



(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 200944225 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：098108269

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl. :

*A61K38/12 (2006.01)*

*A61K36/06 (2006.01)*

*C12N1/14 (2006.01)*

*A61P31/10 (2006.01)*

(30)優先權：2008/03/14

日本

2008-065202

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

日本

(72)發明人：中村郁子 NAKAMURA, IKUKO (JP)；吉川浩司 YOSHIKAWA, KOJI (JP)；大隅惠介 OHSUMI, KEISUKE (JP)；金崎龍一 KANASAKI, RYUICHI (JP)；高瀨茂弘 TAKASE, SHIGEHIRO (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：6 共 38 頁

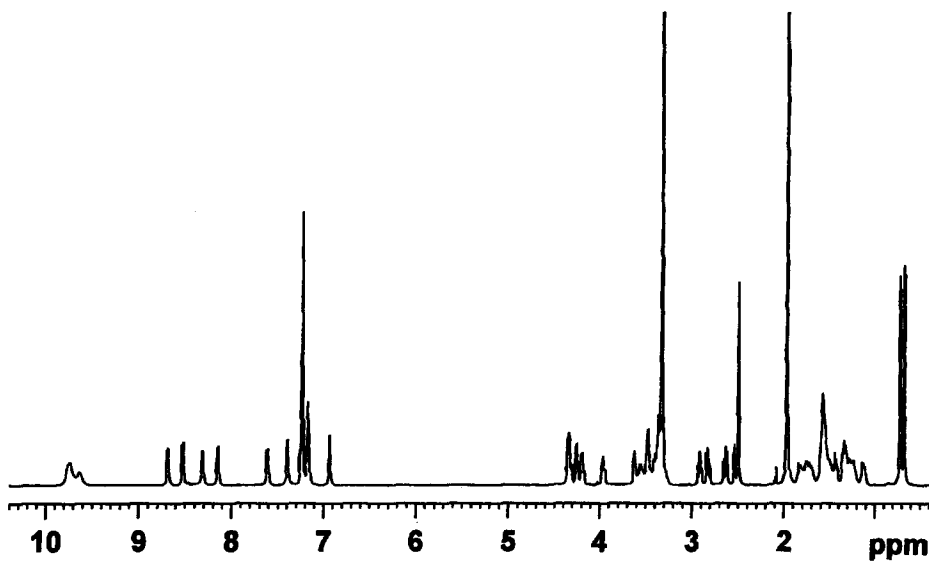
(54)名稱

環狀化合物及其鹽

CYCLIC COMPOUND AND SALT THEREOF

(57)摘要

本發明係提供一種抗真菌劑，特別係適用為深層真菌疾病治療劑之化合物。採取真菌桃色枝頂孢 (Acremonium persicinum)，自該培養液分離出環狀化合物。該環狀化合物或其鹽具有優良之抗真菌活性，確認於醫藥特別係適用做為抗真菌劑，遂完成本發明。本發明之環狀化合物或其鹽可使用為真菌疾病特別係深層真菌疾病之預防或治療劑。





(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 200944225 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：098108269

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl. :

*A61K38/12 (2006.01)*

*A61K36/06 (2006.01)*

*C12N1/14 (2006.01)*

*A61P31/10 (2006.01)*

(30)優先權：2008/03/14

日本

2008-065202

(71)申請人：安斯泰來製藥股份有限公司 (日本) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

日本

(72)發明人：中村郁子 NAKAMURA, IKUKO (JP)；吉川浩司 YOSHIKAWA, KOJI (JP)；大隅惠介 OHSUMI, KEISUKE (JP)；金崎龍一 KANASAKI, RYUICHI (JP)；高瀨茂弘 TAKASE, SHIGEHIRO (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：6 共 38 頁

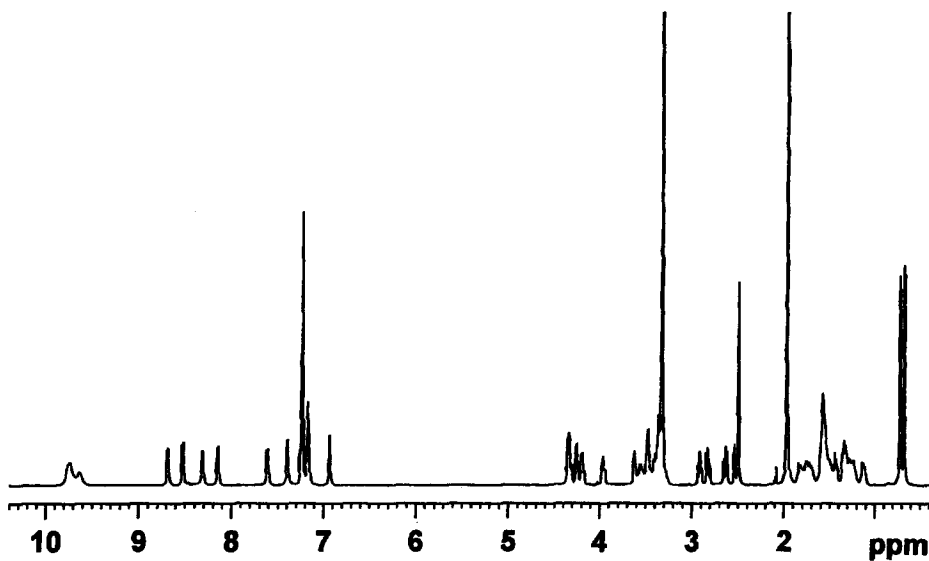
(54)名稱

環狀化合物及其鹽

CYCLIC COMPOUND AND SALT THEREOF

(57)摘要

本發明係提供一種抗真菌劑，特別係適用為深層真菌疾病治療劑之化合物。採取真菌桃色枝頂孢 (*Acremonium persicinum*)，自該培養液分離出環狀化合物。該環狀化合物或其鹽具有優良之抗真菌活性，確認於醫藥特別係適用做為抗真菌劑，遂完成本發明。本發明之環狀化合物或其鹽可使用為真菌疾病特別係深層真菌疾病之預防或治療劑。



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係一種醫藥組成物，其係關於適用為治療真菌病症，特別係深層真菌病症之醫藥組成物之有效成分的環狀化合物。

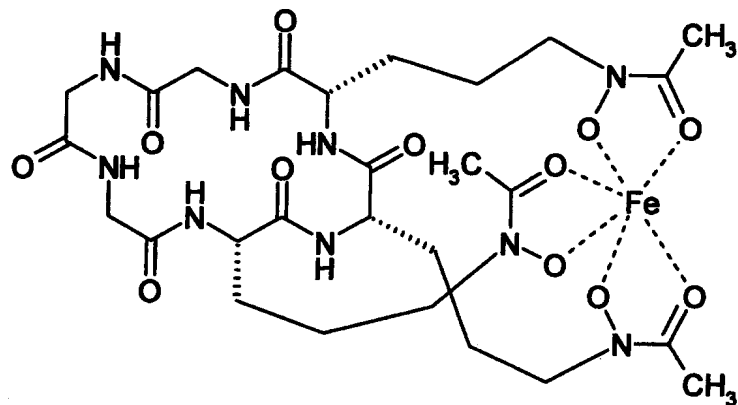
### 【先前技術】

深層真菌病症一般認為係長時間對患者投予抗生素時，雖然去除了標的的病原菌，卻因可抵抗抗生素之真菌增生而引發的病症（於此，存活之真菌異常地增殖的現象，稱做細菌代換現象（microbial substitution）），亦即高齡患者、術後患者、或正進行投予抗癌劑及免疫抑制劑之患者，由於活體防禦功能被抑制變為容易感染真菌，因該真菌增殖而引發病症。

深層真菌病症的治療用藥有1)作用機轉為阻礙真菌合成DNA之核酸鹼基系藥劑之氟胞嘧啶，及2)作用機轉為阻礙真菌合成細胞膜之多巨環內酯（Polyene macrolide）系藥劑之雙性黴素B、咪唑系藥劑之咪可納唑、以及三唑系藥劑之氟康唑（Fluconazole）等抗真菌劑。

然而，雖已知如下所述之由3個鳥胺酸所構成之環狀六胜肽之鐵色素（ferrichrome）（非專利文件1），但於該文獻中並無鐵色素具有抗真菌活性之記載。

[化 1]



非專利文件 1 : Journal of American Chemical Society,  
102期, pp.4224-4231, 1980年

### 【發明內容】

[發明欲解決之課題]

本發明係提供一種醫藥組成物，其係適用為治療真菌病症，特別係深層真菌病症之醫藥組成物之有效成分的化合物。

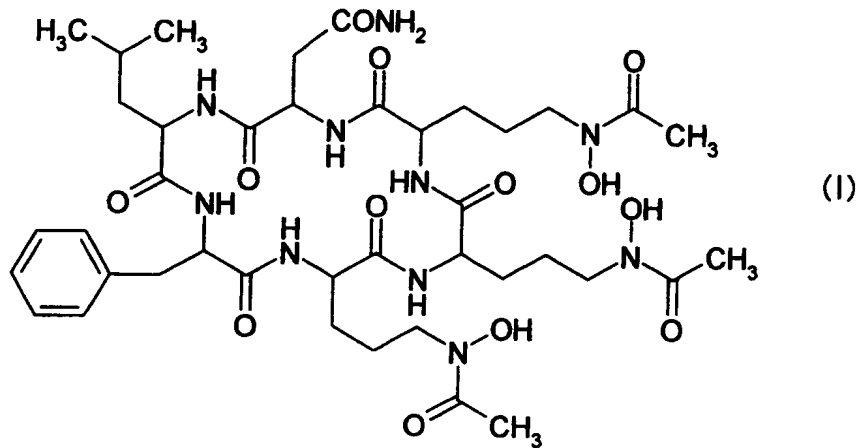
[解決課題之手段]

本發明之發明者們，針對自然存在的微生物所產生之具抗真菌作用之化合物進行專心檢討後，發現稱為真菌桃色枝頂孢 MF - 347833 株之菌株，可產生具優異抗真菌作用之化合物。進而詳細檢討該菌株之培養液，成功地自該菌株之培養液分離出具優異抗真菌作用之環狀化合物，遂完成本發明。

亦即，本發明係關於式 (I) 之化合物或其鹽，以及

含有式 (I) 之化合物或其鹽、及賦形劑之醫藥組成物。

[化 2]



另外，本發明係關於含有式 (I) 之化合物或其鹽之治療真菌病症之醫藥組成物，即為含有式 (I) 之化合物或其鹽之真菌病症治療劑。

本發明係關於為製造治療真菌病症之醫藥組成物之式 (I) 之化合物或其鹽之使用，以及包含對患者投予式 (I) 之化合物或其鹽之有效量之治療真菌病症之方法。

[發明的效果]

式 (I) 之化合物或其鹽可使用為真菌病症，特別係深層真菌病症等之預防及／或治療劑。

[實施發明之最佳方式]

以下詳細說明本發明。

本發明之化合物有時也會形成與鹼基之鹽。相關的鹽

具體而言可舉出與鈉、鉀、鎂鈣等無機鹼基、甲基胺、乙基胺、乙醇胺、離胺酸、鳥胺酸等有機鹼基之鹽。另外，鹽亦包含錯鹽及螯合化合物。形成相關鹽的金屬可舉出2價或3價之金屬，例如可舉出鐵、鋁、鎳等。

以下，於本說明書中有時會將

式(I)之化合物之游離體記載為化合物A、

式(I)之化合物之鋁鹽記載為化合物B、

式(I)之化合物之鐵鹽記載為化合物C、

式(I)之化合物之鎳鹽記載為化合物D。

式(I)之化合物中能存在幾何異構物。本說明書中，式(I)之化合物有時僅以異構物的一個型態被記載，但本發明亦包含其以外之異構物，及包含異構物經被分離者，或該等之混合物。

另外式(I)之化合物中也有具有不對稱碳原子之情況，以此為基礎能存在光學異構物。本發明係包含式(I)之化合物之光學異構物經被分離者，或該等之混合物。

本發明進而包含以式(I)所示之化合物之製藥學上被容許之前驅藥物。製藥學上被容許之前驅藥物係指於藉由加溶媒分解或於生理學之條件下，具有能夠被變換為烷基等基之化合物。

本發明亦進而包含式(I)之化合物或其鹽之各種水和物及溶媒和物，以及結晶多形之物質。另外，本發明亦包含各種被放射性或非放射性同位素標誌後之化合物。

產生式(I)之化合物或其鹽之微生物的菌學性質如

下所示。

(1) 生產菌之由來

真菌頂孢黴屬 MF - 347833 株，係採集自馬來西亞之新山州 (Johor Bahru) 的 Endau Rompin 國家公園內之腐落葉植物所分離的。本菌株目前寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心，寄存號碼為 FERM BP - 10916 (寄存日為 2007 年 10 月 10 日)，並以寄存號碼 BCRC 930119 寄存於食品工業發展研究所。

(2) 生產菌之型態學性質

型態上之特徵係觀察於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基上之型態而判定。於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (Difco 公司製之 2010) 上生長旺盛，於 25℃ 下 2 週後擴展至直徑為 39-41mm，亦發現形成分生孢子。菌落表面為羊毛狀 (floccose)，菌落周圍則為波浪狀 (undulate)。雖自中央部位向周圍部位產生數條放射狀的溝，但難以自表面確認。菌落為白色 (white, 1A1)，但中央部位為稍淺之黃白色 (yellowish white, 4A2)。於菌落背面可確認自中央部位向周圍部位產生呈現放射狀的溝。整體顏色為淺米色 (ivory, 4A3)，但菌落之中央部位為淺棕色 (mustard brown, 5E6)。於 30℃ 下 2 週後菌落之直徑為約 24mm，未發現於 5℃ 與 37℃ 下有生長情形。

玉米萃取液洋菜培養基 (Difco 公司製之 0386) 上生

長旺盛，於 25℃ 下 2 週後擴展至直徑為 39-40mm。菌落表面為氈狀 (felty)。菌落周圍則為波浪狀 (undulate) 且菌落中未產生溝。菌落為白色 (white, 1A1)。菌落背面亦為白色 (white, 1A1)。於 30℃ 下進行培養 2 週後菌落之直徑為約 14mm。菌落表面未產生溝。未發現於 5℃ 與 37℃ 下有生長情形。

營養菌絲粗細為 1.8-2.7  $\mu\text{m}$ ，未觀察到厚膜孢子，分生孢子柄無分枝，無色且單生於營養菌絲或細長之孢子束。分生孢子柄表面存在許多小的疣狀突起，分生孢子柄的根部有隔膜。分生孢子形成樣式為瓶梗型，自分生孢子柄根部至瓶梗前端長度為 33-40  $\mu\text{m}$ 。分生孢子為無色的橢圓形，大小為 3.7-4.5 $\times$ 2.8-3.2  $\mu\text{m}$  (平均為 4 $\times$ 3  $\mu\text{m}$ )。稍具黏性，瓶梗前端形成孢子塊。以光學顯微鏡 (400 倍) 可見孢子的表面呈現平滑，但以電子顯微鏡 (9000 倍) 觀察則可確認呈劇烈凹凸形狀。

該等型態上之特徵暗示本菌屬於頂孢黴屬之可能性。根據 *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)* / Walter Gams (1971) 比較檢討後，結果與 Gliomastix 節之桃色枝頂孢型態上之特徵十分一致。另外，檢索本菌之 28SrDNA 與 18SrDNA 之相似性後，由於其包含於 Gliomastix 節之桃色枝頂孢之群 (clade)，形態上及基因上均無矛盾。因此鑑定本菌為桃色枝頂孢，並稱其為桃色枝頂孢 MF - 347833 株。

### (3) 培養特性

培養特性係根據市售上培養基，以及以記載於文獻之組成所調製之培養基而進行判定。分別購買 Difco 公司製之 2010 馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基、Difco 公司製之 0109 沙氏葡萄糖洋菜培養基、Difco 公司製之 0739 Emerson YpSs 洋菜培養基、Difco 公司製之 0386 玉米萃取液洋菜培養基、Difco 公司製之 0552 燕麥洋菜培養基。麥芽萃取洋菜培養基、Czapek 氏液狀洋菜培養基、MY20 洋菜培養基之組成係遵循 JCM 目錄 ( Nakase, T. 6th ed., pp.617, Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research, Saitama, 1995 ) 。

觀察真菌 MF - 347833 株自接種於各洋菜培養基開始於 25 °C 下進行培養 14 天之情形。色調之記載係參照 Methuen Handbook of Colour (Kornerup, A. and J. H. Wanscher, 3rd ed. pp. 252, Methuen, London, 1987)。有關生長溫度係於馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 ( Difco 公司製之 2010 ) 上進行判定。

[表1]

桃色枝頂孢MF - 347833株之培養特性

培養基	培養特性
麥芽萃取洋菜	生長：旺盛。直徑30-31mm 表面：圓形且周圍邊緣成波浪狀、羊毛狀、白色(1A1) 背面：淺黃色~淺橘色(5A3)
馬鈴薯葡萄糖洋菜 (Difco 2010)	生長：旺盛。直徑39-41mm 表面：圓形且周圍邊緣成波浪狀、羊毛狀、 白色(1A1)~黃白色(4A2) 背面：形成溝。淺米色(4A3)。 中央部位為淺棕色(5E6)
Czapek氏液狀洋菜	生長：旺盛。直徑57-59mm 表面：圓形且周圍邊緣為正圓。氈狀、 中央部位稍為紅灰色(7B3)但整體為白色(1A1) 背面：淺橘色(5A2)
沙氏葡萄糖洋菜 (Difco 0109)	生長：旺盛。直徑32-33mm 表面：圓形且周圍邊緣成波浪狀。形成線條。 羊毛狀、白色(1A1) 背面：形成溝。黃白色(4A2)
Emerson YpSs洋菜 (Difco 0739)	生長：旺盛。直徑36-38mm 表面：圓形且周圍邊緣成波浪狀。氈狀、 整體為白色(1A1) 背面：淺橘色(5A2)
玉米萃取液洋菜 (Difco 0386)	生長：旺盛。直徑39-40mm 表面：圓形且周圍邊緣成波浪狀。氈狀、 整體為白色(1A1) 背面：白色(1A1)
MY20洋菜	生長：旺盛。直徑34-35mm 表面：圓形且周圍邊緣為正圓。羊毛狀、 整體為白色(1A1) 背面：淺黃色(4A4)
燕麥洋菜 (Difco 0552)	生長：旺盛。直徑50-51mm 表面：圓形且周圍邊緣為正圓。羊毛狀、 中央部位為淺黃色(4A2)但整體為白色(1A1) 背面：淺黃色(4A4)

另外，本菌株有時會有人工的或天然的變異，於本發明中所使用之真菌桃色枝頂孢 MF - 347833 株，除自自然界所分離出之微生物之外，亦包含使其以紫外線、放射線、化學藥劑等進行人工變異者以及該等之天然變異株。

#### (生產方法)

本發明之化合物係培養具有生產本發明化合物之能力之頂孢黴屬微生物而得。培養係以一般微生物之培養方法為準而進行。

培養基以選用含有真菌桃色枝頂孢 MF - 347833 株可利用營養源之培養基為佳，可使用合成培養基、半合成培養基或天然培養基。培養基之組成做為碳源者例如為 L-樹膠醛醣、D-木醣、D-葡萄糖、D-果糖、蔗糖、肌醇、L-鼠李糖、棉實糖、D-甘露糖醇、甘露糖、密二糖、乳糖、D-半乳糖、麥芽糖、海藻糖、水楊甘、葉黃素、幾丁質、澱粉、葡萄糖、葡聚糖、甘油、植物油等，氮源為牛肉萃取物、消化蛋白質、筋粉、棉實粕、大豆粉、花生粉、魚粉、玉米漿、乾燥酵母、酵母萃取液、氯化銨、硫酸銨、硝酸銨、尿酸之外，使用有機、無機之氮來源。另外金屬鹽可為鈉、鉀、鎂、鈣、錫、鈷等之硫酸鹽、硝酸鹽、碳酸鹽、磷酸鹽等可因應需要而添加。可進而因應需要添加蛋胺酸、半胱胺酸、胱胺酸、硫代硫酸鹽、油酸甲酯、豬油、二氧化矽油、界面活性劑等促進生成物質或消泡劑。

培養條件一般於好氧的條件下進行培養較有利，培養

溫度範圍於  $8.9 \sim 31.2^{\circ}\text{C}$ ，以於  $26.0 \sim 27.6^{\circ}\text{C}$  附近進行為佳。培養時間可因應培養基之組成、溫度條件適宜地加以設定，但一般  $1 \sim 30$  天左右，以  $2 \sim 7$  天為佳。

自培養物純化本發明化合物並進行分離之方法，可使用一般自微生物之培養物純化具生理活性物質並進行分離之方法。亦即，自培養物以適當的有機溶媒進行萃取，再對該萃取物進行純化而分離出有效物質。亦即以抗真菌活性為指標，利用對於適當的溶劑之溶解性以及溶解度之差別，藉由一般於製造生理活性物質所使用之方法而進行分離、純化。該等方法可因應需要單獨使用，或以任意順序進行組合、反覆進行。其他的純化方法可使用將原本之培養物，或經離心分離、進行過濾後去除菌體之後，利用對於適當的溶劑之溶解性以及溶解度之差別、自溶液析出速度之差別、對各種吸附劑吸附親和性之差別、於 2 種液相間分配之差別等方法。具體而言可舉出例如使培養液與適當的載體接觸後使該化合物吸附，接著再藉由以適當的溶媒進行溶出而純化該化合物之方法。可因應需要將該等方法單獨使用，或以任意順序進行組合、反覆進行。

本發明之化合物，式 (I) 之化合物之鹽，係可於式 (I) 之化合物中，將無機鹽（例如  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  等）使其於不會影響反應之溶媒中，由室溫至加溫條件下進行反應而製造。溶媒無特別限定，可舉出例如甲醇等含醇類之水溶液。反應溫度以  $10^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$  為佳。

本發明之環狀化合物（I）或其鹽，可藉由於營養培養基培養該物質之生產菌，再由蓄積該化合物之培養物中依尋常用方法而得。於該化合物之製造方法中所使用之微生物係屬於頂孢黴屬，可使用任一種具有產生該化合物之能力之微生物。

含有1種或2種以上之式（I）之化合物或其鹽為有效成分之醫藥組成物，可使用於該領域中常使用之賦形劑，亦即藥劑用賦形劑及藥劑用載體等，根據常用方法而進行調製。

投予可為錠劑、丸劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑、液劑等經口投予，或為關節內、靜脈內、肌肉內等之注射劑、坐劑、點眼劑、眼軟膏、經皮用液劑、軟膏劑、經皮用貼付劑、經黏膜液劑、經黏膜貼付劑、吸入劑等非經口投予之任一型態。

為進行經口投予之固體組成物可使用錠劑、散劑、顆粒劑等。於該等固體組成物中，可將1種或2種以上之有效成分，與至少一種的低活性賦形劑例如乳糖、甘露糖醇、葡萄糖、羥基丙基纖維素、微結晶纖維素、澱粉、聚乙烯吡咯烷酮、及／或鎂鋁矽酸鹽等進行混合。組成物可根據常用方法亦可含有低活性添加劑例如硬脂酸鎂之滑澤劑，及羧甲基澱粉鈉等崩解劑、安定劑、溶解輔助劑。錠劑或丸劑可根據需要以糖衣或胃溶性或腸溶性物質之薄膜進行被膜。

為進行經口投予之液體組成物含有於藥劑學上被容許

之乳濁劑、溶液劑、懸濁劑、糖漿劑或醃劑等，及含有一般所使用之低活性稀釋劑例如純化水或乙醇。該液體組成物除低活性稀釋劑之外亦可含有如可溶化劑、濕潤劑、懸濁劑之輔助劑、甜味劑、風味劑、芳香劑、防腐劑。

為進行非經口投予之注射劑含有無菌之水性或非水性之溶液劑、懸濁劑或乳濁劑。水性溶劑可舉出包含例如注射用蒸餾水或生理食鹽水溶液。非水性之溶劑可舉出例如丙二醇、聚乙二醇或如橄欖油等之植物油、如乙醇之醇類、或聚山梨醇酯 80（藥典名）等。而該等組成物可進而含有等張化劑、防腐劑、濕潤劑、乳化劑、分散劑、安定化劑、或溶解輔助劑。再將該等物質通過可濾細菌過濾器進行過濾、混合殺菌劑或輻射照射而進行無菌化。另外，可將該等物質製造為無菌之固體組成物，於使用前以無菌水或無菌之注射用溶媒進行溶解或懸濁後再使用。

外用劑包含軟膏劑、硬膏劑、乳霜劑、凝膠劑、泡沫劑、噴霧劑、乳液劑、點眼劑、眼軟膏等。含有一般所使用之軟膏基劑、乳液基劑、水性或非水性之液劑、懸濁劑、乳劑等。軟膏或乳液基劑可舉出例如聚乙二醇、丙二醇、白色凡士林、蜜蠟、聚氧乙烯氫化蓖麻油、單硬脂酸乙酯、硬脂酸醇、鯨蠟醇、聚桂醇、山梨醇倍半油酸酯等。

吸入劑及經鼻劑等經黏膜劑可使用固體、液體或半固體狀者，可根據以往周知之方法進行製造。例如適當地於周知之賦形劑中進而添加 pH 調整劑、防腐劑、界面活性劑、滑澤劑、安定劑及增黏劑等亦可。投予可使用為吸入或

吹送適當的裝置。例如可使用計量投予吸入裝置等周知之裝置及噴霧器，將化合物單獨地或經處方之混合物的粉末，或於醫藥上被容許之載體組合後，成為溶液或懸濁液而進行投予。乾燥粉末吸入器等，可用於單次或數次投予用者，可利用乾燥粉末或含乾燥粉末之膠囊。或者可使用適當的推動劑，例如氟氯烴類、氫氟烷烴或二氧化碳等適合氣體，而為加壓氣霧噴劑等型態。

一般經口投予時，1天的投予量約相當於每公斤體重為0.01~100mg/kg，以0.1~10mg/kg較為適當，將其以1次，或分做2次~4次進行投予。進行靜脈內投予時，1天的投予量約相當於每公斤體重為0.01~100mg/kg，1天1次~分做數次進行投予。投予量可考慮症狀、年齡、性別等因應各個狀況而適當地加以決定。

式(I)之化合物或其鹽，可與被認為前述之式(I)之化合物或其鹽顯示有效性之疾病之各種治療劑或預防劑進行併用。該併用可為投時投予，或各別地連續地進行投予，或可於所期望的時間間隔進行投予。投時進行投予之製劑，可為混合劑或可為經各別製劑化者。

### 【實施方式】

#### [實施例]

以下以實施例為基礎，將式(I)之化合物或其鹽之製造方法更詳細地說明。且本發明並未限定於下述實施例所記載之化合物。另外，式(I)之化合物或其鹽之製造

方法，亦非僅限定於以下所示之具體的實施例之製造法，式（I）之化合物或其鹽可組合該等製造方法，或可根據相關業者當然之方法進行製造。

另外，於實施例、製造例以及後述表中，有時會使用以下之略碼。

[表 2]

略碼	Full name
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	硫酸鋁鉀12水合物
$\text{CHCl}_3$	氯仿
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	氯化鐵(III)6水合物
$\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	硫酸鎵(III)水合物
KCl	氯化鉀
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	磷酸二氫鉀
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	硫酸鎂7水合物
$\text{NaNO}_3$	硝酸鈉
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	硫酸銨
TFA	三氟醋酸
HR ESI MS	高解析電灑式MS

### 實施例 1

（化合物 A 之培養生產）

將基礎培養基 1（參照表 3，30 mL）分注至三角燒瓶（尺寸：100 mL）中，以高壓蒸氣滅菌器進行滅菌（121°C，30 分鐘）。於該基礎培養基 1，以白金耳鈞無菌方式進行真菌 MF - 347833 株之斜面培養物（斜面培養物）之植菌

後，於 25℃ 下進行 4 天以旋轉搖盪器之震盪培養（220rpm）。其次，將生產培養基 1（參照表 4，100mL）分注至三角燒瓶（尺寸：500mL）中，以高壓蒸氣滅菌器進行滅菌（121℃，30 分鐘）。於該燒瓶以無菌方式植入基礎培養物（2 mL），於 25℃ 下進行 7 天以旋轉搖盪器之震盪培養（220rpm）。培養係於以 HPLC 進行分析同時進行（分析 HPLC1，條件參照表 5）。

[表 3]

## 基礎培養基 1

培養基成分	含有率(%)
玉米澱粉	2
甘油	1
蔗糖	1
藥劑培養基	1
筋粉	1
Tween 80	0.2

[表 4]

## 生產培養基 1

培養基成分	含有率(%)
葡萄糖	0.5
可溶性澱粉(NACALAI公司製)	1.5
酵母萃取物(和光純藥工業公司製)	0.5
KCl	0.02
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
NaNO <sub>3</sub>	0.2

[表 5]

## 分析 HPLC1 之條件

管柱	Mightysil RP-18 GP 150-4.6(5 $\mu$ m)關東化學公司製
移動相	MeCN : 水 = 28 : 72(v/v)(含0.5%NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
流速	1mL/分
檢測波長	210nm
留滯時間	約4.2分

## (化合物 A 之分離純化)

於以上述之培養方法所得之培養物 (2.6L) 中添加等量之丙酮，攪拌 1 小時後進行過濾而得培養萃取物。於該培養萃取液中加入 2 倍量之水，再使其通過 Diaion SP 850 管柱 (尺寸：400mL，三菱化學公司製)，以混合溶媒 {丙酮：水 = 30 : 70 (v/v)，1.9L} 進行溶出。

於該溶出液中加入水 (2.1L)，再使其通過 Daisogel SP-120-ODS-B 管柱 (尺寸：350mL，15 / 30  $\mu$ m，DAISO 公司製)，以混合溶媒 {MeCN : 水 = 25 : 75 (v/v)，340mL} 進行溶出。

於該溶出液中加入水 (350mL)，再使其通過 OASIS HLB 層析管柱 (尺寸：6g，Waters 公司製)，以 MeOH (150 mL) 進行溶出。將該溶出液進行減壓濃縮，添加丙酮後得沉澱物。將該沉澱物進行乾燥後得黃色粉末 (100mg)。

取該黃色粉末 (15mg) 溶解於少量之 MeOH，以製備 HPLC1 進行純化 (條件參照表 6)。製備溶出時間為約 22 分之區段。於該取出區段之沖提液中加入等量的水，再使

其通過 OASIS HLB 層析管柱（尺寸：500mg），以水（50 mL）進行通液後，再以 MeOH（50 mL）進行溶出。將該溶出液進行減壓濃縮，添加丙酮後得沉澱物。將該沉澱物進行乾燥後得化合物 A（13mg）之白色粉末。

[表 6]

製備 HPLC1 之條件

管柱	Symmetry 7 $\mu$ m C18管柱，19x300mm, Waters公司製
移動相	MeCN：水=27：73(v/v)(含0.05%TFA)
流速	7mL/分

（化合物 A 之物理化學上之性質）

以上述方法進行純化分離後之化合物 A，顯示以下物理化學上之性質。

[表 7]

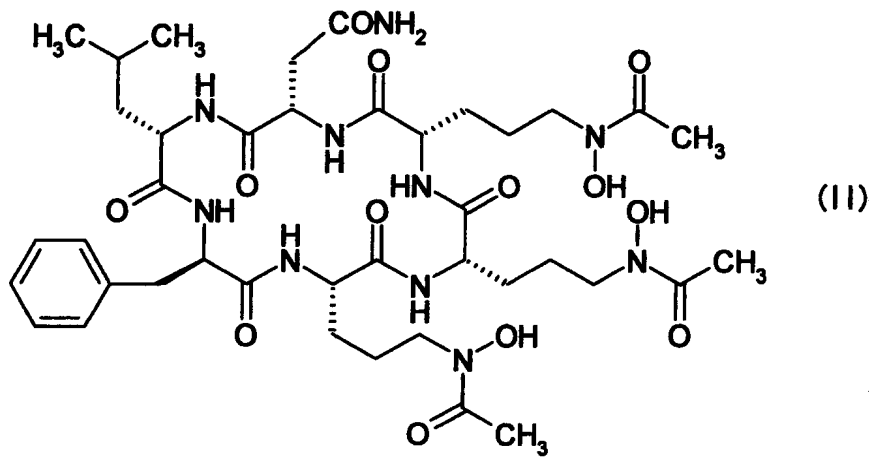
化合物 A 物理化學上之性質

顏色及形狀	白色粉末
旋光度	$[\alpha]_D^{25} -57$ (c 0.01, MeOH)
分子式	$C_{40}H_{62}N_{10}O_{13}$
HR ESI-MS	Found 891.4592(M+H) <sup>+</sup> , Calcd 891.4576
IR(KBr) $cm^{-1}$	3300, 2950, 1680, 1650, 1640, 1540, 1460, 1420, 1240, 1210, 1160, 1040, 970
<sup>1</sup> H-NMR分析圖譜	如圖1所示
<sup>13</sup> C-NMR之分析圖譜	如圖2所示

化合物 A 之化學構造根據物理化學性質決定如下述式（II）所述。針對構造胺基酸之立體結構，係適用改良

Murphy法，並決定為 D-Phe，L-Leu，L-Asn。有關鳥胺酸部分，與相似之天然物鐵色素（非專利文件1）相比較，由胺基酸分析得知3個胺基酸為相同，推測為L-鳥胺酸。

[化3]



## 實施例 2

（化合物 B 及 C 之培養生產）

將基礎培養基 2（參照表 8）分注（30 mL）至三角燒瓶（尺寸：100 mL）中，以高壓蒸氣滅菌器進行滅菌（121°C，30 分鐘）。於該培養基使用白金耳鈞以無菌方式進行真菌 MF - 347833 株之斜面培養物（斜面培養物）之植菌後，於 25°C 下進行 4 天以旋轉搖盪器之震盪培養（220 rpm）。

其次，將相同組成之基礎培養基（160 mL）分注至三角燒瓶（尺寸：500 mL）中，以高壓蒸氣滅菌器進行滅菌（121°C，30 分鐘）。於該基礎培養機中以無菌方式植入基礎培養物（3.2 mL），於 25°C 下進行 3 天以旋轉搖盪器

之震盪培養（220rpm）。

其次，預先調製生產培養基2（參照表9），再將該生產培養基2（20L）注入發酵槽（尺寸：30L），進行滅菌（121℃，30分鐘）後，以無菌方式植入基礎培養物（480 mL）。培養條件係通氣量為20L／分，攪拌速度為200rpm，於25℃下進行7天之培養。培養係於以HPLC進行分析同時進行（分析HPLC2，條件參照表11）。

另外，使用生產培養基3取代生產培養基2以相同培養條件可進行生產。

[表 8]

基礎培養基 2

培養基成分	含有率(%)
玉米澱粉	2
甘油	1
蔗糖	1
藥劑培養基	1
筋粉	1
Tween 80	0.2

[表 9]

## 生產培養基 2

培養基成分	含有率(%)
葡萄糖	0.5
可溶性澱粉(NACALAI公司製)	1.5
酵母萃取物(和光純藥工業公司製)	0.5
Adekanol LG-109(ADEKA公司製)	0.05
二氧化矽KM-70(信越化學工業公司製)	0.05
KCl	0.02
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
NaNO <sub>3</sub>	0.2

[表 10]

## 生產培養基 3

培養基成分	含有率(%)
蔗糖	4
乾燥酵母(朝日食品及健康關懷公司製)	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
碳酸鈣	0.5

[表 11]

## 分析 HPLC 2 之條件

管柱	Mightysil RP-18 GP 150-4.6(5 μm)關東化學公司製
移動相	MeCN : 水 = 28 : 72(v/v)(含0.5%NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
流速	1mL/分
檢測波長	210nm
留滯時間	化合物B(約8.7分) 化合物C(約10分)

( 化合物 B 及 C 之 分離 純化 )

於以上述之培養方法所得之培養物（生產培養基 2：90L）中添加等量之丙酮，攪拌 1 小時後進行過濾而得培養萃取物。於該培養萃取液中加入等量之水，再使其通過 Diaion SP 850 管柱（10L，三菱化學公司），以混合溶媒 { 丙酮：水 = 40：60（v/v），40L } 進行溶出。

於該溶出液中加入等量的水，再使其通過 Daisogel SP-120-ODS-B 管柱（ $15/30\ \mu\text{m}$ ，尺寸：2L，DAISO 公司製），以混合溶媒 { MeCN：水 = 25：75（v/v），7L } 進行溶出。

於該溶出液中加入等量的水，使其再度通過 Daisogel SP-120-ODS-B 管柱（尺寸：2L），以混合溶媒 { MeCN：水 = 27.5：72.5（含 0.05% TFA）（v/v） } 進行溶出。

於該溶出液中加入等量的水，使其再度通過 Daisogel SP-120-ODS-B 管柱（尺寸：180mL），以 MeOH 進行溶出，將該溶出液進行減壓濃縮。

將殘渣以少量的 MeOH 溶解，以製備 HPLC2 進行純化（條件參照表 12）。

溶出時間為約 24～25 分之區段加入等量的水，使其通過 OASIS HLB 層析管柱（尺寸：6g，Waters 公司製），以水（100 mL）進行通液後，再以 MeOH（100 mL）進行溶出。將該溶出液進行減壓濃縮，除去水後，藉由冷凍乾燥，得粉末狀之化合物 C（130mg）。將該粉末以溶媒（MeOH、醋酸乙酯、正己烷）進行結晶化，得化合物 C 之橘色結晶。

將對溶出時間為約 19~21 分之區段進行相同操作後所得粉末，以  $\text{CHCl}_3$  溶解後，以矽凝膠管柱色層分析儀（球狀 60N，中性，40-100  $\mu\text{m}$ ，關東化學股份有限公司製， $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ ）進行純化。將該溶出液進行減壓濃縮，除去水後，藉由冷凍乾燥，得白色粉末狀之化合物 B（150mg）。將該粉末（109mg）以溶媒（MeOH、醋酸乙酯、正己烷）進行結晶化，得無色結晶之化合物 B（90.1mg）。

[表 12]

## 製備 HPLC2 之條件

管柱	Mightysil RP-18 GP管柱250×20mm ID.、關東化學公司製
移動相	MeCN：水=30：70(v/v)(含0.05%TFA)
流速	10mL/分

（化合物 B 之物理化學上之性質）

以上述方法進行純化分離後之化合物 B，由於顯示以下物理化學上之性質，推測為化合物 A 與鋁之比例為 1：1 之化合物。

[表 13]

## 化合物 B 物理化學上之性質

顏色及形狀	無色結晶
旋光度	$[\alpha]_D^{25} +210^\circ (c\ 0.01, \text{MeOH})$
分子式	$\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{AlN}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Found 951.4191(M+H) <sup>+</sup> , Calcd 915.4157
IR(KBr) cm <sup>-1</sup>	3300, 2930, 1680, 1650, 1620, 1520, 1370, 1240, 1140, 990
融點	295°C
<sup>1</sup> H-NMR分析圖譜	如圖3所示
<sup>13</sup> C-NMR之分析圖譜	如圖4所示

## ( 化合物 C 之物理化學上之性質 )

以上述方法進行純化分離後之化合物 C，由於顯示以下物理化學上之性質及自單結晶 X 繞射構造解析，決定為化合物 A 與鐵之比例為 1 : 1 之化合物。

[表 14]

## 化合物 C 物理化學上之性質

顏色及形狀	橘色結晶
旋光度	$[\alpha]_D^{25} +256^\circ (c\ 0.01, \text{MeOH})$
分子式	$\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{FeN}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Found 944.3693(M+H) <sup>+</sup> , Calcd 944.3691
單結晶 X 繞射構造解析	a = 13.850(1) Å, b = 15.135(1) Å, c = 24.290(2) Å, V = 5091.6(6) Å <sup>3</sup>

## 實施例 3

## ( 化合物 D 之製造 )

將化合物 A ( 4 mg ) 溶解於 MeOH ( 0.4 mL ) 與水 (

0.4 mL) 之混合溶媒中，再加入  $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (10 mg) 之水溶液 (1.2 mL)，於 25°C 下進行攪拌 18 小時。於反應液中加入水 (18 mL)，使其通過 OASIS HLB 層析管柱 (Waters 公司製)，以水 (6 mL) 進行通液後，再以 MeOH (4 mL) 進行溶出。將該溶出液進行減壓濃縮，得白色粉末狀之化合物 D (4 mg)。

(化合物 D 之物理化學上之性質)

以上述方法所製造之化合物 D，由於顯示以下物理化學上之性質，推測為化合物 A 與鎵之比例為 1 : 1 之化合物。

[表 15]

化合物 D 物理化學上之性質

分子式	$\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{GaN}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Found 957.3597(M+H) <sup>+</sup> , Calcd 957.3597
<sup>1</sup> H-NMR 分析圖譜	如圖 5 所示
<sup>13</sup> C-NMR 之分析圖譜	如圖 6 所示

#### 實施例 4

(抗真菌活性測定法)

以下述表所示之對於檢測菌之抗真菌活性，係使用微量液體稀釋法 (久米光，山崎敏和著，臨床與微生物，21 期 5 號，573-580 頁，1994 年) 進行測定。其結果，化合物 B 對各種檢測菌之抗菌活性試驗之結果如下表所載。

[表 16]

化合物 B 之最小有效濃度 (MEC)

檢測菌	MEC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
克柔假絲酵母菌FP1979	0.31
光滑假絲酵母菌FP1944	0.31
高裏假絲酵母菌FP2086	0.31
近平滑假絲酵母菌FP1980	0.39
新型隱球菌FP1739	0.2
薰煙色麴菌FP1305	0.31
土麴菌SR0174	0.31
黑麴菌ATCC6275	0.78
黃麴菌ATCC9643	0.2
Trichosporon asashii FP2044	0.2
腐皮鏟孢FP1930	0.2
Pseudoallescheria boydii FP1987	0.2
米根黴FP1988	25
鬚髮癬菌FP2103	0.78
紅色毛癬菌FP596	1.25
磚格孢菌AHU9258	0.1

根據上述試驗結果，確認式 (I) 之化合物或其鹽具有抗真菌作用。因此，式 (I) 之化合物或其鹽可使用於真菌病症，特別係深層真菌病症等例如副鼻腔炎真菌病症之治療。

另外，例如鐵色素（自 Sigma 購入）對薰煙色麴菌 FP1305 之 MEC 為  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上。

實施例 5

(細胞傷害性測定法)

對細胞之傷害性係於小鼠之T淋巴腫瘤細胞株之EL-4細胞，添加入試驗藥劑之各種濃度，並於CO<sub>2</sub>培養箱中於37℃下培養72小時後，使用細胞計數試劑組（和光純藥工業公司製）測定細胞數，以計算IC<sub>50</sub>而進行判定。

其結果例如化合物B，於50 μg/mL之濃度時並未顯示對EL-4細胞之傷害性。

[產業上之利用可能性]

式(I)之化合物或其鹽可使用為真菌病症，特別係深層真菌病症等之預防及／或治療劑。

以上本發明沿用特定的方式進行說明，但相關業者當然的改變及改良亦包含於本發明之範圍內。

#### 【圖式簡單說明】

[圖1]圖1係化合物A之<sup>1</sup>H-NMR之分析圖譜。（測定溶媒為d<sub>6</sub>-DMSO）

[圖2]圖2係化合物A之<sup>13</sup>C-NMR之分析圖譜。（測定溶媒為d<sub>6</sub>-DMSO）

[圖3]圖3係化合物B之<sup>1</sup>H-NMR之分析圖譜。（測定溶媒為d<sub>6</sub>-DMSO）

[圖4]圖4係化合物B之<sup>13</sup>C-NMR之分析圖譜。（測定溶媒為d<sub>6</sub>-DMSO）

[圖5]圖5係化合物D之<sup>1</sup>H-NMR之分析圖譜。（測定溶

媒為  $d_6$ -DMSO)

[圖 6]圖 6 係化合物 D 之  $^{13}\text{C}$ -NMR 之分析圖譜。(測定溶媒為  $d_6$ -DMSO)

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98108269

※申請日：98年03月13日

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

環狀化合物及其鹽

Cyclic compound and salt thereof

A61K<sup>38/2</sup> (2006.01)  
 A61K<sup>36/06</sup> (2006.01)  
 C12N<sup>1/14</sup> (2006.01)  
 A61P<sup>31/10</sup> (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係提供一種抗真菌劑，特別係適用為深層真菌疾病治療劑之化合物。

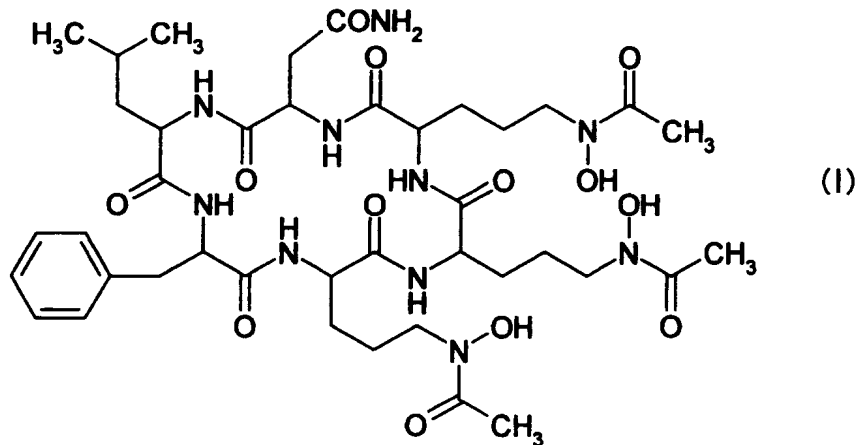
採取真菌桃色枝頂孢 (*Acremonium persicinum*)，自該培養液分離出環狀化合物。該環狀化合物或其鹽具有優良之抗真菌活性，確認於醫藥特別係適用做為抗真菌劑，遂完成本發明。本發明之環狀化合物或其鹽可使用為真菌疾病特別係深層真菌疾病之預防或治療劑。

三、英文發明摘要：

## 七、申請專利範圍：

1. 一種化合物或其鹽，其係如式 (I) 所示，

[化 1]



2. 如申請專利範圍第 1 項之化合物或其鹽，其中申請專利範圍第 1 項中之化合物之鹽係與鋁或鐵之鹽。

3. 如申請專利範圍第 1 項之化合物或其鹽，其中申請專利範圍第 1 項中之化合物之鹽係與鋁之鹽。

4. 一種菌株，其寄存號碼係 BCRC 930119 之桃色枝頂孢 MF - 347833 株 (*Acremonium persicinum* MF - 347833 株)。

5. 如申請專利範圍第 1 項之化合物或其鹽，其係培養如申請專利範圍第 4 項之菌株，再藉由對該培養液進行萃取、純化而可得。

6. 一種如申請專利範圍第 1 項之化合物或其鹽之製造方法，其係包含培養屬於真菌枝頂孢屬之菌株，再自該培養液中分離出式 (I) 之化合物。

7. 如申請專利範圍第 6 項之製造方法，其中屬於真菌枝頂孢屬之菌株係申請專利範圍第 4 項之菌株。

8.如申請專利範圍第1項之化合物或其鹽，其中申請專利範圍第1項中之化合物之鹽係與鎂之鹽。

9.一種醫藥組成物，其特徵為含有如申請專利範圍第1項之化合物或其鹽、以及於製藥學上被容許之賦形劑。

10.一種使用於預防或治療真菌病症之醫藥組成物，其特徵為含有如申請專利範圍第1項之化合物或其鹽。

11.一種如申請專利範圍第1項之化合物或其鹽之使用，其特徵為使用於預防或治療真菌病症之醫藥組成物之製造者。

12.一種如申請專利範圍第1項之化合物或其鹽之使用，其特徵為使用於預防或治療真菌病症者。

13.一種預防或治療真菌病症之方法，其特徵為包含對患者投予申請專利範圍第1項之化合物或其鹽之有效量。

圖 1

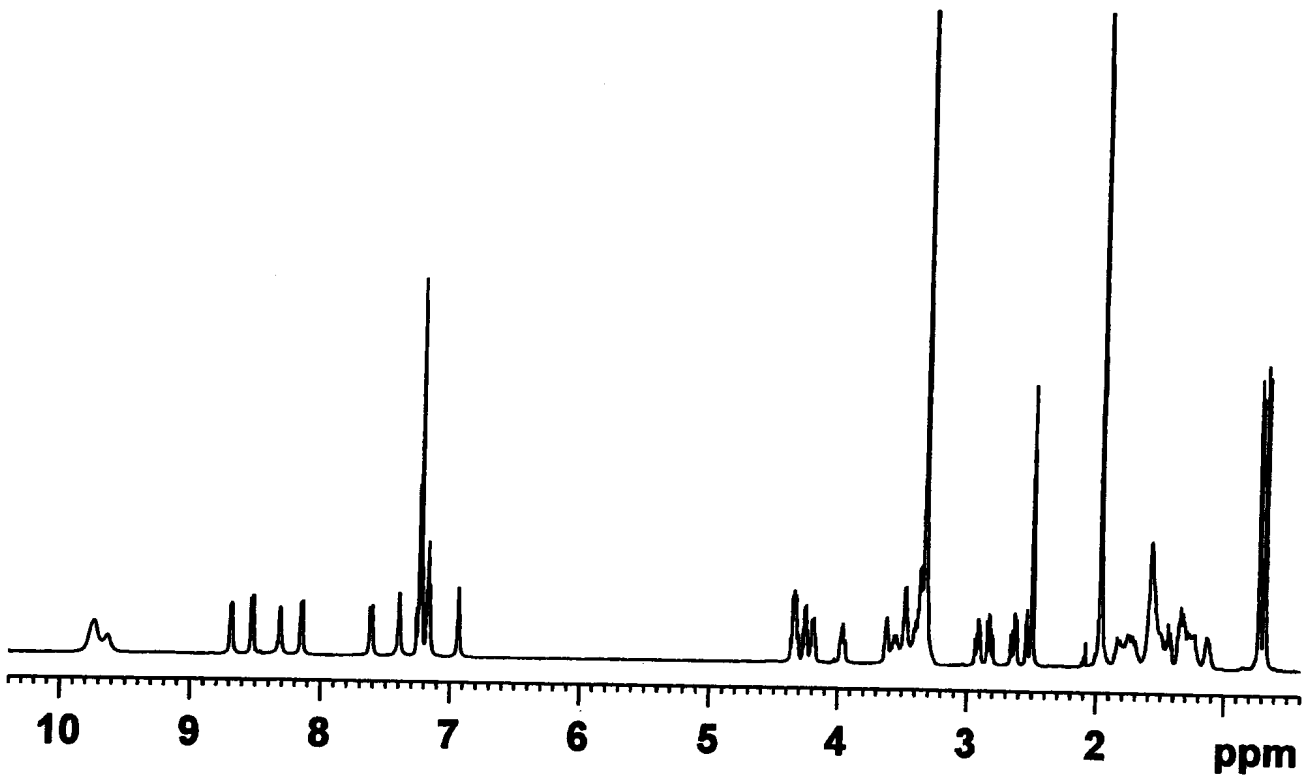


圖 2

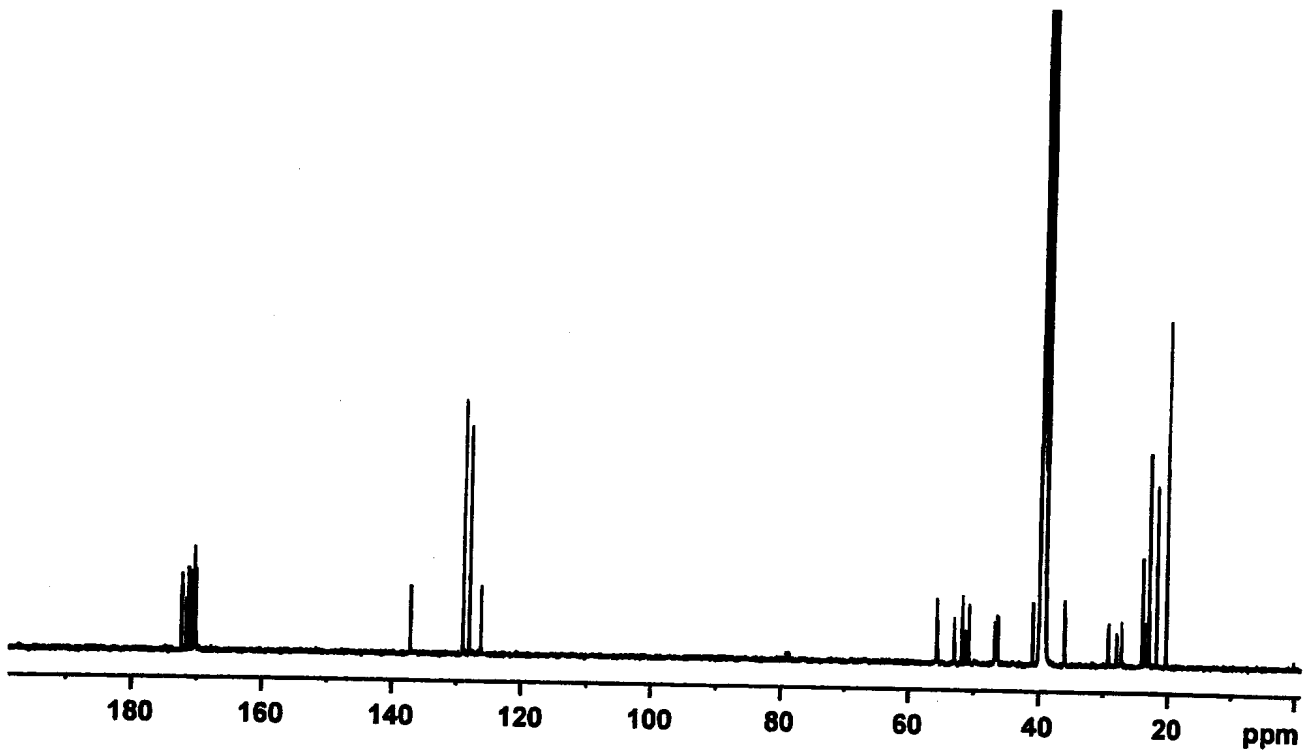


圖 3

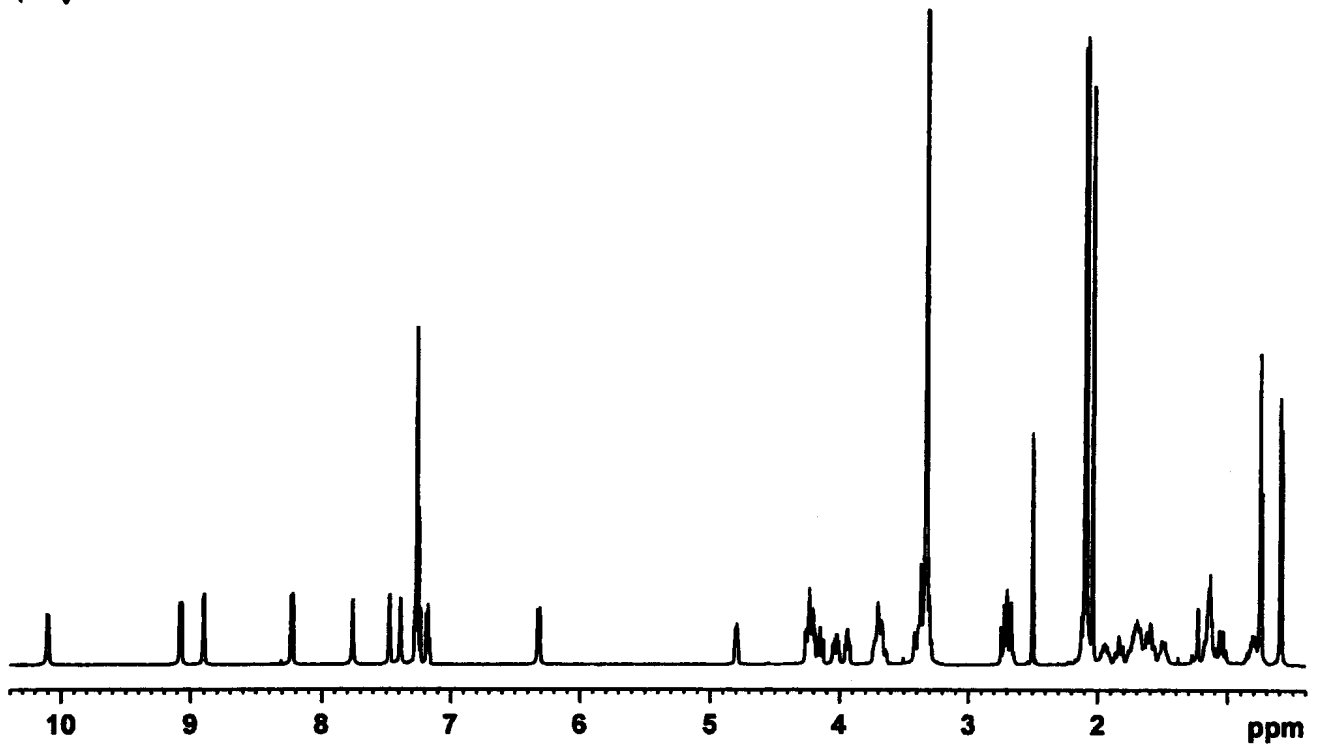


圖 4

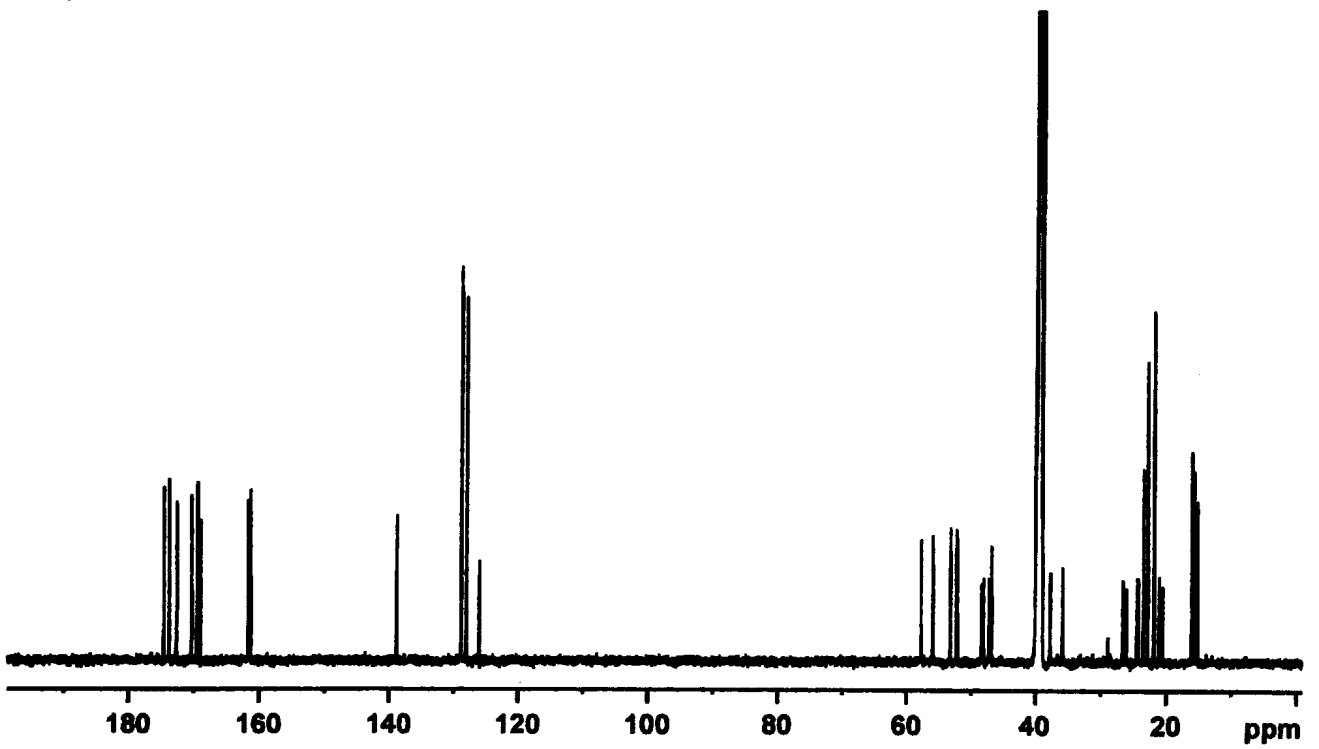


圖5

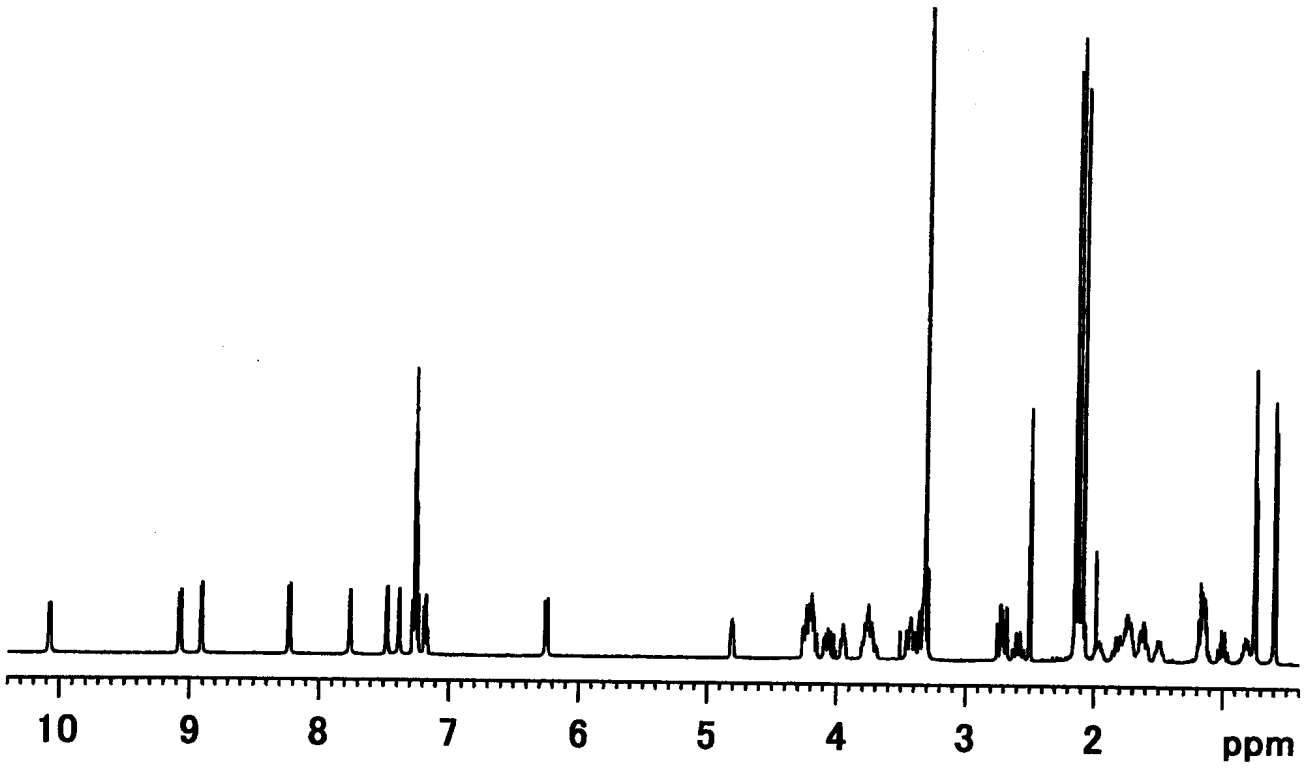
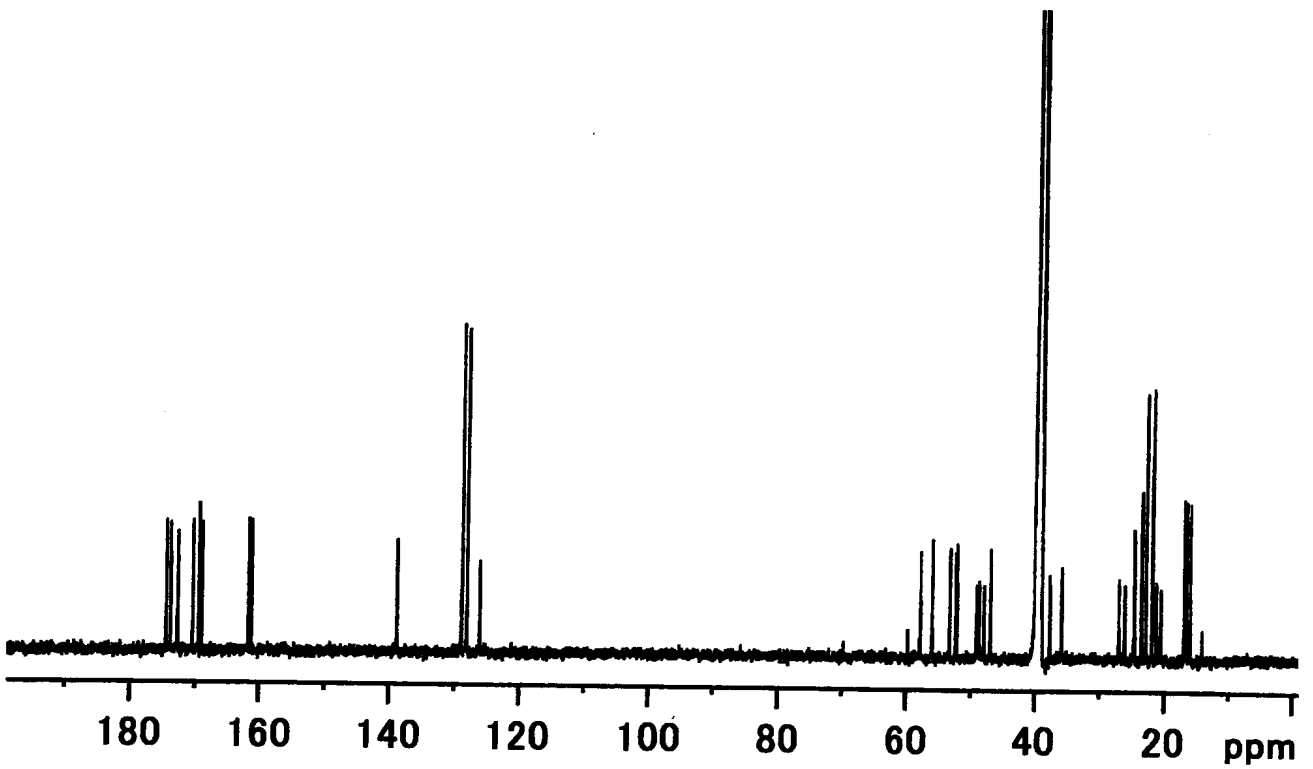


圖6



四、指定代表圖：

- (一) 本案指定代表圖為：第(1)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：無