硫、氧；A和M包括但不限于，碳、氧、氮、硫，且n是1至21，其中(R)z表示环上的基团R上的取代基的数量的数目Z。R和R上的取代基可以是氢、羟基、烷基羟基、烯基羟基、炔基羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、环烷基、环烯基、烷基、烯基、炔基、杂环基、杂芳基、芳族基团、芳基、NH--取代的基团、或N,N-取代的基团或任何其他取代的基团。取代的R链中的一个的长度可以是从1至25个原子，优选的长度将是从7至17个原子；数目Z可以是0、1、2、3直到n+2，优选的z＝0、1、2、3。

[0051] 在一个特定的实施方式中，化合物可以源自荧光假单胞菌并具有羟基化不饱和脂肪酸内酯结构，该羟基化不饱和脂肪酸内酯结构包括是5元γ-内酯的至少一个内酯部分、至少一个不饱和部分和至少一个醇基团；在核结构中分子量从285到约310；至少15个碳和至少3个氧。在一个更特定的实施方式中，化合物可以具有以下结构

[0052]



[0053] 其中：X各自独立地是--O、--NR_1或--S，其中R_1是--H或C_1-C_6烷基；n＝0到15，R_2到R_4各自独立地是--H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环、取代的杂环、环烷基、取代的环烷基、烷氧基、取代的烷氧基、硫代烷基、取代的硫代烷基、羟基、卤素、氨基、酰氨基、羧基、--C(O)H、酰基、氧代酰基、氨基甲酸酯、磺酰基、磺酰胺、或磺酰；m＝双键或三键。在又一个特定的实施方式中，Y和M是氧，A和X是碳且n是2或3，R是C7或C8烷基且z是0，其中当n是2且R是C7烷基时，R连接于A。

[0054] 在甚至另一个特定的实施方式中，家族I化合物可以是1至28中陈述的化合物（图1a和图1b）。这些是来自天然材料或从商业源或通过化学合成获得的化合物。家族I化合物的天然源包括但不限于，植物、珊瑚、微生物、海绵动物和动物。在一个更特定的实施方式中，包括家族I化合物的植物包括但不限于，或可选择地家族I化合物可以源自以下物种，例如苦槛蓝(Myoporum bontioides)(化合物14)[Moe Kanemoto等 人，Chlorine-containing iridoid and iridoid glucoside, and other glucosides from leaves of Myoporum bontioides(包含氯的环烯醚萜和环烯醚萜葡糖苷，和来自苦槛蓝的叶子的其他葡糖苷)，Phytochemistry 69(2008)2517-2522]、小芸香木属植物Micromelum hirsutum(化合物18)[Ma，G.Y. 等人，anti-tuberculosis constituents from the stem bark of Micromelum hirsutum(来自小芸香木属植物的茎皮的抗痨成分)，Planta Med.2005,71,261-267]，家族I化合物还可以源自微生物，包括但不限于樟芝(Antrodia camphorate)(化合物4、5)[Shao，Y.Y. 等人，

Chemical constituents ofAntrodia camphorata submerged whole broth(樟芝浸没的全肉汤的化学成分),Natural Product Research,2008,22(13)1151-1157]、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)(化合物2)[Gocho,S.等人,Biotransformation of oleic acid to optically active γ-dodecalactone(油酸向光学活性的γ-十二内酯的生物转化),Biosci.Biotech.Biochem.1995,59(8)1571-1572]、中慢生根瘤菌属物种(Mesorhizobium sp.)(化合物2、17)[Wei,G.H.等人,Rhizobialide:A New Stearolactone Produced by Mesorhizobium sp.CCNWGX022,a Rhizobial Endophyte from Glycyrrhiza uralensis((十八烷酸内酯:一种由来自甘草的根瘤内生菌,中慢生根瘤菌属物种CCNWGX022产生的新的硬脂内酯),Chemistry and Biodiversity,2007,4,893-898]、Ophiostoma piliferum(化合物16),[Wei,G.H.等人,Rhizobialide:A New Stearolactone Produced by Mesorhizobium sp.CCNWGX022,a Rhizobial Endophyte from Glycyrrhiza uralensis((十八烷酸内酯:一种由来自甘草的根瘤内生菌,中慢生根瘤菌属物种CCNWGX022产生的新的硬脂内酯),Chemistry and Biodiversity,2007,4,893-898]、链霉菌属物种(Streptomyces sp.)(化合物8)[Khaled A.Shaaban,Mohamed Shaaban,Petrea Facey,Serge Fotso,Holm Frauendorf,Elisabeth Helmke,Armin Maier,Heinz H.Fiebig,Hartmut Laatsch,Electrospray Ionization Mass Spectra of Piperazimycins A and B andγ-Butyrolactones from a Marine-derived Streptomyces sp.(来自海洋衍生的链霉菌属物种的Piperazimycins A和B以及γ-丁内酯的电喷雾电离质谱)J.Antibiot.61(12):736-746,2008]、桑树内生真菌(Macrophomina phaseolzna)(化合物9、10&15)[Shashib,Mahat等人,structure and stereochemistry of phaseolinic acid:a new acid from Macrophomina phaseolzna(一种来自桑树内生真菌的新的酸phaseolinic acid的结构和立体化学),Journal of Natural products,1987,50(2)245-247]、Sporidiobolussalmonicolor(化合物1、3)[Laurent Dufosse等人,Chirality of theγ-Lactones Produced by Sporidiobolus salmonicolor Grown in Two Different Media(由在两种不同的介质中生长的Sporidiobolus salmonicolor产生的γ-内酯的手性),Chirality,1997,667-671]和链霉菌属(化合物7)[Shohei Sakuda等人,Biosynthetic Studies on Virginiae Butanolide A,a Butyrolactone Autoregulator from Sreptomyces.Part 2,Preparation of Possible Biosynthetic Intermediates and Conversion Experiments in a Cell-free System(对来自链霉菌属的丁内酯自动调控因子Virginiae Butanolide A的生物合成研究,部分2,可能的生物合成中间体的制备和无细胞系统中的转化实验)J.Chem.Soc.Perkin Trans.I 1993,2309-2315]。

[0055] 在一个另外的特定的实施方式中,家族I化合物可以源自海绵动物,例如南海海绵物种(Haliclonan.sp)(化合物26、27&28)[Richard J.Clark,Mary J.Garson和John N.A.Hooper,Antifungal Alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge Haliclona n.sp.(来自热带海洋海绵动物南海海绵物种的抗真菌烷基氨基醇)J.Nat.Prod.2001,64,1568-1571]、Axinellas物种(化合物25)[Miller,W.F.Tinto,J.-P.Yang,S.McLean和W.F.Reynolds,Axinellamide,a new alkaloid from the marine sponge Axinellas sp.(来自海洋海绵动物Axinellas物种的新的生物碱Axinellamide),Tetrahedron Lett.,1995,36,5851]、Plakortis nigra(化合物19-20)[Joel S.Sandler

等 人，Cytotoxic β-Carbolines and Cyclic Peroxides from the Palauan Sponge Plakortis nigra（来自Palauan海绵动物Plakortis nigra的细胞毒素 β-咔啉和环状过氧化物）J.Nat.Prod.2002,65,1258-1261] 和 Ircinia formosana（化合物 21-24)[Shen, Y.C. 等人，Novel linear C22-sesterterpenoids from sponge Ircinia formosana（来自海绵动物 Ircinia formosana 的新颖的线性的 C22- 二倍半萜类化合物），Tetrahedron Letters 47(2006)4007-4010]。化合物 26-28 是氨基甲酸酯的实例。

[0056] 在另一个特定的实施方式中，家族 I 化合物可以源自珊瑚，包括但不限于花环肉质软珊瑚 (Sarcophyton trocheliophorum) 和 Lithophyton arboretum（化合物 11&13)[Tomas Rezanka等人，γ-lactones from the softcorals Sarcophyton trocheliophorum and Lithophyton arboretum（来自软珊瑚花环肉质软珊瑚和 Lithophyton arboretum 的 γ-内酯），Tetrahedron,2001,57,8743-8749]。

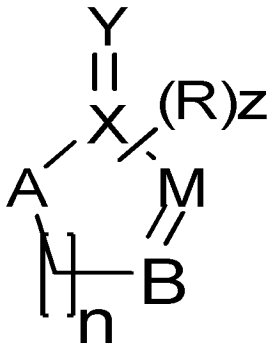
[0057] 在又一个特定的实施方式中，包括家族 I 化合物的昆虫类可以源自以下昆虫，包括但不限于雌性日本甲虫性信息素（化合物 12)[J.H.Tumlinson, Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer（由对映体雄性响应识别雌性日本甲虫性信息素抑制），Science,1977,197, 789-792] 和昆虫毒素（化合物 6)[John A.Findlay 等人，Insect toxins from spruce endophytes（来自 spruce endophytes 的昆虫毒素），Can.J.Chem.2003,81,284-292]。

[0058] 家族 I 化合物还可以包括但不限于，实例中陈述的 γ-十二内酯、δ-十三内酯、piliferolide A 和 α-庚基-γ-丁内酯。这些可以通过使用本领域已知程序的合成方法或从商业源获得。

[0059] 家族 II 化合物

[0060] 在另一个特定的实施方式中，家族 II 具有以下化学结构：

[0061]



[0062] 其中 X 是碳；Y 是氧；A、B 和 M 是碳、氧、氮、硫或其他原子，且 n 是 1 至 21。

[0063] 其中 (R)z 表示环上的基团 R 上的取代基的数量的数目 Z。R 和 R 上的取代基可以是氢、羟基、烷基羟基、烯基羟基、炔基羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、环烷基、环烯基、烷基、烯基、炔基、杂环基、杂芳基、芳族基团、芳基、NH- 取代的基团、或 N,N- 取代的基团或任何其他取代的基团。取代的 R 链中的一个的长度可以是从 1 至 25 个原子，且优选的长度是从 7 至 17 个原子。数目 Z 可以是 0、1、2、3 直到 n+2，优选的 z ＝ 0、1、2、3。

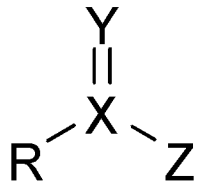
[0064] 在一个特定的实施方式中，家族 II 化合物例如化合物 29 至 36 和 44（参见图 1a 和图 1b) 可以源自天然源、化学合成或商业源。家族 II 化合物的天然源包括但不限于，植物、珊瑚、微生物、海绵动物和动物。在一个特定的实施方式中，这样的植物的实例

包括但不限于以下物种，例如小花异裂菊 (Heteroplexis micocephala)（化合物 30、31、32&33)[Fan，X.N. 等人，Chemical Constituents of Heteroplexis micocephala（小花异裂菊的化学成分）J.Nat.Prod.2009,72,1184-1190] 和热美肉豆蔻属物种 (Iryanthera species)（化合物 34)[Vieira，P.C. 等人，γ-Lactones from Iryanthera species（来自热美肉豆蔻属物种的 γ－内酯），Phytochemistry,1983,22(3)711-713] 和轮叶木姜子 (Litse verticillata)（化合物44)[Zhang,H.J. 等人，sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from Liste verticillata（来自轮叶木姜子的天然抗 HIV 成分，倍半萜和丁烯羟酸内酯），Planta Med,2005,71,452-457]。在一个更特定的实施方式中，包括家族 II 化合物的微生物源包括但不限于以下物种，例如利尻链霉菌 (Streptomyces rishiriensis)A-5969（化合物 29)[Yumiko Itoh，Hiroshi Shimura，Mayumito，NaoHaru Watanabe，Michio Yamagishi，Masaharu Tamai 和 Kazunori Hanada，novel hepatoprotective 7-lactone,MH-031,Discovery, Isolation,Physical-Chemical properties and structural elucidation（新颖的保肝药 7- 内酯 MH-031，发现、离析、物理化学性质和结构说明），The Journal of antibiotics,1991,44(8)832-837。在一个更特定的实施方式中，包括家族 II 化合物的珊瑚包括但不限于以下物种，例如 Pterogorgia anceps（化合物 35)[Guo,Y.W. 等人，Three New Butenolide Lipids from the Caribbean Gorgonian Pterogorgia anceps（来自加勒比海柳珊瑚 Pterogorgia anceps 的三种新的丁烯羟酸内酯脂类），J.Nat.Prod.1999,62,1194-1196；Manuel Lorenzo 等人，13CNMR-Based Empirical Rules to Determine the Configuration of Fatty Acid Butanolides. Novel γ-Dilactones from Pterogorgia spp（基于 13C NMR 的经验法则确定脂肪酸丁烯羟酸内酯的构型。来自 Pterogorgia 物种的新型 γ－双内酯），Organic Letters,8(22)5001-5004] 和 Pterogorgia citrine（化合物 36)[Abimael D.Rodriguez 等人，further butenolides from the Caribbean octocoral Pterogorgia citrine（来自加勒比海八射珊瑚 Pterogorgia citrine 的另外的丁烯羟酸内酯），Journal of Natural Products,1994,57(3)339-347]。

[0065] 家族 III 化合物

[0066] 在另一个特定的实施方式中，家族 III 化合物具有以下化学结构：

[0067]



[0068] 其中 X 是碳；Y 是氧；Z 是氢、羟基、烯基羟基、炔基羟基、烷基、烯基、炔基、杂环基、芳族基团、芳基、NH- 取代的基团、或 N，N- 取代的基团或任何其他取代的基团。

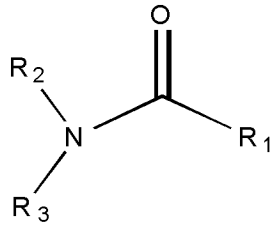
[0069] 其中 R 是烯基羟基、炔基羟基、烷基、烯基、炔基、杂环基、芳族基团、芳基、NH- 取代的基团、或 N，N- 取代的基团或任何其他取代的基团。R 链的长度可以是从 1 至 50，优选从 7 至 17。

[0070] 在一个特定的实施方式中，家族 III 化合物例如化合物 37 至 43（图 1a 和图 1b）可以源自天然源或商业源或通过化学合成得到。家族 III 化合物的天然源包括但不限于，植

物、珊瑚、微生物、海绵动物和动物。在一个更特定的实施方式中，植物源包括但不限于，胡椒 (Piper spp)（化合物 43)[Likhitwitayawuid,K.,Ruangrungsi,N,Lange,G 和 Decicco, C., Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from Piper Samentosum(从假蒟离析的新组分的结构说明和合成),Tetrahedron 1987(43)3689-3694；Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K 和 Yoshimura, H.Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans.IV.Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper(对内脏幼虫移行症有效的生药的研究.IV. 胡椒中杀幼虫成分的离析和鉴定)Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1988(36):2452]。在一个更特定的实施方式中，珊瑚包括但不限于，Plexaura flava（化合物 42)[B.N.Ravi 等人，Lipid and Terpenoid Metabolites of the Gorgonian Plexaura flava（柳珊瑚 Plexaura flava 的脂类和萜类代谢产物），Aust.J.Chem.,1982,35,105-12]，且在一个更特定的实施方式中，包括家族 III 化合物的微生物包括但不限于以下物种，例如巨大鞘丝蓝细菌 (Lyngbyamajuscula) 和裂须藻 (Schizothrix calcicola)（化合物 39、40)[George G.Harrigan 等人，Tumonoic Acids,Novel Metabolites from a Cyanobacterial Assemblage of Lyngbya majuscula and Schizothrix calcicola（来自巨大鞘丝蓝细菌和裂须藻的蓝细菌集合物的新颖的代谢产物 Tumonoic Acid)，J.Nat.Prod.1999,62, 464-467]、铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)（化合物 41)[Michael, K.Winson. 等人，Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in Pseudomonasaeruginosa（铜绿假单胞菌中的毒力决定子和次级代谢产物的多个 N- 酰基 -L- 高丝氨酸内酯信号分子调节生产），Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1995,92,9427-9431]、胡萝卜软腐欧文氏菌 (Erwinia carotovora)（化合物37)[Gu"nter Brader,Solveig Sjo"blom,Heidi Hyytia"inen,Karen Sims-Huopaniemi 和 E.Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an Acylhomoserine Lactone Synthase in Bacterial Communication（改变细菌通信中的酰基高丝氨酸内酯合酶的基质链长度特异性），The Journal of Biological Chemistry,2005,280(11)10403-10409] 和磷发光杆菌 (Photobacterium phosphoreum)（化合物 38)[L.R.Flodgaard, P.Dalgaard, J.B.Andersen, K.F.Nielsen, M.Givskov 和 L.Gram, Nonbioluminescent Strains of Photobacterium phosphoreum produce the Cell-to-Cell Communication Signal N-(3-Hydroxyoctanoyl)homoserine Lactone(磷发光杆菌的非生物发光菌株产生细胞对细胞通信信号 N-(3- 羟基辛酰基）高丝氨酸内酯），Applied and Environmental Microbiology,2005,71(4),2113-2120]。

[0071] 在又一个特定的实施方式中，家族 III 化合物可以是具有以下结构的假蒟亭碱类似物：

[0072]



[0073] 其中 R1 是烷基、烯基、炔基、杂环基、芳族基团、芳基、NH- 取代的基团、或 N，N- 取代的基团，且 R1 链的长度是从 4 至 20 个原子，且优选地从 6 至 12 个原子。

[0074] 其中 R2 和 R3 是烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳族基团、芳烷基、杂环基或杂芳基；或可选择地 R2+R3+N 可以是包含 N 的杂环部分，

[0075] 其中当 R2+R3+N 是包含 N 的杂环部分时，R1 是烷基、烯基、炔基、杂环基、NH- 取代的基团或 N，N- 取代的基团。

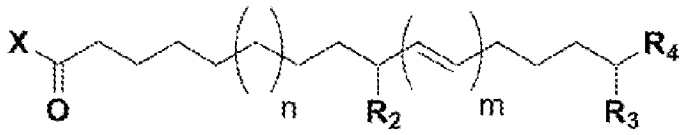
[0076] 在一个最特定的实施方式中，假蒟亭碱类似物是 N- 环戊基癸酰胺、N-（癸酰基）吡咯烷、N-（癸酰基）哌啶、N-（癸酰基）六亚甲基亚胺、N- 环戊基癸烯酰胺、(N-（癸烯酰基）吡咯烷、N-（癸烯酰基）哌啶、N-（癸烯酰基）六亚甲基亚胺和 N-（癸烯酰基）哌啶。

[0077] 假蒟亭碱类似物可以使用本领域已知的程序来获得，所述程序可以包括但不限于，2009 年 7 月 21 日提交的申请系列第 61/227,412 号中陈述的那些。

[0078] 在又一个特定的实施方式中，化合物可以源自荧光假单胞菌且被表征为具有羟基化不饱和脂肪酸结构，该羟基化不饱和脂肪酸结构包括至少一个羧酸部分、至少一个不饱和部分和至少一个醇基团；核结构中分子量从 285 至约 310；至少 15 个碳和至少 3 个氧。

[0079] 在本发明的一个更特定的实施方式中，提供了具有以下结构的化合物

[0080]



[0081] 其中：X 各自独立地是 --OH、--NR_1或 --S，其中 R_1是 --H 或 C_1-C_6烷基；n ＝ 0 至 15，R_2至 R_4各自独立地是 --H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环、取代的杂环、环烷基、取代的环烷基、烷氧基、取代的烷氧基、硫代烷基、取代的硫代烷基、羟基、卤素、氨基、酰氨基、羧基、--C(O)H、酰基、氧代酰基、氨基甲酸酯、磺酰基、磺酰胺、或磺酰；m ＝双键、三键。

[0082] 在一个最具体的实施方式中，化合物具有以下结构

[0083]



。

[0084] 生产方法

[0085] 如上所述，本发明的化合物和组合物可以获自、可得自或源自具有假单胞菌属物种的识别特征的生物体，更具体地获自、可得自或源自具有荧光假单胞菌的菌株的识别特征的生物体或可选择地获自、可得自或源自具有如美国专利第 6,194,194 号陈述的荧光假单胞菌分离株 ATCC 55799 的识别特征的生物体。该方法包括培养这些生物体和通过从这些生物体的细胞离析这些化合物来获得本发明的化合物和 / 或组合物。

[0086] 特别地，使用本领域已知的方法在营养培养基中培养生物体。生物体可以通过摇瓶培养、在合适的培养基中和在允许细胞生长的条件下进行的在实验室或工业发酵罐中小规模或大规模发酵（包括但不限于，连续发酵、分批发酵、分批补料发酵或固态发酵）来培养。培养可以在包括碳源和氮源以及无机盐的合适的营养培养基中使用本领域已知的程序来进行。合适的培养基是可得到的，可以从商业源得到或根据已公布的组成来制备。特定

的实施方式被公开在下文的实施例中和在美国专利第 6,194,194 号中。

[0087] 在培养之后，可以将细胞浓缩和随后悬浮在缓冲液中以获得细胞悬浮液。可以从该悬浮液提取本发明的化合物和 / 或组合物。提取物可以通过色谱法来分级。使用本领域已知的方法，色谱法可以测定对于软体动物例如贻贝、蜗牛（例如，水生蜗牛和 / 或花园蜗牛）和 / 或蛞蝓的毒性活性；一个特定的实施方式被公开在下文的实施例中。可以使用相同的或不同的色谱方法重复该过程一次或多次。

[0088] 本发明的化合物还可以通过合成方法来获得。可选择地，对于肽化合物，化合物可以通过使用本领域已知的方法在重组 DNA 宿主中表达编码这些化合物的核酸序列来获得。

[0089] 制剂

[0090] 本发明的组合物可以包含可用于控制软体动物，特别地腹足纲和 / 或双壳纲类的成员和更具体地贻贝、蜗牛和蛞蝓的化学品或生物杀虫剂产品。本发明涉及经离析的化合物，所述经离析的化合物可获自或源自 (a) 微生物，例如假单胞菌属物种，更具体地荧光假单胞菌或可选择地，具有假单胞菌属 ATCC 55799 的识别特征的生物体；(b) 对选自由以下组成的组的软体动物类的成员有毒：双壳纲，特别地，贻贝（例如，Dreissana 物种）和 / 或腹足纲，特别地，蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种），和 / 或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）和 (c) 具有通过液相色谱法 / 质谱法 (LC/MS) 测定的选自由约 540-550 和约 1280-1335 组成的组的分子量。这些组合物可以被配制成可以用于控制软体动物，特别地腹足纲和 / 或双壳纲类的成员和更具体地贻贝、蜗牛和蛞蝓的组合物。

[0091] 实例包括但不限于，氯和源自假单胞菌属物种的物质，如例如美国专利第 6,194,194 号中所描述的。此外，上面公开的和本发明中使用的化合物可以被制成组合物（还可选择地被称为“制剂”）和可以被配制成任何形式。非限制性制剂实例包括可乳化的浓缩物 (EC)、可湿性粉剂 (WP)、可溶的液体 (SL)、气溶胶、超低容量浓缩物溶液 (ULV)、可溶性粉剂 (SP)、微囊化、水分散的颗粒、胶悬剂 (FL)、微乳 (ME)、纳米乳液 (NE) 等。在本文描述的任何制剂中，活性成分的百分数在 0.01％至 99.99％的范围内。在一个特定的实施方式中，制剂可以不含表面活性剂。

[0092] 可以在本发明的组合物中使用的惰性材料的实例包括但不限于，无机矿物，例如高岭土、云母、石膏、层状硅酸盐、碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐；或植物材料，例如木制品、软木、粉状玉米棒子、稻壳、花生壳和胡桃壳。在一个特定的实施方式中，惰性材料可以获自或源自以对应于约 1 至 20NTU（归一化浊度单位）的约 1 至 20mg/ 升的比例悬浮在水中的粘土矿物（高岭石、蒙脱石、绿坡缕石）。用于增强贻贝虹吸作用的惰性材料可以以固体形式或作为水溶液优选地水中的悬浮液被直接地应用到其中贻贝被处理的水或位置（例如，固体表面）。在一个特定的实施方式中，为了增强产品功效，在用化学品或生物杀虫剂产品处理之前，可以将没有营养值但具有足够小的粒度的诸如粘土、粉砂、沉积物或任何其他材料的惰性材料悬浮在水中。

[0093] 使用方法

[0094] 本发明的化合物和组合物可以用于在水体中或在软体动物例如贻贝、蜗牛和 / 或

蛞蝓聚集的表面上或可选择地作为油漆中的防污剂控制软体动物，特别是腹足纲和 / 或双壳纲类的成员，更具体地是贻贝（例如，Dreissana 物种）和 / 或腹足纲，特别是蜗牛，包括但不限于水生蜗牛（例如，贝罗比属物种）和花园蜗牛，包括但不限于褐色花园蜗牛、白色花园蜗牛（例如，Cantareus 物种、Cornu 物种、Theba 物种）和 / 或蛞蝓，包括但不限于庭院灰蛞蝓（例如，Deroceras 物种）、带状的蛞蝓或三带蛞蝓（例如，Lehmannia 物种）、黄褐色蛞蝓（例如，Limacus 物种）和温室蛞蝓（例如，Milax 物种）。在被用作油漆中的防污剂的情况中，它以抗生长性的杀生物有效的量存在。软体动物例如贻贝、蜗牛和 / 或蛞蝓聚集的表面包括但不限于塑料、混凝土、木、玻璃纤维、由铁和聚氯乙烯制成的管和覆盖有油漆和 / 或涂层的表面。涂层可以由颜料、粘合剂、添加剂和 / 或载体流体配制，且优选地以薄膜形式应用以提供对表面的保护或装饰。将以 10-200mg/L、更具体地以 25-100mg/L(ppm) 或 25-10000mg/kg 使用最终产物（其包含活性化合物）。它将作为干燥产物或悬浮在水中通过具体的应用泵和混合系统而被应用到管、堤坝结构、存储槽和开放水域例如水流、河、湖泊、灌溉渠、池塘和湖泊。

[0095] 在一个特定的实施方式中，本发明涉及用于改善用于控制侵入性软体动物特别是贻贝的材料的生物杀虫和杀虫活性的方法，该方法包括以下步骤：

[0096] 1. 在化学品或生物杀虫剂处理之前，将惰性材料例如粘土悬浮在水中以触发虹吸作用活性，持续约 1 小时 -24 小时

[0097] 2. 以所需的水平将化学品或生物杀虫剂添加到水中

[0098] 本发明还涉及包括以下步骤的方法：结合惰性材料例如粘土施用微生物生物杀虫剂，以增强贻贝的摄入以及由此提高死亡率。

[0099] 为了激活贻贝虹吸作用，在用化学品 / 杀虫剂处理之前，该粘土（浊度）处理应进行约 1 小时至 6 小时，通常约 3 小时 -4 小时，以及约 1 小时至 24 小时，通常约 14 小时 -18 小时。可选择地，浊度处理可以与化学品或生物杀虫剂处理同时应用。

[0100] 根据本发明的一个实施方式，软体动物例如贻贝、蜗牛和蛞蝓的处理可以在 500-mL 玻璃缸中或在由压克力板 (acrylic sheet) 构成的生物盒中进行。在玻璃缸中，由通过连接于尼龙管道的水族箱空气石的气流提供处理期间的充气。在生物盒中，水以 1 加仑每分钟的速率恒定地流动。

[0101] 可以通过移液或经由蠕动泵将用于浊度处理以及用于化学品 / 生物杀虫剂产品的材料混合在水中。在生物盒中，在注入点处使用桨叶式混合器来实现更均一的混合。本发明的组合物可以以用于直接应用或作为需要在应用之前用适量的水或其他稀释剂稀释的浓缩组合物或初级组合物的合适形式。

[0102] 浊度材料的有效量将取决于应用、水温（如果应用到水）和处理的持续时间。通常，可以以从约 1mg 每升至约 20mg 每升的比例应用组合物；优选地以从约 5mg 每升至约 10mg 每升的比例，以使得测量的浊度不会超过 20NTU。

实施例

[0103] 呈现下面的实施例以描述本发明的优选的实施方式和效用，且下面的实施例不旨在限制本发明，除非在所附权利要求中以其他方式说明。

[0104] 实施例 1：软体动物杀灭剂研究

[0105] 材料和方法

[0106] 1. 允许斑驴贻贝在小的培养皿中适应 24 小时。

[0107] ○将贻贝倾倒到培养皿以便判断贻贝是否存活。丢弃死亡的和空的贻贝。

[0108] ○数出 10 个活的 / 健康的贻贝。

[0109] ○将 10 个活的 / 健康的贻贝放在具有硬水的每一个小的培养皿中。

[0110] ○保持一个单独板的贻贝。这些是将用于在 24 小时之后代替其他实验板中的死亡的或空的贻贝的“额外贻贝”。

[0111] ○由于低的水体积（溶解氧是高的），所以不需要充气。

[0112] 2. 贻贝处理的天数：

[0113] ○检查贻贝（当检查贻贝时总是使用橡胶刮子。仅使用镊子除去死亡贻贝）。

[0114] ○计数以便确保每个小的培养皿中存在 10 个活的 / 健康的贻贝。

[0115] ○准备好样品。

[0116] ○对每一个样品，在 50ml falcon 管中用硬水适当地稀释。在计量 (dosing) 之前涡旋以便混合。

[0117] ○ EX：70ppm，每样品 2 次重复。将 34ml 硬水加入到 falcon 管。将 51μl 的样品加入到具有硬水的相同的 falcon 管。在计量之前涡旋以便混合。

[0118] 3. 计量：

[0119] ○在计量之前涡旋样品。

[0120] ○使用 25ml 血清移液管，上下吸取以便混合。将 15ml 的混合物移液到每一个小的培养皿。

[0121] ○令贻贝不受干扰地静置 24 小时。记录时间和日期。

[0122] 4. 在处理之后 24 小时：

[0123] ○在计量后 24 小时之后，除去处理水并检查贻贝死亡率。

[0124] ○倾倒处理水。在将水加入到每一个小的培养皿之前用清洁硬水冲洗 3 次。

[0125] ○对所有的培养皿重复该过程。

[0126] ○在测试之后必须热压处理所有的培养皿。在热压处理之后，用水洗涤缸。

[0127] 5. 计算死亡率

[0128] ○死亡率（%）＝ 100*（处理中的总死亡贻贝 - 空白中的总死亡贻贝）/ 总贻贝处理

[0129] 用商业化合物进行的研究

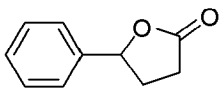
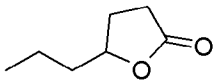
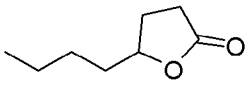
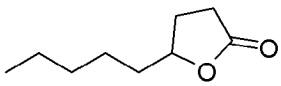
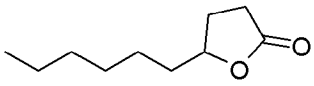
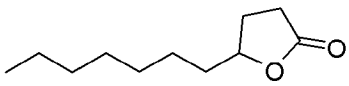
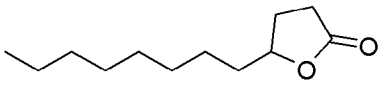
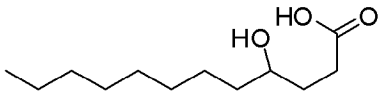
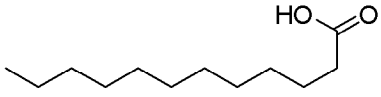
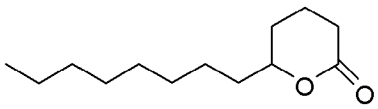
[0130] 以 11.1μg/ml 的最终浓度检查从 Sigma-Aldrich 获得的商业化合物。在表 1 中示出结果。

[0131] 表 1. 商业化合物的软体动物杀灭效果

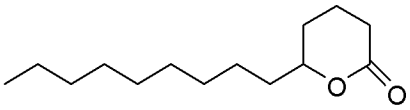
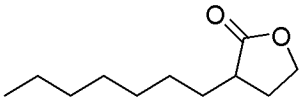
[0132]

序号	结构	浓 度 [μg/ml]	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时

[0133]

SAR-013	 γ-苯基-γ-丁内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-011	 γ-庚内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-010	 γ-辛内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-008	 γ-壬内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-014	 γ-癸内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-009	 γ-十一碳烷酸内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-001	 γ-十二内酯	11.1	86.7±5.8	96.7±5.8	96.7±5.8	96.7±5.8
SAR-006	 4-羟基十二烷酸	11.1	0	0	0	0
SAR-005	 十二烷酸	11.1	0	0	0	0
SAR-003	 δ-十三内酯	11.1	3.3±5.7	10 ± 10	10 ± 10	10 ± 10

[0134]

SAR-004	 δ-肉豆蔻内酯	11.1	0	0	0	0
SAR-002	 α-庚基-γ-丁内酯	11.1	30± 10	66.7±15.3	73.3± 11.5	76.7 ±15.3

[0135] 合成化合物

[0136] 针对斑驴贻贝以 11.1 μg/ml 的最终浓度筛选合成化合物。以下程序用于获得化合物。

[0137] 酰胺的合成：向二氯甲烷 (20ml) 中的冰冷的羧酸 (3mmol) 溶液顺序地加入 1- 乙基 -3-(3′ - 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (3.3mmol) 和 4- 二甲基氨基吡啶 (3mmol)。在 5min 之后，将胺 (3.3mmol) 加入到反应溶液。使反应缓慢地升温到室温并持续过夜。用乙酸乙酯 (200mL) 萃取反应。用无水硫酸钠干燥有机相。在真空下蒸发之后，使用己烷中的适当比率的乙酸乙酯，使残留物穿过硅胶柱。最终产物的收率在从 85％至 90％的范围内。用质子 NMR 表征最终产物。

[0138] N- 环戊基肉桂酰胺 (SAR-023)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)7.62(d,J = 15.6Hz,1H),7.50(d,J = 7.0Hz,2H),7.35(m,3H),6.37(d,J = 15.6,1H),5.61(d,J = 5.0,Hz,1H,NH),4.35(六重峰,J = 7.0,1H),2.06(m,2H),1.71(m,2H),1.64(m,2H),1.46(m,2H)。

[0139] N-(反式肉桂酰基) 吡咯烷 (SAR-024)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)7.70(d,J = 15.5Hz,1H),7.53(d,J = 7.0Hz,2H),7.36(m,3H),6.74(d,J = 15.5,1H),3.63(t,J = 7.0,2H),3.60(t,J = 7.0,2H),2.01(五重峰,J = 7.0,2H),1.91(五重峰,J = 7.0,2H)。

[0140] N-(反式肉桂酰基) 哌啶 (SAR-025)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)7.64(d,J = 15.5Hz,1H),7.52(d,J = 7.2Hz,2H),7.36(m,3H),6.90(d,J = 15.5,1H),3.67(s,2H),3.59(s,2H),1.68(m,2H),1.62(m,4H)。

[0141] N-(反式肉桂酰基) 六亚甲基亚胺 (SAR-026)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)7.70(d,J = 15.4Hz,1H),7.52(d,J = 7.6Hz,2H),7.36(m,3H),6.88(d,J = 15.4,1H),3.63(t,J = 6.0,2H),3.61(t,J = 6.0,2H),1.76(m,4H),1.59(m,4H)。

[0142] N- 环戊基癸酰胺 (SAR-020)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)5.35(br,1H),4.22(六重峰,J = 7.00,1H),2.12(t,J = 7.20,2H),1.98(m,2H),1.59-1.67(m,6H),1.26-1.36(m,14H),0.88(t,J = 7.00,3H)。

[0143] N-(癸酰基) 吡咯烷 (SAR-007)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)3.45(t,J = 6.80,2H),3.40(t,J = 6.80,2H),2.24(t,J = 7.20,2H),1.94(五重峰,J = 6.80,2H),1.84(五重峰,J = 6.80,2H),1.62(五重峰,J = 7.20,2H),1.25-1.30(m,12H),0.87(t,J = 7.20,3H)。

[0144] N-(癸酰基) 哌啶 (SAR-021)：^{1}H NMR($CDCl_3$)：δ (ppm)3.55(t,J = 5.20,2H),3.39(t,J = 5.20,2H),2.31(t,J = 7.60,2H),1.58-1.65(m,4H),1.52-1.57(m,4H),1.20-1.30(m,12H),0.87(t,J = 7.20,3H)。

[0145] N-(癸酰基)六亚甲基亚胺(SAR-022):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)3.52(t,J=6.00,2H),3.42(t,J=6.00,2H),2.30(t,J=7.80,2H),1.66-1.74(m,4H),1.60-1.66(m,2H),1.50-1.6.0(m,4H),1.20-1.30(m,12H),0.87(t,J=7.20,3H)。

[0146] N-环戊基癸烯酰胺(SAR-027):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)6.82(dt,J1=15.20,J2=7.20,1H),5.71(d,J=15.20,1H),5.33(br,1H),4.27(六重峰,J=7.00,1H),2.15(m,2H),2.10(m,2H),1.67(m,2H),1.60(m,2H),1.40(m,4H),1.28(m,8H),0.88(t,J=7.00,3H)。

[0147] N-(癸烯酰基)吡咯烷(SAR-030):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)6.90(dt,J1=15.20,J2=7.00,1H),6.07(d,J=15.20,1H),3.52(t,J=6.30,2H),3.50(t,J=6.30,2H),2.19(m,2H),1.96(五重峰,J=7.00,2H),1.85(五重峰,J=7.00,2H),1.44(m,2H),1.28(m,8H),0.88(t,J=7.00,3H)。

[0148] N-(癸烯酰基)哌啶(SAR-031):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)6.82(dt,J1=15.20,J2=7.00,1H),6.23(d,J=15.20,1H),3.59(t,J=6.30,2H),3.47(t,J=6.30,2H),2.17(m,2H),1.64(五重峰,J=5.60,2H),1.56(五重峰,J=5.60,4H),1.44(五重峰,J=7.00,2H),1.28(m,8H),0.88(t,J=7.00,3H)。

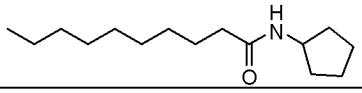
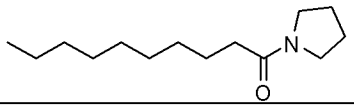
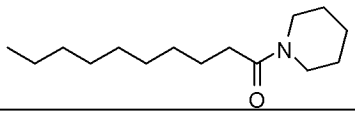
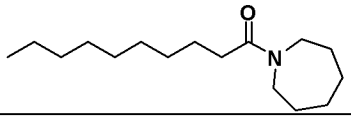
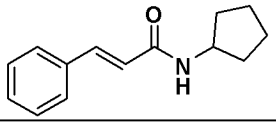
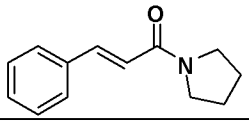
[0149] N-(癸烯酰基)六亚甲基亚胺(SAR-032):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)6.91(dt,J1=15.20,J2=7.00,1H),6.21(d,J=15.20,1H),3.57(t,J=6.00,2H),3.49(t,J=6.00,2H),2.17(m,2H),1.73(m,4H),1.56(m,4H),1.45(m,2H),1.28(m,8H),0.88(t,J=7.00,3H)。

[0150] N-(癸烯酰基)哌啶(SAR-033):^{1}H NMR($CDCl_3$):δ(ppm)6.82(dt,J1=15.20,J2=7.00,1H),6.23(d,J=15.20,1H),3.59(t,J=6.30,2H),3.47(t,J=6.30,2H),2.17(m,2H),1.64(五重峰,J=5.60,2H),1.56(五重峰,J=5.60,4H),1.44(五重峰,J=7.00,2H),1.28(m,8H),0.88(t,J=7.00,3H)。

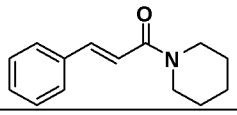
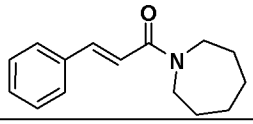
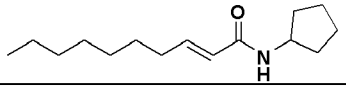
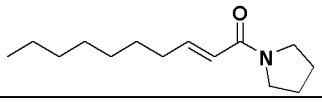
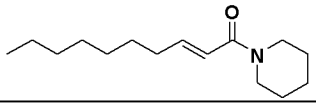
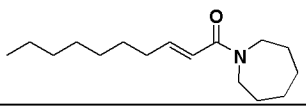
[0151] 在表2中示出结果。

[0152] 表2. 合成酰胺对斑驴贻贝的效力

[0153]

序号	结构	浓 度 [μg/ml]	24 小时	48 小时	72 小时	96 小时
SAR-020		11.1	75 ±7	75 ±7	75 ±7	75 ±7
SAR-007		11.1	35 ± 7	50 ± 14	55 ± 21	65 ± 21
SAR-021		11.1	55 ± 21	55 ± 21	60 ±14	65 ± 7
SAR-022		11.1	35 ± 7	40 ± 14	40 ± 14	45 ±21
SAR-023		11.1	0	0	0	0
SAR-024		11.1	0	0	0	0

[0154]

SAR-025		11.1	0	0	0	0
SAR-026		11.1	0	0	0	0
SAR-027		11.1	85 ± 7	95 ± 7	95 ± 7	95 ± 7
SAR-031		111	20 ± 14	35 ±35	35 ±35	40 ± 28
SAR-032		11.1	45 ±21	50 ±14	80 ± 14	80 ± 14
SAR-033		11.1	70 ±14	75 ±21	75 ±21	75 ±21

[0155] 实施例 2. 欧文氏菌属提取物

[0156] 胡萝卜软腐欧文氏菌在 LB 肉汤（每升 :10g 胰蛋白胨,5g 酵母提取物,10g NaCl, pH ＝ 7.5) 上生长。通过从甘油储备液划线 TSA（胰蛋白酶大豆琼脂）板来生长接种物。通过菌落形态学的目视检查确认培养物的纯度。使用无菌的 10 μ L 环,从琼脂表面收集菌落,

并将其重新悬浮在 250ml 带螺帽的不带障板锥形烧瓶中的 50ml 的 LB 肉汤中。在 200rpm 和 25℃下孵育液体培养物 48 小时 -72 小时。

[0157] 在 72 小时之后，用乙酸乙酯萃取全部肉汤。在真空下干燥有机相。将干燥的提取物制成二甲基亚砜 (DMSO) 中的 5.0mg/mL 溶液。然后，将这样的溶液 (100μL) 加入到 45mL 硬水。乙酸乙酯提取物的最终浓度是 11.1ppm。

[0158] 表 3 中示出的数据表明，当在 LB 培养基中生长时，在胡萝卜软腐欧文氏菌中产生针对斑驴贻贝的生物活性化合物。以上所描述的化合物 37(图 1b) 是由在 LB 培养基中生长的胡萝卜软腐欧文氏菌产生的内酯中的一种 [Gu¨nter Brader, Solveig Sjo¨blom, Heidi Hyytia¨inen, Karen Sims-Huopaniemi 和 E. Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an Acylhomoserine Lactone. Synthase in BacterialCommunication(改变酰基高丝氨酸内酯的基质链长度特异性 . 细菌通信中的合酶), Journal of Biological Chemistry, 2003, 280(11)1040310409]。

[0159] 表 3 :LB 肉汤中生长的胡萝卜软腐欧文氏菌的乙酸乙酯提取物的功效

[0160]

处理	%死亡率(24 小时)	%死亡率(48 小时)	%死亡率(72 小时)	%死亡率(96 小时)	% 死 亡 率 (120 小时)	% 死 亡 率 (144 小时)
胡萝卜软腐欧文氏菌	30±0	75±7	80±0	80±0	80±0	90±14
空白	0	0	0	0	0	0

[0161] 实施例 3 :从假单胞菌属离析软体动物杀灭化合物

[0162] 研究 A

[0163] 化合物的分级

[0164] 以下程序用于从荧光假单胞菌 CL-145A 的洗涤过的细胞提取的化合物的分级 :

[0165] 将源自 FM2 生长培养基中的 10-L 发酵荧光假单胞菌 CL 145A(ATCC55799) 的细胞沉淀 (pellet) 悬浮在稀释缓冲液中，并用 Amberlite XAD-7 树脂来提取 (Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of Genus Streptomyces strain CNQ-085(来自链霉菌属菌株 CNQ-085 的源自海洋的放线菌的微弱生物毒素多聚乙酰 Daryamide A-C) J. Nat. Prod. 69 :1756-1759 ; Williams, P.G., Miller, E.D., Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from Marine Actinomycete Salinispora arenicola(来自海洋放线菌 Salinispora arenicola 的 26 元环大环内酯 Arenicolide A-C). J. Org. Chem. 72 :5025-5034), 通过在室温下以 225rpm 将细胞悬浮液和树脂摇动两个小时进行。经由过滤通过粗棉布收集树脂和细胞团块，并且用 DI 水洗涤以便除去盐。然后，将树脂、细胞团块和粗棉布在丙酮中浸泡 2 小时，此后将丙酮过滤并使用旋转蒸发仪在真空下干燥，以便给出粗提取物。然后，通过使用反相 C18 真空液相色谱法 (H_2O/CH_3OH ; 梯度 90% :20% 到 0% :100%) 来分级粗提取物以给出 7 种级分。然后使用旋转蒸发仪将这些级分浓缩至干燥，且使用采用斑驴贻贝的活贻贝缸测试生物测定以及采用淡水蜗牛胚胎细胞系 (光滑双脐螺 (Biomphalaria glabrata))

的基于细胞的测定两者来筛选所得到的干燥残余物的生物学活性。在实施例 #2 和实施例 #3 中更详细地描述了生物测定。然后，使活性级分经历反相 / 正相 HPLC(Spectra System P4000(Thermo Scientific)) 以给出纯的化合物，然后在上述生物测定中筛选该纯的化合物，以找出 / 确定活性化合物。为了确认化合物的身份，记录另外的光谱数据例如 LC/MS 和 NMR。

[0166] 在图 3 中示出所使用的方法的图解。基于活的贻贝和蜗牛细胞测定两者，级分 #4 和 #5 包含活性化合物。在通过以 2.5mL/min 流速和 210nm 的 UV 检测的 HPLC(C-18 柱，水 :乙腈梯度溶剂系统 (0-10min ;30％ -40％含水 CH_3CN,10-20min ;40％ -60％含水 CH_3CN,20-60min ;60％ -80％含水 CH_3CN,60-65min ;80％ -100％含水 CH_3CN)) 分离的所有化合物中，峰编号 20，保留时间 51.66min，21，保留时间 52.56min，和 22A 保留时间 59.61min 在生物测定中抑制蜗牛细胞的生长 (例如，低的 OD600 值)。

[0167] 在 LCQ DECA XP^{plus} 质谱仪 (Thermo Electron Corp.，San Jose，CA) 上以全扫描模式 (m/z 100-1500Da) 使用正电离模式和负电离模式两者，在 Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus 电喷雾 (ESI) 仪器上执行活性峰的质谱法分析。热高效液相色谱法 (HPLC) 仪器配备有 Finnigan Surveyor PDA 加上检测器、自动取样器加上 MS 泵和 4.6mm x 100mm Luna C185μm 柱 (Phenomenex)。溶剂系统由水 (溶剂 A) 和乙腈 (溶剂 B) 组成。流动相以 10％溶剂 B 开始，且在 20min 内线性增加到 100％溶剂 B，且然后保持 4min，且最后在 3min 内返回到 10％溶剂 B 并保持 3min。流速是 0.5mL/min。注射体积是 10μL，且在自动取样器中将样品保持在室温。由利用 LC 和反相色谱法的 LC-MS 来分析该化合物。在以下条件下执行本化合物的质谱法分析 :对于护套和辅助 / 吹扫气体流速，氮气流速分别被固定在 30arb 和 15arb。以设置在 5000V 的喷雾电压和设置在 35.0V 的毛细管电压执行电喷雾电离。毛细管温度被设置在 400℃。在 Xcalibur 软件上分析数据。在正电离模式中，峰 #20 处的活性化合物具有 1294.75 的分子质量。在正电离模式中，另一种活性化合物 (峰 #22A) 的 LC-MS 色谱图表明 1320.83 的分子质量。

[0168] 为了进行结构说明，使用 600MHz NMR 仪器进一步分析来自活性峰 #20 的部分纯化的化合物，且在 $CDCl_3$ 中具有在以下处的 δ 值 :δ 9.25、8.36、8.06、7.82、7.71、7.52、7.45、6.82、6.36、6.08、5.42、5.39、5.30、5.14、4.68、4.42、4.31、4.16、4.11、4.07、3.95-3.86、3.83、3.72、3.66、3.53、3.48、3.37、3.17、3.06、2.56、2.53、2.45、2.32、2.21、2.02、1.96、1.84、1.72、1.65、1.61、1.51、1.48-1.37、1.32、1.12、0.94、0.91、0.68。NMR 数据表明，该化合物包含氨基、酯、羧酸、苯基、吲哚、脂族甲基、乙基、亚甲基、甲醛、次甲基、邻甲基、氧代次甲基和硫基团。

[0169] 同样地，使用生物测定引导的分级的活性级分 #4 的在以 10mL/min 流速乙腈 :水溶剂系统 (0-10min ;35％ -45％含水的 CH_3CN,10-20min ;45％ -60％含水的 CH_3CN,20-50min ;60％ -85％含水的 CH_3CN,50-60min ;85％ -100％含水的 CH_3CN,60-70min ;100％ CH_3CN) 和 210nm UV 检测的 C-18 柱上的 HPLC 分析得到具有针对活的贻贝和蜗牛胚胎细胞两者的活性的多个峰。大部分活性被集中在峰 #27 保留时间 47.73min 和 #30 保留时间 51.52min。

[0170] 通过 LC/MS 进一步分析峰 #27 和 #30。基于该结果，峰 #27 包含多种化合物，且两种主要组分具有大约 643 和 984 的质量。峰 #30 包含较少的化合物，且质量分析表明该峰下的主要组分的分子质量是大约 546。

[0171] 贻贝生物测定测试

[0172] 该活的贻贝生物测定测试用于指导通过使用 HPLC 和 LC-MS 作为分析工具的样品分级的活性化合物的鉴定。

[0173] 在室温下将二十个新近收集的斑驴贻贝放置在包含 250mL 的脱氯自来水的缸中。将缸保持在室温并连接到通过起泡提供恒定空气供应的歧管。分别以 1-5mg 的浓度将溶解在 DMSO 中的每一个测试对象 (HPLC 级分或峰) 移液到缸中，且用测试对象孵育贻贝 24 小时。在孵育期之后，丢弃每一个缸中的水，且用淡水漂洗贻贝并将其转移到开口玻璃培养皿，持续 10 天的观察期。每日检查贻贝的死亡率，且除去并丢弃死亡的贻贝。每一种处理平行进行三次，且在 10 天的孵育期结束时，计算每一种处理的％死亡率。

[0174] 基于细胞的测定

[0175] 作为可选择的方法，该基于细胞的测定用作利于在发酵之后离析和鉴定荧光假单胞菌细胞中的活性化合物的工具。

[0176] 淡水蜗牛的胚胎细胞 (光滑双脐螺，ATCC CRL-1494) 用作已知对荧光假单胞菌生物毒素敏感的贻贝消化腺上皮细胞的模型系统。对于该测定，将在包含果蝇介质、胎牛血清、d- 半乳糖和乳清蛋白的完全生长培养基中的 200 μ L 的活跃生长的细胞加入到无菌 96 孔板中的每一个孔。将溶解在 DMSO 中的测试化合物 (以 20mg/mL 的 HPLC 级分或峰) 加入到每一个孔，且覆盖该板并将其在 23℃和 5％ CO_2的受控环境中孵育。使用具有 SoftMax Pro 软件的 SpectraMax 板读数器在 600nm 测量活性 (生长抑制＝低浊度)，且将该活性与使用纯 DMSO 作为测试化合物的阴性对照进行比较。每一种处理平行进行四份，且在每一个板中包括一个重复的阳性对照处理。

[0177] 研究 B

[0178] 方法和材料

[0179] 以下程序用于从荧光假单胞菌的细胞培养物提取的化合物的纯化，且被概括在图 3 中。具体地，将源自 FM2 生长培养基中的 10-L 发酵荧光假单胞菌 CL 145A(ATCC 55799) 的细胞沉淀悬浮在稀释缓冲液中，并用 Amberlite XAD-7 树脂来提取 (Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W.2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of Genus Streptomyces strain CNQ-085(来自链霉菌属菌株 CNQ-085 的源自海洋的放线菌的微弱生物毒素多聚乙酰 Daryamide A-C)J.Nat.Prod.69 :1756-1759 和 Williams, P.G, Miller, E.D., Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007.Arenicolides A-C,26-Membered Ring Macrolides from Marine Actinomycete Salinispora arenicola(来自海洋放线菌 Salinispora arenicola 的 26 元环大环内酯 Arenicolide A-C). J.Org.Chem.72 :5025-5034)，通过在室温下以 225rpm 将细胞悬浮液和树脂摇动两个小时进行。经由过滤通过粗棉布收集树脂和细胞团块，并且用 DI 水洗涤以便除去盐。然后，将树脂、细胞团块和粗棉布在丙酮中浸泡 2 小时，此后将丙酮过滤并使用旋转蒸发仪在真空下干燥，以便给出粗提取物。然后，通过使用反相 C18 真空液相色谱法 (H_2O/CH_3OH ；梯度 90％ :20％到 0％ :100％) 来分级粗提取物以给出 7 种级分。然后使用旋转蒸发仪将这些级分浓缩至干燥，且使用采用斑驴贻贝的活贻贝缸测试生物测定以及采用淡水蜗牛胚胎细胞系 (光滑双脐螺) 的基于细胞的测定两者筛选所得到的干燥残余物的生物学活性。然后，使活性级分经历反相 HPLC(Spectra System

P4000(Thermo Scientific)) 以便给出纯的化合物，然后在上述生物测定中筛选该纯的化合物，以便找出 / 确定活性化合物。为了确认化合物的身份，记录另外的光谱数据例如 LC/MS 和 NMR。

[0180] 通过使用 Sephadex LH 20 尺寸排阻色谱法进一步细分级活性级分 4 以便给出 7 个子级分。通过使用 HPLC C-18 柱 (Phenomenex，Luna 10u C18(2)100A，250×30)，以 8mL/min 流速的水：乙腈梯度溶剂系统 (0-10min ；50-60 % 含水的 CH_3CN，10-20min ；60 % -75 % 含水的 CH_3CN，20-45min ；75 % -100 % 含水的 CH_3CN，45-55min ；100 % CH_3CN，55-70min ；100 % -50 % 含水的 CH_3CN) 和 210nm 的 UV 检测，执行 Pilferolide A 和 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的纯化，活性峰编号 21，保留时间 45.59min，和 23，保留时间 48.53min。

[0181] 在 LCQ DECA XP^{plus} 质谱仪 (Thermo Electron Corp.，San Jose，CA) 上以全扫描模式 (m/z 100-1500Da) 使用正电离模式和负电离模式两者，在 Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus 电喷雾 (ESI) 仪器上执行活性峰的质谱法分析。热高效液相色谱法 (HPLC) 仪器配备有 Finnigan Surveyor PDA 加上检测器、自动取样器加上 MS 泵和 4.6mm×100mm Luna C185μm 柱 (Phenomenex)。溶剂系统由水 (溶剂 A) 和乙腈 (溶剂 B) 组成。流动相以 10 % 溶剂 B 开始，且在 20min 内线性增加到 100 % 溶剂 B，且然后保持 4min，且最后在 3min 内返回到 10 % 溶剂 B 并保持 3min。流速是 0.5mL/min。注射体积是 10μL，且在自动取样器中将样品保持在室温。由利用 LC 和反相色谱法的 LC-MS 来分析该化合物。在以下条件下执行本化合物的质谱法分析：对于护套和辅助 / 吹扫气体流速，氮气流速分别被固定在 30arb 和 15arb。以设置在 5000V 的喷雾电压和设置在 35.0V 的毛细管电压执行电喷雾电离。毛细管温度被设置在 400℃。在 Xcalibur 软件上分析数据。在负电离模式中，活性化合物 Piliferolide A 具有 295.65 的分子质量。在负电离模式中，另一种活性化合物的 LC-MS 色谱图表明 297.74 的分子质量。

[0182] 为了进行结构说明，使用 500MHz NMR 仪器进一步分析具有分子量 296 的纯化化合物 Piliferolide A ；参照设置在内标四甲基硅烷 (TMS，0.00ppm) 上。化合物具有在以下处的 ^1H NMR δ 值：5.62、5.42、4.55、3.97、2.58、2.35、2.04、1.88、1.73、1.64、1.54、1.39、0.92，且具有以下 ^{13}C NMR 值：δ 179.1、133.3、131.3、81.9、72.6、37.3、35.4、32.1、31.3、29.5、29.4、29.0、28.6、27.8、25.4、25.3、22.5、13.3。详细的 1D 和 2D NMR 分析证实化合物的结构为 Piliferolide A，一种已知的化合物。

[0183] 具有分子量 298 的第二纯化化合物使用 500MHz NMR 仪器来进一步分析，并具有以下 ^1H NMR δ 值：5.61、5.41、3.96、2.27、2.04、1.69、1.51、1.42、1.32、0.92，以及以下 ^{13}C NMR 值：δ 176.6、133.2、132.6、73.5、37.5、33.9、32.4、31.6、29.8、29.7、29.6、29.4、29.3、29.1、25.7、24.9、22.8、14.3。详细的 1D 和 2D NMR 分析证实化合物的结构未针对微生物源报道过；分子式 $C_{18}H_{34}O_3$。化合物 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的结构在以下示出：

[0184]

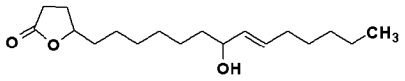


。

[0185] 使用上述程序测试从假单胞菌属细胞培养物离析的化合物的效力。在以下表 4 中示出结果。

[0186] 表 4. Piliferolide A 和 11- 羟基 -12- 烯 - 十八烷酸的软体动物杀灭效果

[0187]

结构	浓 度 [μg/ml]	%死亡率 24 小时	%死亡率 48 小时	%死亡率 72 小时	%死亡率 96 小时
 Piliferolide A	16	53.3±15.3	53.3±15.3	70±10	80±10
 11-羟基-12-烯-十八烷酸	16	0	20±20	33.3±20.8	40±26.5

[0188] 实施例 5 :高岭土效果

[0189] 在 11.8℃下进行的生物盒研究中测试高岭土粘土对基于荧光假单胞菌细菌的微生物生物杀虫剂的功效的影响。在第一天实验,经由蠕动泵从浓缩储备溶液将高岭土粘土应用到生物盒,使得生物盒中的最终浊度是约 20NTU(归一化浊度单位)。将五十个斑驴贻贝放置在用尼龙网在两个端部处封闭的 1 英尺长的压克力管 (acrylic tube) 中,且将管放置在生物盒的底部以供处理。粘土应用的持续时间是 6 小时,此后将压克力管中的贻贝暴露于生物盒中新鲜的流动水 18 小时。下一天,清理掉生物盒底部的额外的粘土,且经由蠕动泵将含水悬浮液中的生物杀虫剂施用至 200ppm 的最终浓度。在 6 小时生物杀虫剂处理之后,以 1 加仑每分钟的速率用新鲜的流动水在生物盒中孵育管中的贻贝。观察贻贝并每周计数,持续 5 周,以便确定%死亡率。对照处理包括未经处理的对照,仅具有高岭土粘土 (不具有生物杀虫剂) 的处理和仅具有生物杀虫剂 (不具有粘土预处理) 的处理。所有的处理平行进行三份。

[0190] 表 5 和图 4 中呈现的结果表明,与不具有粘土预处理的贻贝相比,在生物杀虫剂处理之前暴露于高岭土粘土 18 小时的贻贝的死亡率显著增加。该现象可以通过在低生物学活性期间在冷 (11.8℃) 水中收获和处理的贻贝的增加的虹吸作用活性来解释。该增加的虹吸作用导致对杀虫剂产品的较大的摄取,而这又导致增加的贻贝死亡率。

[0191] 表 5. 以在每一个时间点 (天) 测量的%死亡率表示的生物杀虫剂的功效

[0192]

	%死亡率					
	1	**9**	**16**	**21**	**27**	**34**
未经处理的对照	0	0	0	0	0	0
高岭土 20 NTU	0	0	0	0	0	1
高岭土 20 NTU+200 ppm	0	35	64	71	77	83
200 ppm	0	22	46	55	58	63

[0193] 实施例 6 :γ - 十二内酯和 N- 癸烯酰基) 吡咯烷对蜗牛的效果

[0194] 蜗牛实验 :首先将适量的测试化合物溶解在丙酮 (2mL) 中。将溶液加入到 2.5 克

玉米淀粉中并充分混合。将所得到的混合物转移到培养皿（Φ25mm）。然后将培养皿放置在排气罩中以天然干燥。在干燥之后，将水（2mL）加入到培养皿以制成糊状物。

[0195] 从庭院收集褐色花园蜗牛（Cantareus aspersus）并将其在实验室用甘蓝或红色胡萝卜饲养至少1天。对每一处理选择具有相似尺寸的五个个体并将其转移到1L烧杯。为了使得蜗牛存活，通过使用手动喷雾器将一些水喷在它们上和烧杯中。在喷水之后，将具有包含化学品的玉米淀粉的培养皿放置到烧杯中，并用铝箔覆盖烧杯的顶部。在24小时记录进食行为、玉米淀粉的消耗量和死亡率。

[0196] 数据表明（在表6中陈述），以100mg/克玉米淀粉的γ-十二内酯（SAR-014）将有力地驱散褐色花园蜗牛。然而，以100mg/克玉米淀粉的N-癸烯酰基）吡咯烷（SAR-030）在褐色花园蜗牛进食之后将杀死所有的褐色花园蜗牛。

[0197] 表6. 对褐色花园蜗牛的化学效果

[0198]

处理	化学品	剂量(mg/克玉米淀粉)	进食行为	玉米淀粉的消耗量	24小时死亡率
对照		0	所有的个体都进食玉米淀粉	在2小时内吃完所有的玉米淀粉	0%
1	SAR-014	100	所有的个体快速从淀粉逃离	在24小时之后0%	0%
2	SAR-030	100	五个个体中的四个进食少量淀粉并离开。	在24小时之后消耗了小于5%的玉米淀粉	进食了玉米淀粉的所有个体均死亡

[0199] 尽管已经参考具体的实施方式描述了本发明，但具体的实施方式的细节不应被理解成限制，因为明显的是，可以使用各种等效物、变化和修改，且这仍然是在本发明的范围内。

[0200] 贯穿本说明书引用了各种参考文献，参考文献中的每一个通过引用以其整体并入本文。

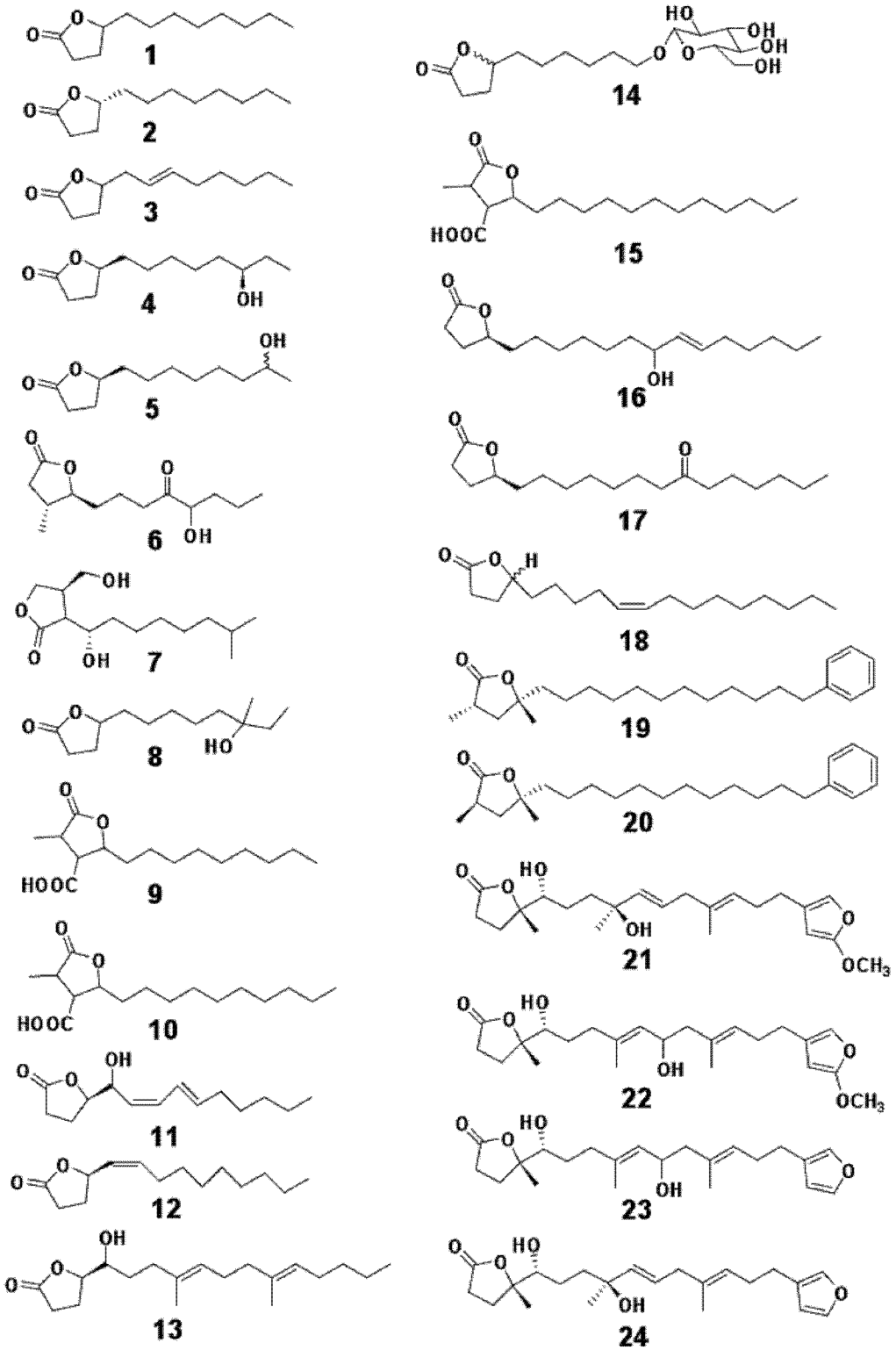

1
2
3
4
OH
5
OH
6
O
OH
7
OH
OH
8
HO
9
HOOC
10
HOOC
11
OH
12
13
OH
14
HO
OH
OH
O
OH
15
HOOC
16
OH
17
O
18
H
19
20
21
HO
OH
OCH3
22
HO
OH
OCH3
23
HO
OH
24
HO
OH

图 1a

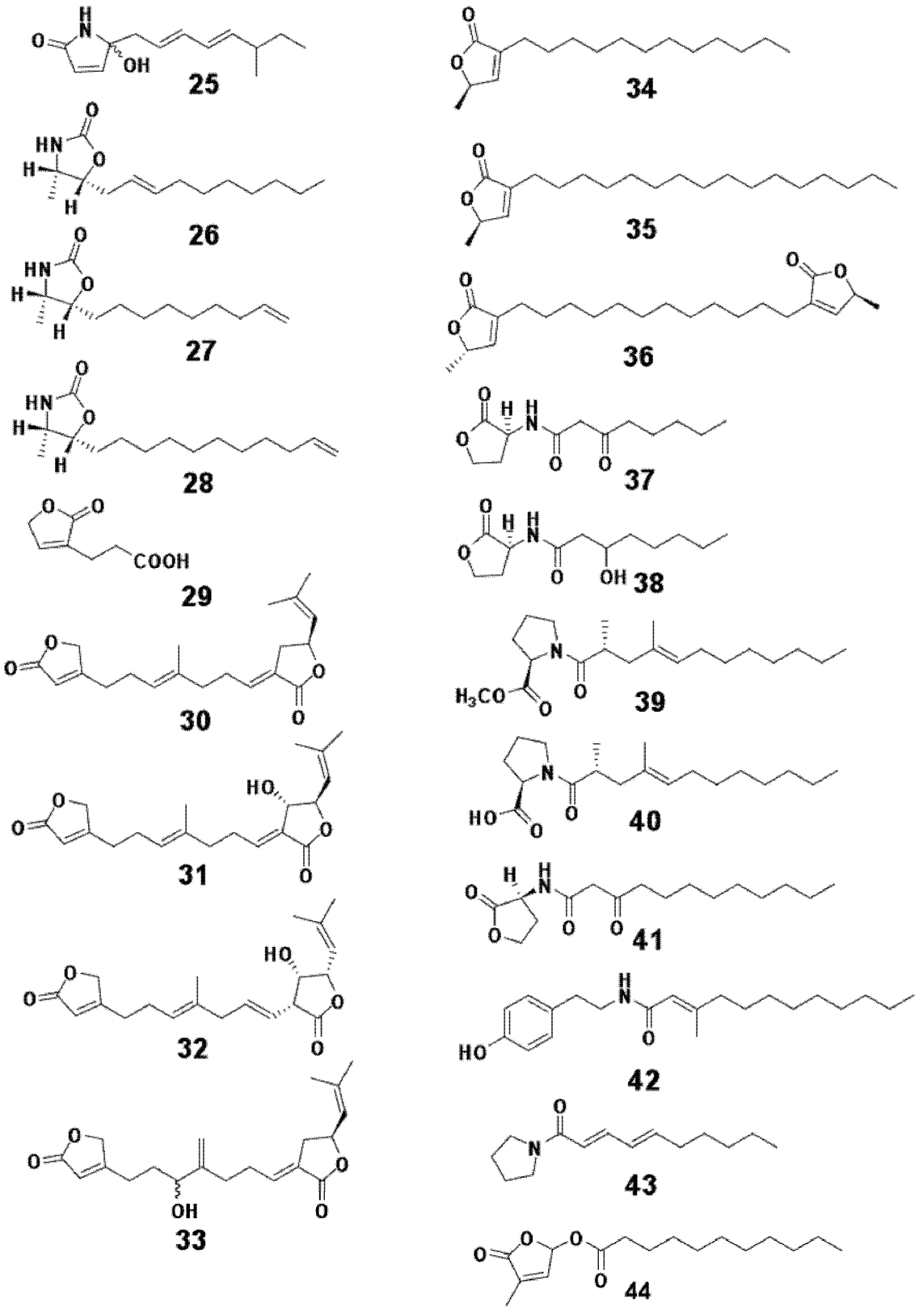


图 1b

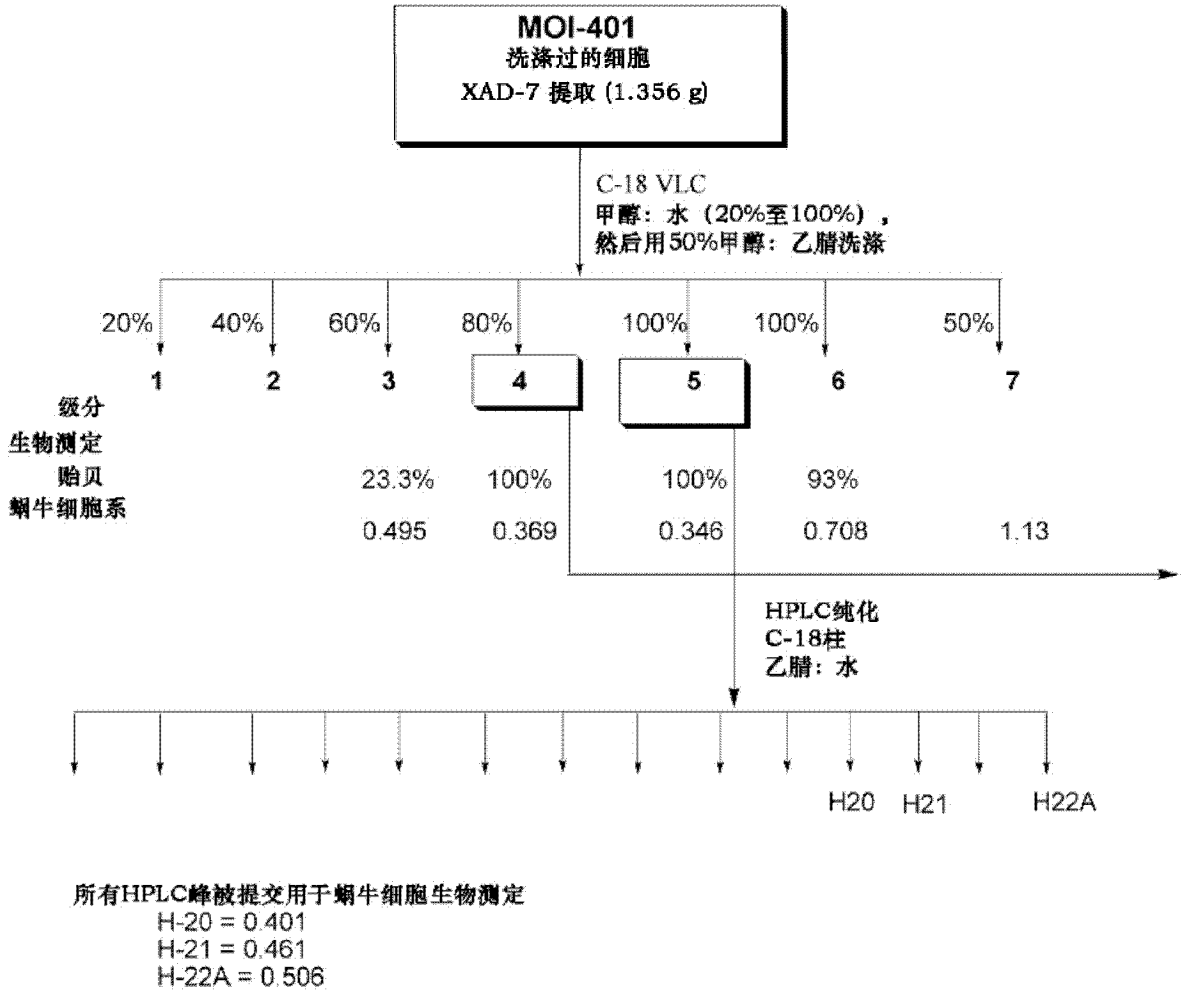

MOI-401
洗涤过的细胞
XAD-7 提取 (1.356 g)
C-18 VLC
甲醇：水（20%至100%），
然后用50%甲醇：乙腈洗涤
20%
40%
60%
80%
100%
100%
50%
1
2
3
4
5
6
7
级分
生物测定
贻贝
蜗牛细胞系
23.3%
100%
100%
93%
0.495
0.369
0.346
0.708
1.13
HPLC纯化
C-18柱
乙腈：水
H20
H21
H22A
所有HPLC峰被提交用于蜗牛细胞生物测定
H-20 = 0.401
H-21 = 0.461
H-22A = 0.506

图 2

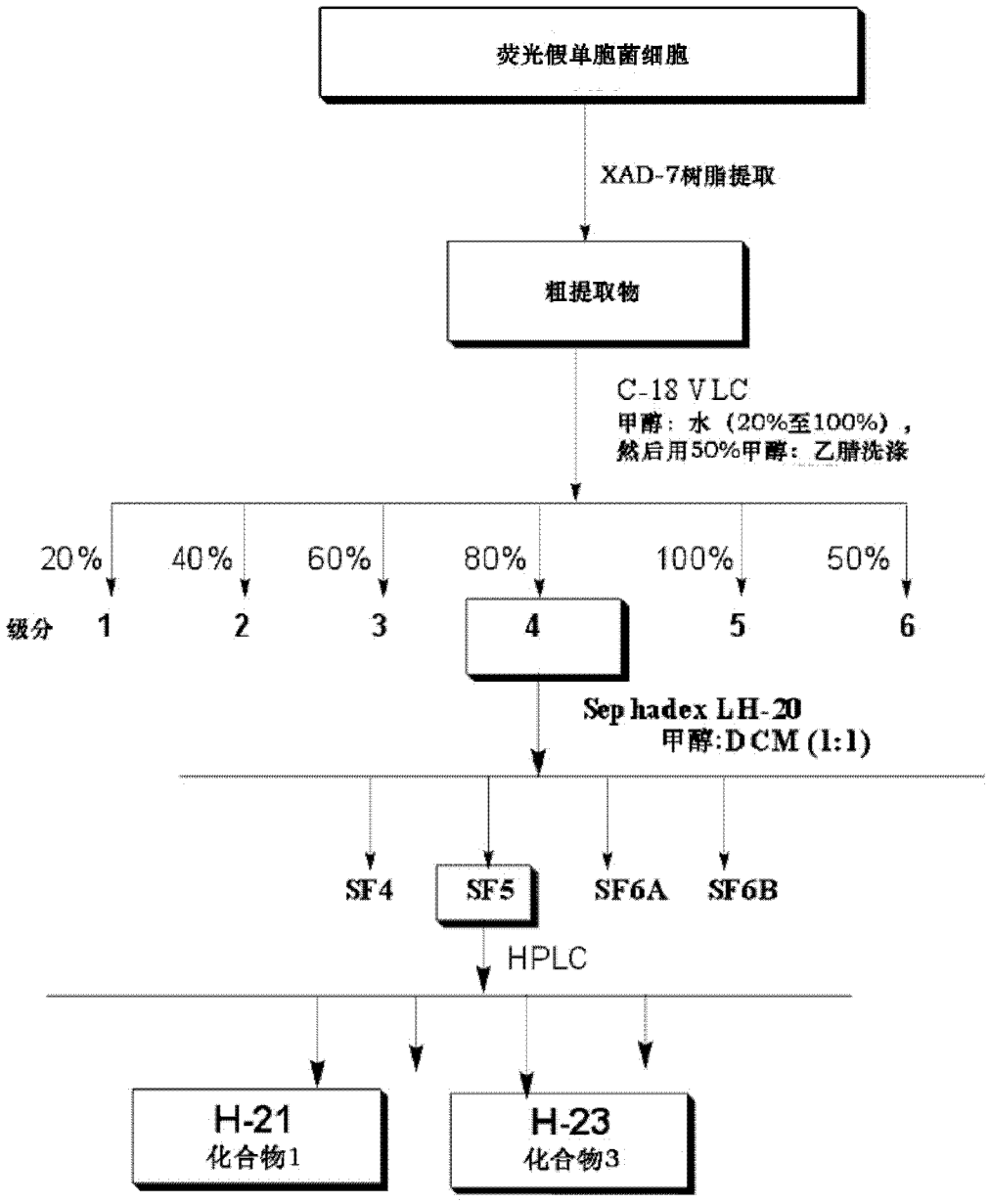

荧光假单胞菌细胞
XAD-7树脂提取
粗提取物
C-18 VLC
甲醇：水（20%至100%），
然后用50%甲醇：乙腈洗涤
20%
40%
60%
80%
100%
50%
级分
1
2
3
4
5
6
Sephadex LH-20
甲醇:DCM (1:1)
SF4
SF5
SF6A
SF6B
HPLC
H-21
化合物1
H-23
化合物3

图 3

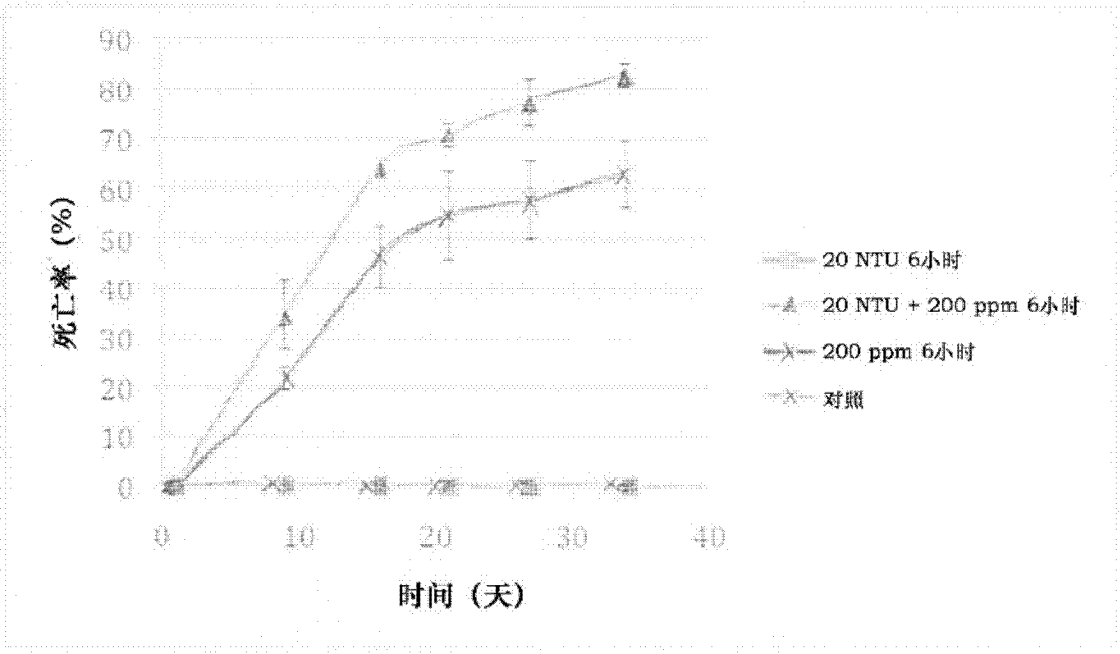

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
死亡率（%）
0
10
20
30
40
时间（天）
20 NTU 6小时
20 NTU + 200 ppm 6小时
200 ppm 6小时
对照

图 4