



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0026498
(43) 공개일자 2012년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2006.01) A01N 43/08 (2006.01)
A01N 43/72 (2006.01) A01P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7027557
(22) 출원일자(국제) 2010년04월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/031746
(87) 국제공개번호 WO 2010/123894
국제공개일자 2010년10월28일
(30) 우선권주장
61/170,686 2009년04월20일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
마론 바이오 이노베이션스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 95618, 데이비스, 수트 비-107,
세컨 스트리트 2121
(72) 발명자
아술카 라트나카
미국 95618 캘리포니아주 데이비스 코웰 블리바드
4005
라클 사라한
미국 95819 캘리포니아주 새크라멘토 샌 안토니오
웨이 549
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

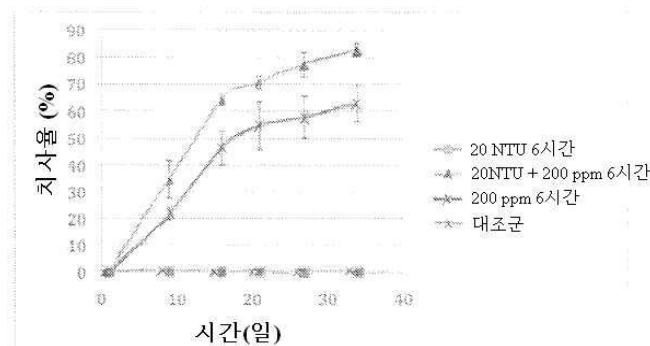
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 연체 동물 방제용 화학제 및 생물학적

(57) 요약

활성 성분으로서, 비제한적인 예로, 락톤, 락탐, 카바메이트, 아미드 및/또는 카르복시산 함유성 화합물 및/또는 슈도모나스 및/또는 에르위니아 유래 화합물을 포함하는, 복족강 및 이매패강에 속하는 연체 동물을 방제하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 또한, 개방된 수계, 발전소 및 식수 처리 시설에서 냉수 조건 하에 침입성 연체 동물에 대한 화학적 및 생물학적 방제 효능을 높이기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

후앙 후아장

미국 95616 캘리포니아주 데이비스 에피타. 206 알
바라도 애비뉴 520

코이부넨 마르자

미국 95617 캘리포니아주 데이비스 피.오. 박스
2277

마론 파멜라

미국 95616 캘리포니아주 데이비스 빅토리아 플레
이스 3333

슈 스테파니

미국 94116 캘리포니아주 샌프란시스코 34번 애비
뉴 2078

(30) 우선권주장

61/170,790 2009년04월20일 미국(US)

61/285,525 2009년12월10일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

분리된 화합물로서,

(a) 미생물로부터 수득가능하며;

(b) 복족강(*Gastropoda*) 및/또는 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 연체 동물에 대해 독성을 나타내며; 및

(c) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정하였을 때 약 540-550 및 약 1280-1335로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는, 분리된 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 홍합, 달팽이 및 민달팽이 중 1종 이상에 대해 독성을 나타내는 것을 특징으로 하는 분리된 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은,

(a) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정하였을 때 약 1280-1310, 보다 구체적으로는 약 1295의 분자량을 가지며;

(b) ^1H NMR 값이 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, 0.68이고;

(c) 역상 C-18 HPLC 컬럼 상에서, 유속 2.5 mL/min의 물 : 아세토니트릴 농도 구배 용매 시스템 (0-10 분; 30 - 40 % CH_3CN 수용액, 10-20 분; 40 - 60 % CH_3CN 수용액, 20-60 분; 60 - 80 % CH_3CN 수용액, 60-65 분; 80 - 100 % CH_3CN)과 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에서, 체류 시간이 약 50-55분인 것을 특징으로 하는 분리된 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분리된 화합물이,

(a) LC/MS로 측정하였을 때 약 1310-1335, 보다 구체적으로는 약 1321의 분자량을 가지며;

(b) 역상 C-18 HPLC 컬럼 상에서, 유속 2.5 mL/min의 물 : 아세토니트릴 농도 구배 용매 시스템 (0-10 분; 30 - 40 % CH_3CN 수용액, 10-20 분; 40 - 60 % CH_3CN 수용액, 20-60 분; 60 - 80 % CH_3CN 수용액, 60-65 분; 80 - 100 % CH_3CN)과 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에서, 체류 시간이 약 55-60분인 것을 특징으로 하는 분리된 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분리된 화합물이 LC/MS로 측정하였을 때 약 540-550, 보다 구체적으로는 약 546의 분자량을 가지며;

(d) 역상 C-18 HPLC 컬럼 상에서, 유속 10 mL/min의 물 : 아세토니트릴 농도 구배 용매 시스템 (0-10 분; 35 - 45 % CH_3CN 수용액, 10-20 분; 45 - 60 % CH_3CN 수용액, 20-50 분; 60 - 85 % CH_3CN 수용액, 50-60 분; 85 - 100 % CH_3CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH_3CN)과 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에서, 체류 시간이 약 50-55분인 것을 특징으로 하는 분리된 화합물.

청구항 6

물 : 아세토니트릴 용매 시스템(0-10 분; 35-45% CH₃CN 수용액, 10-20 분; 45-60% CH₃CN 수용액, 20-50 분; 60-85 % CH₃CN 수용액, 50-60 분; 85 - 100 % CH₃CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH₃CN)을 유속 10 mL/min으로 이용하고 210 nm에서의 UV 검출을 이용하는 HPLC에 의해, 슈도모나스 sp. 세포 현탁물로부터 체류 시간 약 45-50분에 수득가능한 분획을 포함하는 조성물로서,

상기 분획은,

(a) 복족강(*Gastropoda*) 및/또는 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물에 독성을 나타내며, (b) LC/MS로 측정하였을 때 약 630-660, 바람직하게는 약 643의 분자량과 약 970-1000, 바람직하게는 약 984의 분자량을 각각 가지는 2종 이상의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

복족강(*Gastropoda*) 및 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물의 방제에 유효한 1종 이상의 물질, 및 불활성 물질을 포함하며,

상기 물질은 슈도모나스 sp.으로부터 유래되거나, 또는 슈도모나스 sp.로부터 유래된 세포 현탁물로부터 유래되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 복족강(*Gastropoda*) 및 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물의 방제에 유효한 물질은,

(a) 슈도모나스 sp.로부터 수득가능하며;

(b) 복족강(*Gastropoda*) 및 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물에 독성을 나타내며;

(c) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정하였을 때 약 540-550 및 약 1280-1335로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법으로서,

상기 방법은,

(a) 에르위니아 sp. (*Erwinia* sp.) 세포의 세포 현탁물 또는 추출물;

(b) 락톤, 락탐, 카바메이트, 카르복시산 및/또는 아마이드 화합물이나, 단 감마-옥타락톤, 감마-노나락톤, 감마-데카노락톤, 감마-운데카락톤, N-사이클헵틸신남아미드, N-(트랜스-신나모일)피롤리딘, N-(트랜스-신나모일)피페리딘, N-(트랜스-신나모일)헥사메틸렌이민, 4-하이드록시도데카논산 및 도데카논산은 아닌, 1종 이상의 화합물, 또는 상기 화합물을 포함하는 조성물이나, 단 슈도모나스 배양물, 추출물 또는 현탁물이 아닌 조성물;

(c) 제1항에 따른 1종 이상의 화합물;

(d) 물 : 아세토니트릴 용매 시스템(0-10 분; 35 - 45 % CH₃CN 수용액, 10-20 분; 45 - 60 % CH₃CN 수용액, 20-50 분; 60 - 85 % CH₃CN 수용액, 50-60 분; 85 - 100 % CH₃CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH₃CN)을 유속 10 mL/min으로 이용하고 210 nm에서의 UV 검출을 이용하는 HPLC에 의해, 슈도모나스 sp. 세포 현탁물로부터 체류 시간 약 45-50분에 수득가능한 분획으로서, (i) 복족강(*Gastropoda*) 및/또는 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물에 독성을 나타내며, (ii) LC/MS로 측정하였을 때 약 630-660의 분자량과 약 970-1000의 분자량을 가지는 2종 이상의 화합물을 포함하는 분획인, 조성물

중 1종 이상을 상기 장소에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 연체 동물은 연체 동물에 사멸을 유도함으로써 방제되는 것을 특징으로 하는, 방제가 필

요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법.

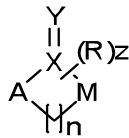
청구항 11

제9항에 있어서,

상기 장소에 도입되는 상기 화합물은 락톤, 락탐, 카바메이트, 카르복시산 및/또는 아마이드이고,

상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 유형의 화합물인 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법:

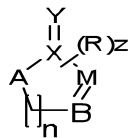
(a) 아래 화학식을 가지는 I형 화합물:



(상기 식에서,

X는 탄소이고; Y는 산소이고; A와 M은 탄소, 산소, 질소 또는 황이고; n은 1-21이며; (R)z는 고리내 R 기에서의 치환기의 수 z를 표시하며; R과 R 상의 치환기는 수소, 하이드록실, 알킬 하이드록실, 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이고; R 쇄의 길이는 1 - 25개의 원자 길이이며; Z는 0, 1, 2, 3임);

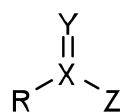
(b) 아래 화학식을 가지는 II형 화합물:



(상기 식에서,

X는 탄소이고; Y는 산소이고; A, B 및 M은 탄소, 산소, 질소 또는 황이고; (R)z는 고리내 R 기에서의 치환기의 수 z를 표시하며; R과 R 상의 치환기는 수소, 하이드록실, 알킬 하이드록실, 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이고; R 쇄의 길이는 1 - 25개의 원자 길이이며; Z는 0, 1, 2, 3임);

(c) 아래 화학식을 가지는 III형 화합물:

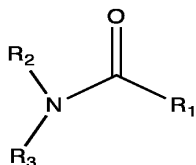


(상기 식에서,

X는 탄소이고; Y는 산소이고; Z는 수소, 하이드록실, 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이고; R은 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이며, 1 - 25개의 원자 길이임).

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식을 가지는 사멘틴(sarmentin) 유사체인 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법:



상기 식에서,

R_1 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이고, R_1 개의 길이는 4-20개의 원자 길이이며;

R_2 및 R_3 는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 방향족, 아릴알킬, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이거나; 또는 다른 예로 $R_2 + R_3 + N$ 은 N-함유성 헤테로사이클릭 모이어티이며,

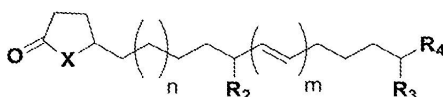
$R_2 + R_3 + N$ 이 N-함유성 헤테로사이클릭 모이어티인 경우, R_1 은 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이다.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 화합물은 락톤이고; 5원 감마-락톤인 하나 이상의 락톤 모이어티, 하나 이상의 불포화 모이어티 및 하나 이상의 알코올 기를 포함하며, 코어 구조의 분자량이 약 285 - 약 310이고, 15개 이상의 탄소와 3개 이상의 산소를 포함하는, 하이드록실화된 불포화 지방산 락톤 구조를 가지며,

선택적으로, 아래 구조를 가지는 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법:



상기 식에서,

X는 각각 독립적으로 --O, --NR₁, 또는 --S이고, R₁은 --H 또는 C₁-C₆ 알킬이고;

n은 0 - 15이고;

R_2 내지 R_4 는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 치환된 헤테로사이클릭, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 하이드록시, 할로겐, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카바메이트, 설포닐, 설포아미드 또는 설퍼릴이고;

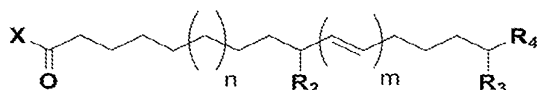
m은 이중 결합 또는 삼중 결합이다.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 화합물은, 하나 이상의 카르복시산 모이어티, 하나 이상의 불포화 모이어티 및 하나 이상의 알코올 기를 포함하며, 코어 구조의 분자량이 약 285 - 약 310이고, 15개 이상의 탄소와 3개 이상의 산소를 포함하는, 하이드록실화된 불포화 지방산 구조를 가지며,

선택적으로, 아래 구조를 가지는 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법:



상기 식에서,

X는 각각 독립적으로 --O, --NR₁, 또는 --S이고, R₁은 --H 또는 C₁-C₆ 알킬이고;

n은 0 - 15이고;

R₂ 내지 R₄는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 치환된 헤테로사이클릭, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카바메이트, 설포닐, 설포아미드 또는 설퍼릴이고;

m은 이중 결합 또는 삼중 결합이다.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법:

(a) 도 1에 도시된 화합물;

(b) 감마-도데카락톤, 델타-트리데카락톤, 필리페롤리드 A(piliferolide A) 및 알파-헵틸-감마-부티로락톤으로 이루어진 군으로부터 선택되는 락톤;

(c) N-사이클로펜틸데칸아미드, N-(데카노일)피롤리딘, N-(데카노일)피페리딘, N-(데카노일)헥사메틸렌이민, N-사이클로펜틸데센아미드, (N-(데세노일)피롤리딘, N-(데세노일)피페리딘, N-(데세노일)헥사메틸렌이민 및 N-(데세노일)피페리딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사멘틴 유사체; 및

(d) 11-하이드록시-12-엔-옥타데카논산.

청구항 16

물질 및 1종 이상의 불활성 물질을 연체 동물의 방제에 유효한 함량으로 방제가 필요한 장소에 도입하는 단계를 포함하는, 1종 이상의 연체 동물의 방제법으로서,

연체 동물 방제용인 상기 물질은 무처리 대조군에 비해 상기 연체 동물에 대해 약 20% 이상의 치사율을 발생시키는 양으로 제공되며,

상기 불활성 물질은 상기 연체 동물 방제용 물질의 치사율을 약 20% 이상 높이기 위한 충분한 양으로 제공되며,

상기 장소는 수계(body of water) 또는 페인트인 액체이거나, 또는 플라스틱, 콘크리트, 나무, 유리 섬유, 철 파이프, 폴리비닐 클로라이드 파이프 또는 코팅제나 페인트로 피복된 표면으로부터 선택되는 고정 표면인 것을 특징으로 하는, 연체 동물의 방제법.

청구항 17

1종 이상의 불활성 물질을, 방제가 필요한 장소에 도입하였을 때 물질의 효능을 증가시키기 위한 유효량으로, 방제가 필요한 장소에 도입하는 단계를 포함하는, 연체 동물 방제용 1종 이상의 물질의 효능을 높이는 방법으로서,

상기 불활성 물질은 선택적으로 상기 연체 동물 방제용 물질의 효능을 약 20% 이상 높이며,

상기 불활성 물질은 선택적으로 점토 미네랄로부터 유래되는 것을 특징으로 하는, 연체 동물 방제용 1종 이상의 물질의 효능을 높이는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 불활성 물질이 카올리나이트(kaolinite), 녹점토(smectite), 애틀펄자이트(attapulgite) 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는, 연체 동물 방제용 1종 이상의 물질의 효능을 높이는 방법.

청구항 19

방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물을 방제하거나 및/또는 1종 이상의 연체 동물의 사멸을 유도하기 위한 조성물로서,

상기 조성물은, 락톤, 락탐, 카바메이트, 카르복시산 및/또는 아미드 화합물이나, 단 감마-옥타락톤, 감마-노나락톤, 감마-데카노락톤, 감마-운데카라톤, N-사이클펜틸신남아미드, N-(트랜스-신나모일)피롤리딘, N-(트랜스-신나모일)피페리딘, N-(트랜스-신나모일)헥사메틸렌이민, 4-하이드록시도데카노산 및 도데카노산은 아닌, 1종 이상의 화합물을 포함하며,

상기 조성물은 슈도모나스 배양물, 추출물 또는 현탁물은 아닌 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 20

1종 이상의 연체 동물의 방제법으로서,

(a) 에르위니아 sp. 세포의 현탁물 또는 추출물을 준비하는 단계; 및

(b) 상기 현탁물 또는 추출물을 연체 동물의 방제에 유효한 양으로 방제가 필요한 장소에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 연체 동물의 방제법.

청구항 21

페인트 담체 중에, 제1항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 조성물, 또는 제19항의 조성물을 항-생장성(antivegative) 및 살충성(biocidal) 유효량으로 포함하는, 오손 방지 페인트.

청구항 22

연체 동물 방제용 조성물 및/또는 오손 방지 페인트의 제형화에 있어서의, 제1항의 화합물, 제6항 또는 제7항의 조성물, 또는 제19항의 조성물의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 활성 성분으로서, 비제한적인 예로, 락톤, 락탐, 카바메이트, 아미드 및/또는 카르복시산 함유성 화합물 및/또는 미생물(예, 슈도모나스 및/또는 에르위니아) 유래 화합물을 포함하는, 홍합, 달팽이 및/또는 민달팽이와 같은 연체 동물을 방제하기 위한 조성물과 방법에 관한 것이다. 또한, 냉수 조건 하에서의 개방된 수계(open water), 발전소 및 식수 처리 시설에서, 또는 고형 표면에서, 홍합, 달팽이 및/또는 민달팽이와 같은 연체 동물에 대한 화학적 및 생물학적 방제 효능을 높이기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

배경기술

[0002] 얼룩무늬 홍합(Zebra mussel)인 드라이세나 폴리모르파(*Dreissena polymorpha*)는 본래 카스피해와 아시아 우랄강에서 자생한다. 그러나, 19세기에 서쪽으로 퍼져, 현재는 대부분의 유럽 국가, 독립 국가 연합(공식적으로 소비에트 연방)의 서부 및 터키에서 발견되고 있다. 과거 20년간, 얼룩무늬 홍합인 드라이세나 폴리모르파와 쿠아가 홍합(quagga mussel)인 드라이세나 부겐시스(*Dreissena bugensis*)와 같은 홍합들이 북아메리카로 유입되었다. 육수(inland water)를 통한 이러한 광범위한 전파로 미국 동부 대부분에 퍼져 있다[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]. 마찬가지로, 골든 홍합(Golden Mussel)인 림노퍼나 포툰(*Limnoperna fortune*) 역시 아시아와 남아메리카 국가들로 전파되었다(Golden Mussel - *Limnoperna fortune*). 아시아 대합 조개(Asian Clam)인 코르비쿨러 플루미니아(*Corbicula fluminea*)는 거의 대부분의 모든 아시아 국가와 미국으로 퍼져있다 [비-토착성 종에 대한 정보 고시: Asian clam, *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) (Mollusca: Corbiculidae)]. 유니어니드 홍합(unionid mussel)과 같은 그외 홍합들도 미국과 기타 국가들에 존재하고 있다.

[0003] 새로운 구역에서 신속하게 군락을 형성하여 빠르게 고밀도의 집락을 이루고 임의의 단단한 하층(예, 암석, 원목, 수생 식물, 토착 홍합의 외피, 및 가재의 외골격, 플라스틱, 콘크리트, 목재, 유리 섬유, 철로 제작된 파이프, 폴리비닐 클로라이드로 제작된 파이프 및 일반 페인트로 도포된 표면)에 유착하는 홍합의 유착력으로 인해, 심각한 부작용이 발생하고 있다. 이로 인해, 수 관련 시설(water-dependent infrastructure)의 손상, 수

백만 달러의 운영 비용 증가 및 현저한 생태계 손상 [O'Neill, C.R., Jr. 1997, Economic impact of zebra mussels-results of the 1995 national zebra mussel information clearing house study. *Gt. Lakes Res. Rev.* 3, 35-44; Karatayev, A.Y., L.E. Burlakova, D.K., Padilla, 1997, the effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communalities in eastern Europe. *Journal Shellfish Research*, 16, 187-203; MacIsaac, H.J., 1996. Potential abiotic and biotic impacts of zebra mussels on the inland waters of North America. *American Zoology*, 36, 289-299; D.P. Molloy, the potential for using biological control technologies in the management of *Dreissena* spp., *Journal of Shellfish Research*, 1998 (17) 177-183], 뿐만 아니라, 세입 10억 달러 감소에 해당되는 생산성 감소 (Connelly, N. A., C. R. O'Neill, Jr, et al. (2007), "Economic impacts of Zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities", *Environmental Management* 90:10. Economic impacts of zebra mussels on drinking water treatment and electric power generation facilities. *Environmental Management* 40: 105-112)와 같은 결과들이 발생하고 있다. 또한, 이러한 침입성 홍합이 수생 생태계로 빠르게 침투하여, 생물 다양성 측면에서 중요한 생물인 토종 유니어니드 홍합의 풍요와 비옥화를 위축시킨다 (Ricciardi, A, Neves, R.J., Rasmussen, J.B. 1998. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionidae) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. *Journal of Animal Ecology* 67: 613-619).

[0004] 홍합의 관리 감독은 수 관련 시설과 수 생태계를 보호하는데 있어 매우 중요하다. 홍합의 개체수를 줄이기 위한 다수의 방법들이 있다. 이러한 방법으로는 선제-행동과 반응성 방법이 있다. 반응성 제거 방법은 기계적 제거, 포식 동물을 이용한 제거 및 화학적 및 생화학적 제거가 있다. 예를 들어, 어류, 조류, 가재, 게, 거머리 및 포유류가 홍합을 먹이로 이용하는 것으로 확인되었다. 그러나, 홍합 집단이 특히 파이프나 펌핑 플랜트와 같이 사람이 만든 구조물 내에 있을 경우, 천연 포식으로는 방제되지 않을 것이다.

[0005] 연체 동물 살생제(molluscicide)를 적용하는 방법은 홍합 개체를 줄이는 또다른 효과적인 방법이다. 예컨대, 유럽, 미국 및 캐나다에서는 방제제로 차아염소산 나트륨이 가장 많이 사용되고 있다. 그러나, 홍합은 이러한 처리시 자신의 외피를 닫은 상태로 수일간 견딜 수 있고, 염소의 환경적인 독성으로 인해 염소는 압력 센스 장치나 다른 장치를 구비한 파이프나 관에서만 사용할 수 있다 [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]. 또한, 계면활성제 암모늄염, 페인트에 사용되는 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), N-트리페닐메틸-모르폴린 등과 같은 다른 상품화된 연체동물 살생제들도 다수 있다. 이들 화학제들은 수 생태계에 대한 선택성이 낮거나 영향을 미친다. 예를 들어, Bayluscide[®] (Bayer)으로 시판되고 있는 4-트리플루오로에틸-4-니트로페놀은 이러한 침입성 외래종을 방제하기 위한 가능성있는 후보 물질이다. 그러나, 이 화학제의 독성 기전이 홍합의 세포 호흡에 작용하기 때문에, 자연에서 홍합과 어류 등의 다른 수생종 간의 선택성에 한계가 있을 수 있다 [Karen Perry E John Lynn, Detecting physiological and pesticide-induced apoptosis in early developmental stages of invasive bivalves, *Hydrobiologia* (2009) 628:153-164; I Takougang, J Meli, F Angwafo, Field trials of low dose Bayluscide on snail hosts of *schistosoma* and selected non-target organisms in sahelian Cameroon, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2006, 101(4): 355-358].

[0006] 침입성 홍합을 안전적이고, 친환경적이며, 저렴한 방식으로 관리하는 것이 중요하다. 이러한 침입성 홍합류를 방제하기 위한 보다 덜 유해한 방법을 찾기 위해, 뉴욕주 박물관(NYSM) 현장 실험 연구소에서는 얼룩무늬 홍합과 쿠아가 홍합에 사용하기 위한, 잠재적인 생물학적 방제제로서, 700종 이상의 박테리아 분리주들을 스크리닝 하였다. 그 결과, 이들 홍합류에 치명적인 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*) 균주 CL145A 분리주를 발견하게 되었다(Molloy, D. P. 미국 특허 6,194,194, 2001년 2월 27일에 공고됨). 이 박테리아는 전 세계적으로 분포하고 있으며, 북아메리카 수계 전역에 존재하고 있다. 본래 이 박테리아는 식물의 뿌리가 부패되어 곰팡이가 생기지 않도록 보호하는 것으로 확인된 무해한 박테리아 종이다. 또한, 이것은 도처에 존재하며, 일반 가정용 냉장고에서 발견되는 일반적인 식품 부패 유기체이다 [Daniel P. Molloy and Denise A. Mayer, Overview of a Novel Green Technology: Biological Control of Zebra and Quagga Mussels with *Pseudomonas fluorescens*, Version 6: Updated August 24, 2007].

[0007] **락톤, 랍탐, 카바메이트 및 아미드**

[0008] 락톤은 식품과 음료에 널리 존재하고 있으며, 또한 동물(예, 해면 동물)과 미생물(예, 효모, 진균)의 이차 대사

산물이다. 일부 락톤은 독특한 향(예, 감마-데칼락톤)을 가지고 있어, 이들 락톤 생산에 생물공학적인 공정을 사용함으로써 식품 산업에서 천연 제품에 대한 수요를 높이는 결과를 초래하기도 한다 [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*, *Appl Biochem Biotechnol* (2009) 158:41-50]. 여러가지 락톤들의 그외 기능들은, 항박테리아 활성 [Ikuko Shimizu, Yasunori Isshiki, Harue Nomura, Keisuke Sakuda, Katsuya Sakuma, Seiichi Kondo, The Antibacterial Activity of Fragrance Ingredients against *Legionella pneumophila*, *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32(6) 1114-1117], 간보호 활성 [Yumiko Itoh, Hiroshi Shimura, Mayumi Ito, Naoharu Watanabe, Michio Yamagishi, Masaharu Tamai and Kazunori Hanada, Novel hepatoprotective γ -lactone, MH-031, I. Discovery isolation, physicochemical properties and structural elucidation, *The Journal of Antibiotics* 1991, 832-837], 항-결핵 활성 [Ma, G.Y. et al. anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *micromelum hirsutum*, *Planta Med.* 2005, 71, 261-267], 항-HIV 활성 [zhang et al., sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*, *Planta Med.* 2005, 71, 452-457], 성페로몬 [J. H. Tumlinson, Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer, *Science*, 1977, 197, 789-792], 세포독성 활성 [Fan, X. N. et al. Chemical Constituents of *Heteroplexis microcephala*, *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1184-1190], 신호 분자 [M.K. Vinson, et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 9427-9431] 및 살충제 활성 [John A. Findlay, et al., Insect toxins from spruce endophytes, *Can. J. Chem.* 2003, 81, 284-292]과 관련있다.

[0009] 락탐은 일부 식물체와 해양 유기체에 존재하지만, 일반적으로는 진균의 대사산물이다. 최근 간행물들에서 다수의 생물학적 활성들(예, 세포독성 및 항암 활성, 혈관신생 저해, 신경 활성, 항-감염성 활성들)이 검토되었다 [Bastien Nay, Nassima Riache and Laurent Evanno, Chemistry and biology of non-tetramic γ -하이드록시- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams from natural sources, *Natural Product reports*, 2009, 26, 1044-1062].

[0010] 카바메이트는 식물, 미생물 및 해면 동물에 존재하며, 이들 화합물 대부분이 수용액 중에서 안정적이지 않기 때문에 이 화합물에 대한 생물학적 활성에 대한 보고는 락톤과 아미드에 비해 적은 편이다. 천연 카바메이트의 살진균 활성에 대한 일 예가 있다 [Richard J. Clark, et al., Antifungal 알킬 Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge *Haliclona* n. sp., *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 1568-1571]. 아미드는 식물, 미생물 및 해면 동물들에 널리 분포되어 있다. 예를 들어, 해양-유래의 진균 페니실리움 시트리눔(*Penicillium citrinum*)의 스칼루사미드 A(Scalusamide A)는 항세균 및 항진균 활성을 나타낸다 [Masashi Tsuda, et al., Scalusamides A-C, New Pyrrolidine Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium citrinum*, *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 273-276].

[0011] 아미드에 대한 다른 예로, 수많은 생물학적 활성을 나타내는, 사멘틴(sarmentine)이라고 하는 식물 유래 화합물이 있다. 2009년 7월 21일자 출원번호 61/227,412에 기술된 바와 같이, 사멘틴은 1987년에 페이퍼 사멘토섬(*Piper sarmentosum*)의 열매에서 최초로 분리되었고 [Likhitwitayawuid, K., Ruangrungsi, N., Lange, G and Decicco, C., Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from Piper Samentosum, *Tetrahedron* 1987 (43) 3689-3694], 또한 1988년에 페이퍼 니그룸(*Piper nigrum*)에서도 분리되었으며 [Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K and Yoshimura, H. Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. IV. Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1988(36):2452], 1995년에 최초로 합성되었다 [Bernabeu, M., Chinchilla, R. and Najera, C., (2E,4E)-5-Tosyl-2,4-pentadienamides: New Dienic Sulfones for the Stereoselective Synthesis of (2E,4E)-Dienamides, *Tetrahedron Letter*, 1995 (36)3901-3904]. 사멘틴은 광에 의해 노화된 피부를 보호하는 생체내 피부 항산화제로 작용하며[Cornacchione, S.; Sadick, N. S.; Neveu, M.; Talbourdet, S.; Lazou, K.; Viron, C.; Renimel, I.; de Queral, D.; Kurfurst, R.; Schnebert, S.; Heusele, C.; Andre, P.; Perrier E. *In vivo* skin antioxidant effect of a new combination based on a specific *Vitis vinifera* shoots extract and a biotechnological extract. *J. Drugs in Dermatol.* 2007, 6S, 8-13], 항혈소판 응집 활성을 나타내며 [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*, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 9436-9442], 항점균(antiplasmodial) 활성과 항마이코박테리아 활성

[Tuntiawachwuttikul, P.; Phansa, P.; Pootaeng-on, Y.; Taylor, W. C. Chemical constituents of the roots of *Piper Sarmentosum*, *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 149-151], 항결핵 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [Rukachaisirikul, T.; Siri wattanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P.; Wongwattanavuch, P.; Suksamrarn, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*, *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, *93*, 173-176]. 사멘틴은 화장품과 의약제에 소수성 화합물에 대한 가용화제로서 사용되고 있다 (Stephen, T.; Andrew, H. Compositions comprising macromolecular assemblies of lipid surfactant, PCT Publication No. WO/2008/065451). 2009년 7월 21일자 출원번호 61/227,412에는, 사멘틴과 이의 유사체가 식물 해충 방제에 사용될 수 있다고 언급되어 있다.

발명의 내용

[0012]

본 발명은 연체 동물, 특히 복족강(*Gastropoda*) 및/또는 이매패강(*Bivalvia*)에 속하는 동물, 보다 구체적으로는 홍합, 달팽이 및 민달팽이를 방제하기 위한, 화합물, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은, (a) 미생물, 특히, 슈도모나스 sp., 보다 구체적으로는, 슈도모나스 폴루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 또는 슈도모나스 ATCC 55799의 식별 특징을 가지고 있는 유기체로부터 수득가능하거나 유래되며; (b) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 비제한적으로, 특히 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 대해 독성을 나타내며; 및 (c) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정하였을 때 약 540-550 및 약 1280-1335로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자량을 가지는, 분리된 화합물에 관한 것이다. 이들 화합물은 연체 동물, 특히 복족강 및/또는 이매패강에 속하는 동물, 보다 구체적으로는 홍합, 달팽이 및 민달팽이의 방제에 사용될 수 있는 조성물로 제형화할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 화합물은, (a) 미생물, 특히, 슈도모나스 sp.로부터 수득가능하며; (b) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 비제한적으로, 특히 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; 및 (c) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정하였을 때 약 1280-1310, 보다 구체적으로는 1295의 분자량을 가지며; (d) ^1H NMR 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, 0.68이고; (e) 역상 C18 HPLC 컬럼(예, Thermo Scientific, Hydersil Gold, 100 x 10 mm)에서, 유속 2.5 mL/min의 물 : 아세토니트릴(CH_3CN)의 농도 구배 용매 시스템(0-10분; 30-40% CH_3CN 수용액, 10-20분; 40-60% CH_3CN 수용액, 20-60분; 60-80% CH_3CN 수용액, 60-65분; 80-100% CH_3CN 수용액)과 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에서, 체류 시간이 약 50-55분, 보다 구체적으로는 약 52분, 더욱 더 구체적으로는 51.66분이다.

[0013]

다른 구현예에서, 이 화합물은 다음과 같은 특징들을 가진다: (a) 미생물, 특히 슈도모나스 sp.로부터 수득가능하며; (b) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 비제한적으로, 특히 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; 및 (c) LC/MS로 측정하였을 때 약 1310-1335, 보다 구체적으로는 1321의 분자량을 가지며; (d) 역상 C18 HPLC 컬럼(Thermo Scientific, Hydersil Gold, 100 x 10 mm)에서, 유속 2.5 mL/분의 물 : 아세토니트릴(CH_3CN)의 농도 구배 용매 시스템(0-10분; 30-40% CH_3CN 수용액, 10-20분; 40-60% CH_3CN 수용액,

20-60분; 60-80% CH₃CN 수용액, 60-65분; 80-100% CH₃CN 수용액)과 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, HPLC에서, 체류 시간이 약 55-60분, 보다 구체적으로는 약 60분, 더욱 더 구체적으로는 59.61분임. 또다른 구현예에서, 본 발명은 다음과 같은 특징을 가지는 분리된 화합물에 관한 것이다: (a) 미생물, 특히 슈도모나스 sp.로부터 수득가능하며; (b) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 비제한적으로, 특히 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; (c) LC/MS로 측정하였을 때 약 540-550, 보다 구체적으로는 546의 분자량을 가지며; (d) 역상 C18 HPLC 컬럼(Phenomenex, luna C 18(2) 10 μ , 100 Å Axia, A250 x 30 mm)에서, 유속 10 mL/min의 물 : 아세트 니트릴의 농도 구배 용매 시스템(0-10분; 35-45% CH₃CN 수용액, 10-20분; 45-60% CH₃CN 수용액, 20-50분; 60-85% CH₃CN 수용액, 50-60분; 85-100% CH₃CN 수용액, 60-70분; 100% CH₃CN 수용액) 및 210 nm에서의 UV 검출을 이용한, HPLC에서, 체류 시간이 약 50-55분, 보다 구체적으로는 약 52분, 더욱 더 구체적으로는 51.54분임.

[0014] 본 발명은, (a) 슈도모나스 sp.로부터 유래된 세포의 현탁물을 수득하는 단계, 및 (b) 상기 현탁물로부터 크로마토그래피 방법에 의해 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 본 발명의 화합물의 수득 방법에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은, 또한, 상기 화합물을 포함하는 조성물, 뿐만 아니라, 유속 10 mL/min의 물 : 아세트니트릴 용매 시스템(0-10 분; 35-45% CH₃CN 수용액, 10-20 분; 45-60 % CH₃CN 수용액, 20-50 분; 60-85 % CH₃CN 수용액, 50-60 분; 85-100% CH₃CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH₃CN) 및 UV 210 nm 검출을 이용한 HPLC에 의해, 슈도모나스 sp. 세포 현탁물로부터 체류시간 약 45-50분에 수득가능한 분획을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 이 분획은 (a) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; (b) LC/MS로 측정시 약 630-660 및 약 970-1000의 분자량을 가지는, 2종 이상의 화합물을 포함한다.

[0016] 본 발명은,

[0017] (a) 에르위니아 sp. 세포의 세포 현탁물 또는 추출물;

[0018] (b) 락톤, 락탐, 카바메이트, 카르복시산 및/또는 아미드 화합물이나, 단 감마-옥타락톤, 감마-노나락톤, 감마-데카노락톤, 감마-운데카락톤, N-사이클헥실신남아미드, N-(트랜스-신나모일)피롤리딘, N-(트랜스-신나모일)피페리딘, N-(트랜스-신나모일)헥사메틸렌아민, 4-하이드록시도데카논산 및 도데카논산은 아닌, 1종 이상의 화합물, 또는 상기 화합물을 포함하는 조성물이나, 단 슈도모나스 배양물, 추출물 또는 현탁물은 아닌 조성물;

[0019] (c) (i) 슈도모나스 sp.로부터 수득가능하거나 유래되며, (ii) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며, 및 (iii) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)으로 측정시 약 540-550 및 약 1280-1335로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자량을 갖는, 1종 이상의 화합물;

[0020] (d) 유속 10 mL/min의 물 : 아세트니트릴 용매 시스템(0-10 분; 35-45% CH₃CN 수용액, 10-20 분; 45-60 % CH₃CN 수용액, 20-50 분; 60-85 % CH₃CN 수용액, 50-60 분; 85-100% CH₃CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH₃CN) 및 UV 210 nm 검출을 이용한 HPLC에서, 슈도모나스 sp. 세포 현탁물로부터, 체류 시간 약 45-50분에 수득가능한 분획을 포함하는 조성물로서,,

- [0021] 이 분획은, (i) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이옴팔라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; (ii) LC/MS로 측정시 약 630-660 및 약 970-1000의 분자량을 가지는, 2종 이상의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물;
- [0022] 중 적어도 하나를, 방제가 필요한 장소에 도입하여, 1종 이상의 연체 동물을 방제하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방제는, 일 구현예에서, 연체 동물에 전술한 화합물을 접촉시키는 것을 포함하는, 1종 이상의 연체 동물에 사멸을 유도함으로써 달성할 수 있다. 연체 동물을 수계(body of water) 또는 고체 표면과 접촉시킬 수 있다. 마찬가지로, 본 발명은 한 장소에서 복족강 및/또는 이매패강 등의 연체 동물을 방제하는데 사용하기 위한 조성물의 제형화에 있어서의, 상기 화합물, 현탁물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0023] 이와 관련하여, 본 발명은, 또한, 1종 이상의 연체 동물, 구체적으로 홍합 및/또는 달팽이(예, 화이트 가든 달팽이 및/또는 브라운 가든 달팽이, 수생 달팽이) 및/또는 민달팽이를, 방제가 필요한 장소에서 방제하기 위한, 및/또는 상기 장소에서 1종 이상의 연체 동물, 구체적으로 홍합 및/또는 달팽이(예, 화이트 가든 달팽이 및/또는 브라운 가든 달팽이, 수생 달팽이) 및/또는 민달팽이의 사멸을 유도하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 이 조성물은, 락톤, 락탐, 카바메이트, 카르복시산 및/또는 아미드 화합물이나, 단 감마-옥타락톤, 감마-노나락톤, 감마-데카노락톤, 감마-운데카락톤, N-사이클헥틸신남아미드, N-(트랜스-신나모일)피롤리딘, N-(트랜스-신나모일)피페리딘, N-(트랜스-신나모일)헥사메틸렌아민, 4-하이드록시도데카논산 및 도데카논산은 아닌, 1종 이상의 화합물을 포함하며, 상기 조성물은 단 슈도모나스 배양물, 추출물 또는 현탁물이 아니다.
- [0024] 특정 구현예에서, 본 발명은, (a) 에르위니아 sp. 세포 유래의 세포 현탁물 또는 추출물을 준비하는 단계, 및 (b) 상기 현탁물 또는 추출물을 연체 동물의 방제에 유효한 양으로 방제가 필요한 장소에 도입하는 단계를 포함하는, 1종 이상의 연체 동물, 구체적으로 홍합 및/또는 달팽이(예, 화이트 가든 달팽이 및/또는 브라운 가든 달팽이, 수생 달팽이) 및/또는 민달팽이의 방제 방법에 관한 것이다.
- [0025] 에르위니아 추출물은 락톤 및 아미드와 같은 전술한 활성 성분을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 에르위니아 sp. 세포 유래의 세포 현탁물 또는 추출물은, 하나 이상의 연체 동물, 특히 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이옴팔라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물의 방제용 조성물로 제형화할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은, 하나 이상의 연체 동물, 특히 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이옴팔라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물의 방제에 유효한, 1종 이상의 물질과, 선택적으로 1종 이상의 연체 동물 방제에 사용하기 바람직한 불활성 물질을 포함하는, 조성물에 관한 것이다. 아울러, 본 발명은, 하나 이상의 연체 동물, 특히 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이옴팔라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물의 방제용 조성물의 제형화에 사용하기 위한, 본 발명의 이러한 물질, 다른 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기 물질은, 염소나, 또는 슈도모나스 sp., 더 바람직하게는 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*) 또는 다른

예로 슈도모나스 ATCC 55799의 식별 특징을 가진 유기체(예, 슈도모나스 균주)로부터 유래될 수 있다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은, 슈도모나스 sp.(슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*))로부터 유래된 세포 현탁물인 물질을 포함할 수 있으며, 보다 구체적인 구현예에서, 상기 세포 현탁물은 슈도모나스 ATCC 55799의 독소 생산 특징을 가지고 있는 세포를 포함할 수 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 조성물내 물질은 슈도모나스 sp.로부터 분리 또는 유래되거나, 또는 다른 예로 슈도모나스 ATCC 55799의 식별 특징을 가지고 있는 유기체로부터 유래된, 하나 이상의 독소일 수 있다. 조성물은, 다른 예로, 전술한 본 발명의 방법에 사용되는 화합물 뿐만 아니라 전술한 본 발명의 화합물을 포함할 수 있으며, 복족강 및 이매패강에 속하는 동물의 방제에 사용할 수 있다. 상기 불활성 물질은 점토 물질(카올리나이트, 녹점토, 애터필자이트)일 수 있다. 본 발명은, 또한, 연체 동물의 방제에 유효한 물질과, 선택적으로 1종 이상의 불활성 물질을, 상기 연체 동물의 방제에 유효한 양으로, 상기 연체 동물이 포함되어 있는 장소에 도입하는 단계를 포함하는, 방제가 필요한 장소에서 1종 이상의 연체 동물, 특히, 홍합 및/또는 달팽이(예, 화이트 가든 달팽이 및/또는 브라운 가든 달팽이, 수생 달팽이) 및/또는 민달팽이를 방제하는 방법에 관한 것이다. 특히, 상기 연체 동물의 방제용 물질은 무처리 대조군에 비해 약 20% 이상의 치사율, 통상 약 50-95%의 치사율을 발생시키는 유효량으로 제공되며, 상기 불활성 물질은 상기 연체 동물의 방제용 물질의 치사율을 약 20% 이상, 통상 25-40%로 높이는데 충분하거나 유효한 양으로 제공된다. 특정 구현예에서, 불활성 물질은, 상기 연체 동물의 방제용 물질을 도입하기 전에 상기 장소에 도입되거나; 보다 구체적인 구현예에서, 상기 불활성 물질은 상기 물질을 도입하기 전 약 1시간 이상 전에 도입된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 불활성 물질은 전술한 연체 동물, 특히 홍합, 달팽이 및/또는 민달팽이 방제용 물질과 동시에 상기 장소에 도입된다.

[0027] 이와 관련된 측면으로, 본 발명은, 방제가 필요한 장소에서, 하나 이상의 연체 동물, 특히 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물 방제용 물질 1종 이상의 효능을 높이기 위한, 불활성 물질의 용도에 관한 것이다. 상기 장소는, 액체(예, 수계(body of water) 또는 페인트), 예컨대 플라스틱, 콘크리트, 목재, 유리 섬유, 철로 제조된 파이프, 폴리비닐 클로라이드로 제조된 파이프, 코팅 물질로 피복된 표면 및/또는 페인트로 피복된 표면일 수 있다. 특히, 본 발명은, 방제가 필요한 장소에, 1종 이상의 불활성 물질을, 상기 장소에 도입하였을 때 상기 방제용 물질의 효능을 증가시키는데 유효한 양으로, 도입하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 연체 동물, 특히 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물의 방제용 물질 1종 이상의 효능을 높이는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 이러한 불활성 물질은 상기 방제용 물질의 효능을 적어도 약 20% 이상 증가시킨다.

[0028] 나아가, 본 발명은, 페인트 담체내에 본 발명의 조성물 및 화합물을 항-생장성(antivegative) 및 살상성(biocidal) 유효량으로 포함하는, 오손 방지 페인트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 오손 방지 페인트의 제형화에 있어서의 본 발명의 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a 및 1b는 본 발명의 방법에서 사용되는 천연 산물의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 활성 분획의 분리 방법을 나타낸 것이다.

도 3은 슈도모나스 세포 배양물로부터 본 발명의 화합물을 수득하기 위한 정제 공정을 나타낸 하나의 개략도이다.

도 4는 바이오박스 안에서 점토 및 슈도모나스 플루오레스센스 천연 살충제(biopesticide) 산물 처리시, 홍합의 경시적인 치사 경과 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

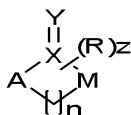
- [0030] 수치 범위가 제공되는 경우, 문맥상 명확하게 달리 지시하고 있지 않은 한, 하한의 10 단위로(to the tenth of the unit), 그 범위의 상한 및 하한 사이의 각 사이 값(each intervening value)과, 상기 명시된 범위 내에서, 언급된 다른 임의의 명시된 값 또는 임의의 다른 사이 값은 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다. 명시된 범위에서 특별히 배제된 제한에 따라, 이러한 작은 범위의 상한 및 하한은 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있다. 명시된 범위에 한가지 제한 또는 양자 제한이 포함된 경우, 포함된 제한의 둘 중 어느 하나를 배제하는 범위 또한 본 발명에 포함된다.
- [0031] 다르게 언급된 경우를 제외하고는, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명에 속하는 기술 분야의 당업자라면 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술된 바와 유사하거나 동급의 임의의 방법 및 물질들이 본 발명의 실시나 실험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법과 물질들에 대해서 이제 설명한다.
- [0032] 본 명세서와 첨부된 청구항에서와 같이, 단수형 ("a," "and" 및 "the")은 문맥에서 명확하게 다르게 언급되어 있지 않다면 복수의 언급도 포함하는 것임을 유념하여야 한다.
- [0033] 본원에서, "혼합 방제"는, 주어진 장소에서 집락을 형성할 수 없도록 사멸시키거나 약화시킴으로써, 혼합의 알, 유충, 벨리저(veliger) 및 벨리저 이후 단계를 방제하는 것을 의미한다.
- [0034] 본원에서, "유래된"은 특정 소스로부터의 직접 분리 또는 수득, 또는 다른 예로 특정 소스로부터 분리 또는 수득되는 물질이나 유기체의 특정 식별을 의미한다.
- [0035] 이하에서 기술된 바와 같이, 용어 "알킬"은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는 포화된 탄화수소 라디칼(예, 에틸, 이소프로필, t-아밀 또는 2,5-디메틸헥실 등)을 지칭한다. 이 정의는, 이 용어를 단독으로 사용되는 경우와 화합물 명칭의 일부로서 사용되는 경우 둘다에 적용된다.
- [0036] 용어 "사이클로알킬" 및 "사이클로알케닐"은 포화된 탄화수소 고리를 지칭하며, 이환식 및 다환식 고리를 포함한다. 마찬가지로, 이종원자(예, N, O, 또는 S)를 탄소 고리 원자 대신 가지고 있는 사이클로알킬 및 사이클로알케닐기는 각각 "헤테로사이클로알킬", "헤테로사이클릴" 및 "헤테로사이클로알킬렌"으로 지칭할 수 있다.
- [0037] 용어 "알케닐"은 본원에서 이중 결합인 2곳 이상의 불포화된 부분을 포함하는 전술한 알킬기를 지칭한다. 마찬가지로, 용어 "알킬닐"은 본원에서 삼중 결합인 2곳 이상의 불포화된 부분을 포함하는 전술한 알킬기를 지칭한다.
- [0038] 용어 "알콕시"는 다른 탄화수소 라디칼에 공유 결합할 수 있는 산소 치환기도 가지고 있는 전술한 알킬 라디칼을 지칭한다(예, 메톡시, 에톡시, 아릴옥시 및 t-부톡시).
- [0039] 용어 "아릴"은 메틸렌 또는 메틸렌 모이어티 등의 공통 기(common group)에 공유 결합 또는 결합되어, 함께 융합되어 있는, 단일 고리 또는 다중 고리일 수 있는 방향족 카보사이클릭 치환기를 지칭한다. 마찬가지로, 탄소 고리 원자 대신 이종원자(예, N, O 또는 S)를 가지고 있는 아릴기는 "헤테로아릴"로 지칭한다.
- [0040] 용어 "아릴알킬", "아릴알케닐" 및 "아릴옥시알킬"은 아릴 라디칼이 알킬기, 알케닐기 또는 알킬기에 부착된 산소 원자에 각각 직접 부착된 것을 지칭한다. 간략하게, 전술한 조합된 용어의 일부로서의 아릴은 물론 헤테로아릴을 포함함을 의미한다.
- [0041] "헤테로원자-함유성 알킬기"(즉, "헤테로알킬" 기) 또는 "헤테로원자-함유성 아릴기"(즉, "헤테로아릴" 기)에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로"는 탄소 원자 1개 이상이 탄소가 아닌 원자, 예컨대 질소, 산소, 황, 인 또는 실리콘으로 치환된, 분자, 연결 또는 치환을 지칭한다.
- [0042] 본원에서 명시된 바와 같이, "유래된" 및 "수득가능한"은 특정 소스로부터 직접 분리되거나 수득되는 것을 의미하며, 또는 다른 예로 특정 소스로부터 분리 또는 수득되는 물질 또는 유기체의 식별 특징을 가지는 것을 의미한다. 이러한 용어들은 명세서 전반에 걸쳐 상호 호환적으로 사용된다.
- [0043] 본원에서, "분리된 화합물"은, 비제한적인 예로서, 크로마토그래피 방법, 전기영동 방법 등의, 분석 방법에 의해 결정되는 바와 같이, 다른 화합물 또는 물질이 본질적으로 없는, 예컨대 약 20% 이상의 순도, 바람직하게는 약 40% 이상의 순도, 더 바람직하게는 약 60% 이상의 순도, 보다 더 바람직하게는 약 80% 이상의 순도, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 순도로, 보다 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 순도이다.

[0044] **화합물들**

[0045] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되는 화합물들은 아래 3가지 유형에 속하는 구성원일 수 있다.

[0046] *I형 화합물*

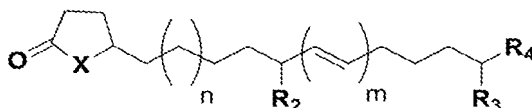
[0047] 특정 구현예에서, I형은 아래 화학 구조를 포함한다:



[0048]

[0049] 상기 X는 비제한적인 예로 탄소, 황, 인이고, Y는 비제한적인 예로 황, 산소이고, A와 M은 비제한적으로 탄소, 산소, 질소, 황이고, n은 1-21이다. (R)z는 (R)z는 고리내 R 기에서의 치환기의 수 z를 표시한다. R과 R 상의 치환기는 수소, 하이드록실, 알킬 하이드록실, 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 방향족, 아릴 기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기 또는 임의의 그외 치환된 기일 수 있다. 치환된 R 쇠들 중 하나의 길이는 1 내지 25개의 원자일 수 있으며, 바람직한 길이는 7 내지 17개의 원자일 것이며, Z는 n+2인 한 0, 1, 2, 3 일 수 있으며, 바람직하게는 Z는 0, 1, 2, 3이다.

[0050] 특정 구현예에서, 화합물은 슈도모나스 플루오레센스로부터 유래될 수 있으며, 5원 감마-락톤인 락톤 모이어티 하나 이상, 하나 이상의 불포화 모이어티 및 하나 이상의 알코올 기; 약 285 내지 약 310인 코어 구조의 분자량; 15개 이상의 탄소 원자와 3개 이상의 산소를 포함하는, 하이드록실화된 불포화 지방산 락톤 구조를 가진다. 보다 구체적인 구현예에서, 이 화합물은 아래 구조를 가질 수 있다:



[0051]

[0052] 상기 구조식에서, X는 각각 독립적으로 --O, --NR₁, 또는 --S이고, R₁은 --H 또는 C₁-C₆ 알킬이고; n은 0 - 15이고, R₂ 내지 R₄는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 치환된 헤테로사이클릭, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카바메이트, 설포닐, 설포나미드 또는 설포릴이고; m = 이중 결합 또는 삼중 결합이다. 또 다른 특정 구현예에서, Y와 M은 산소이고, A와 X는 탄소이고, n은 2 또는 3이고, R은 C7 또는 C8 알킬이고, z는 0이며, n이 2이고 R이 C7 알킬이면 R은 A에 부착된다.

[0053] 보다 더 구체적인 구현예에서, I형 화합물은 **1 - 28** (도 1a 및 1b)로 표시된 화합물일 수 있다. 이들 화합물들은 천연 물질 유래이거나 또는 상업적인 소스로부터 수득되거나 또는 화학 합성에 의해 수득되는 화합물이다. I형 화합물의 천연 소스는, 식물, 산호, 미생물, 해면 동물 및 동물이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적인 구현예에서, I형 화합물을 포함하고 있는 식물로는 미오포럼 본티오데스(*Myoporum bontioides*)(화합물 **14**) [Moe Kanemoto, et al., Chlorine-containing iridoid and iridoid glucoside, and other glucosides from leaves of *Myoporum bontioides*, *Phytochemistry* 69 (2008) 2517-2522], 마이크로멜룸 히르서툼(*Micromelum hirsutum*)(화합물 **18**) [Ma, G.Y. et al. anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*, *Planta Med.* 2005, 71, 261-267]와 같은 종이 있으나 이로 한정되지 않으며, 또는 다른 예로, 다른 예로 I형 화합물은 상기 종들로부터 유래될 수 있으며, 또는, I형 화합물은, 안트로디아 캄포레이트(*Antrodia camphorate*)(화합물 **4, 5**) [Shao, Y.Y. et al., Chemical constituents of *Antrodia camphorata* submerged whole broth, *Natural Product Research*, 2008, 22 (13) 1151-1157], 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)(화합물 **2**) [Gocho, S. et al. Biotransformation of oleic acid to optically active γ -dodecalactone, *Biosci. Biotech. Biochem.* 1995, 59 (8) 1571-1572], 메소리조븀(*Mesorhizobium*) sp. (화합물 **2, 17**) [Wei, G.H. et al., Rhizobialide: A New Stearolactone Produced by *Mesorhizobium* sp. CCNWGX022, a Rhizobial Endophyte from *Glycyrrhiza uralensis*, *Chemistry and Biodiversity*, 2007, 4, 893-898], 오피오스토마 필리페룸(*Ophiostoma piliferum*)(화합물 16), [Wei, G.H. et al., Rhizobialide: A New Stearolactone Produced by *Mesorhizobium* sp. CCNWGX022, a Rhizobial Endophyte

from *Glycyrrhiza uralensis*, Chemistry and Biodiversity, 2007, 4, 893-898], 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) sp. (화합물 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 and γ -Butyrolactones from a Marine-derived *Streptomyces* sp. J. Antibiot. 61(12): 736-746, 2008], 마크로포미나 파세올즈나(*Macrophomina phaseolizna*) (화합물 9, 10 & 15) [Shashib, Mahat et al., structure and stereochemistry of phaseolinic acid: a new acid from *Macrophomina phaseolizna*, Journal of Natural products, 1987, 50 (2) 245-247], 스포리디오볼루스 살모니콜러(*Sporidiobolus salmonicolor*) (화합물 1, 3) [Laurent Dufosse, et al., Chirality of the γ -Lactones Produced by *Sporidiobolus salmonicolor* Grown in Two Different Media, Chirality, 1997, 667-671] 및 스트렙토마이세스 (화합물 7) [Shohei Sakuda, et al., Biosynthetic Studies on *Virginiae* Butanolide A, a Butyrolactone Autoregulator from *Streptomyces*. Part 2, Preparation of Possible Biosynthetic Intermediates and Conversion Experiments in a Cell-free System. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1993, 2309-2315] 등의 미생물로부터 유래될 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0054] 추가적인 특정 구현예에서, I형 화합물들은, 할리클로나 n. sp.(*Haliclona* n. sp) (화합물 26, 27 & 28) [Richard J. Clark, Mary J. Garson, and John N. A. Hooper, Antifungal alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge *Haliclona* n. sp. J. Nat. Prod. 2001, 64, 1568-1571], 액시넬라스(*Axinellas*) sp (화합물 25) [Miller, W. F. Tinto, J.-P. Yang, S. McLean and W. F. Reynolds, Axinellamide, a new alkaloid from the marine sponge *Axinellas* sp. Tetrahedron Lett., 1995, 36, 5851], 플라코르티스 니그라(*Plakortis nigra*) (화합물 19-20) [Joel S. Sandler, et al., Cytotoxic β -Carbolines and Cyclic Peroxides from the Palauan Sponge *Plakortis nigra*, J. Nat. Prod. 2002, 65, 1258-1261] 및 이르시니아 포모사나(*Ircinia formosana*) (화합물 21-24) [Shen, Y. C. et al., Novel linear C22-sesterterpenoids from sponge *Ircinia formosana*, Tetrahedron Letters 47 (2006) 4007-4010] 등의 해면 동물로부터 유래될 수 있다. 화합물 26-28은 카바메이트의 예들이다.

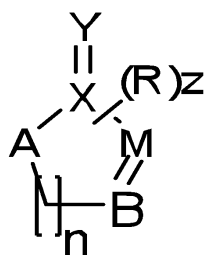
[0055] 다른 구체적인 구현예에서, I형 화합물은 사르코피톤 트로켈리오포룸(*Sarcophyton trocheliophorum*) 및 리소피톤 아르보레툼(*Lithophyton arboretum*)(화합물 11 & 13) [Tomas Rezanka, et al., γ -lactones from the soft corals *Sarcophyton trocheliophorum* and *Lithophyton arboretum*, Tetrahedron, 2001, 57, 8743-8749] 등의 산호로부터 유래될 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0056] 또 다른 구체적인 구현예에서, I형 화합물을 함유하는 곤충으로는, 비제한적인 예로서 암컷 일본 풍뎅이의 성페로몬(Female Japanese Beetle Sex Pheromone)(화합물 12) [J. H. Tumlinson, Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone Inhibition of Male Response by an Enantiomer, Science, 1977, 197, 789-792] 및 곤충의 독소(화합물 6) [John A. Findlay, et al., Insect toxins from spruce endophytes, Can. J. Chem. 2003, 81,284-292] 등의 곤충 유래될 수 있다.

[0057] 또한, I형 화합물은 실시예들에 기술된 감마-도데칼락톤, 델타-트리데카락톤, 필리페롤리드 A 및 알파-헵탈-감마-부티로락톤을 포함할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이들 화합물들은 당해 기술 분야에 공지된 공정을 이용한 합성 방법에 의해 또는 상업적인 소스로부터 수득할 수 있다.

[0058] II형 화합물

[0059] 다른 구체적인 구현예에서, II형 화합물은 아래 화학 구조를 가진다:



[0060]

[0061] 상기 식에서, X는 탄소이고; Y는 산소이고; A, B 및 M은 탄소, 산소, 질소, 황 또는 그외 원소이고, n은 1 내지 21이다.

[0062] (R)z는 고리내 R 기에서의 치환기의 수 z를 나타낸 것이다. R가 R 상의 치환기들은, 수소, 하이드록실, 알킬

하이드록실, 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기 또는 임의의 그외 치환된 기일 수 있다. 치환된 R 쇠들 중 하나의 길이는 1 내지 25개의 원자일 수 있으며, 바람직한 길이는 7 내지 17개의 원자일 것이며, Z는 n+2인 한 0, 1, 2, 3일 수 있으며, 바람직하게는 z는 0, 1, 2, 3이다.

[0063] 특정 구현예에서, **29** - **36** 및 **44** (도 1a 및 1b 참조)의 화합물 등의 II형 화합물들은, 천연 소스로부터 유래되거나, 화합물 합성 또는 상업적인 소스로부터 유래될 수 있다. II형 화합물의 천연 소스는, 식물, 산호, 미생물, 해면 동물 및 동물이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 구체적인 구현예에서, 이러한 식물의 예로는, 비제한적인 예로서, 헤테로플렉시스 미코세팔라(*Heteroplexis micocephala*)(화합물 **30**, **31**, **32** & **33**) [Fan, X.N., et al., Chemical Constituents of *Heteroplexis micocephala*. J. Nat. Prod. 2009, 72, 1184-1190], 이란테라(*Iryanthera*) sp.(화합물 **34**) [Vieira, P.C., et al., γ -Lactones from *Iryanthera* species, Phytochemistry, 1983, 22 (3) 711-713] 및 리트세 버티실라타(*Litsea verticillata*)(화합물 **44**) [Zhang, H. J. et al., sesquiterpenes and butenolides, natural anti-HIV constituents from *Litsea verticillata*, Planta Med, 2005, 71, 452-457] 등의 종들을 포함한다. 보다 구체적인 구현예로, II형 화합물을 포함하는 소스 미생물로서, 비제한적인 예로서, 스트렙토마이세스 리시리엔시스(*Streptomyces rishiriensis*) A-5969 (화합물 **29**) [Yumiko Itoh, Hiroshi Shimura, Mayumito, NaoHaru Watanabe, Michio Yamagishi, Masaharu Tamai and Kazunori Hanada, novel hepatoprotective 7-lactone, MH-031, Discovery, Isolation, Physical-Chemical properties and structural elucidation, The Journal of antibiotics, 1991, 44 (8) 832-837]와 같은 종들을 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, II형 화합물을 함유하는 산호로는, 비제한적인 예로서, 프테로고르지아 앤셉스(*Pterogorgia anceps*) (화합물 **35**) [Guo, Y. W. et al., Three New Butenolide Lipids from the Caribbean Gorgonian *Pterogorgia anceps*, J. Nat. Prod. 1999, 62, 1194-1196; Manuel Lorenzo et al., 13C NMR-Based Empirical Rules to Determine the Configuration of Fatty Acid Butanolides. Novel γ -Dilactones from *Pterogorgia* spp, Organic Letters, 8 (22) 5001-5004] 및 프테로고르지아 시트린(*Pterogorgia citrine*) (화합물 **36**) [Abimael D. Rodriguez et al., further butenolides from the Caribbean octocoral *Pterogorgia citrine*, Journal of Natural Products, 1994, 57(3) 339-347] 등의 종을 포함한다.

[0064] III형 화합물

[0065] 다른 특정 예에서, III형 화합물들은 하기 화학 구조를 가진다:



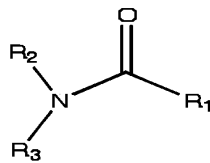
[0067] 상기 식에서, X는 탄소이고; Y는 산소이고; Z는 수소, 하이드록실, 알킬 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기, N,N-치환된 기 또는 임의의 그외 치환된 기이다.

[0068] 상기 식에서, R은 알케닐 하이드록실, 알키닐 하이드록실, 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기, N,N-치환된 기 또는 임의의 그외 치환된 기이다. R 쇠의 길이는 1-50개의 원자, 바람직하게는 7 내지 17개의 원자 길이일 수 있다.

[0069] 구체적인 구현예에서, **37** - **43** (도 1a 및 1b)의 화합물과 같은 III형 화합물들은, 천연 소스로부터 유래되거나, 화합물 합성 또는 상업적인 소스로부터 유래될 수 있다. III형 화합물의 천연 소스로는, 식물, 산호, 미생물, 해면 동물 및 동물이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적인 구현예에서, 이러한 식물로는, 페이퍼 spp(*Piper* spp) (화합물 **43**) [Likhitwitayawuid, K., Ruangrunsi, N, Lange, G and Decicco, C., Structural Elucidation and Synthesis of New Components isolated from *Piper Samentosum*, Tetrahedron 1987 (43) 3689-3694; Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K and Yoshimura, H. Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. IV. Isolation and Identification of Larvicidal Principles in Pepper Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1988(36):2452]가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적인 구현예에서, 산호는, 비제한적인 예로서, 플렉사우라 플라바(*Plexaura flava*) (화합물 **42**) [B. N. Ravi, et al., Lipid and Terpenoid Metabolites of the Gorgonian *Plexaura flava*, Aust. J. Chem., 1982, 35, 105-12]를 포함하며, 보다 구체적인 구현예에서, III형 화합물을 함유하는 미생물로는, 비제한적인 예로서, 링비야 마주스쿨라(*Lyngbya majuscula*) 및 스킴조트릭스 칼시콜라(*Schizothrix calcicola*) (화합물 **39**, **40**)

[George G. Harrigan, et al., Tumonoic Acids, Novel Metabolites from a Cyanobacterial Assemblage of *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix calcicola*, J. Nat. Prod. 1999, 62, 464-467], 슈도모나스 에어루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) (화합물 41) [Michael, K. Winson., et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 9427-9431], 에르위니아 카로토보라 (*Erwinia carotovora*) (화합물 37) [Gunter Brader, Solveig Sjoblom, Heidi Hyytia inen, Karen Sims-Huopaniemi, and E. Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an acylhomoserine Lactone Synthase in Bacterial Communication, The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11) 10403-10409] 및 포토박테리움 포스포레움(*Photobacterium phosphoreum*) (화합물 38) [L. R. Flodgaard, P. Dalgaard, J. B. Andersen, K. F. Nielsen, M. Givskov, and L. Gram, Nonbioluminescent Strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the Cell-to-Cell Communication Signal N-(3-하이드록시 옥타노일)homoserine Lactone, Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4), 2113-2120] 등의 종을 포함한다.

[0070] 또 다른 구체적인 구현예에서, III형 화합물은 하기 구조를 가지는 사멘틴 유사체일 수 있다:



[0071]

[0072] 상기 식에서, R₁은 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, 방향족, 아릴기, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이고, R₁ 쇠의 길이는 4-20개의 원자, 바람직하게는 6-12개의 원자 길이일 수 있다.

[0073] 상기 식에서, R₂ 및 R₃는 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 방향족, 아릴알킬, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이거나; 또는 다른 예로 R₂ + R₃ + N은 N-함유성 헤테로사이클릭 모이어티일 수 있으며,

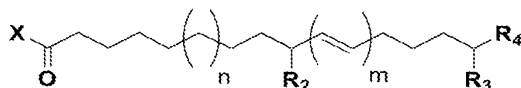
[0074] R₂ + R₃ + N가 N-함유성 헤테로사이클릭 모이어티인 경우, R₁은 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로사이클릴, NH-치환된 기 또는 N,N-치환된 기이다.

[0075] 가장 구체적인 구현예에서, 사멘틴 유사체는 N-사이클로펜틸테칸아미드, N-(테카노일)피롤리딘, N-(테카노일)피페리딘, N-(테카노일)헥사메틸렌아민, N-사이클로펜틸테센아미드, (N-(테세노일)피롤리딘, N-(테세노일)피페리딘, N-(테세노일)헥사메틸렌아민 및 N-(테세노일)피페리딘이다.

[0076] 사멘틴 유사체는 비제한적인 예로서 2009년 7월 21일자 미국 출원번호 61/227,412에 기술된 바를 포함할 수 있는 당해 기술 분야에 공지된 공정을 이용하여 수득할 수 있다.

[0077] 또 다른 구체적인 구현예에서, 화합물은, 슈도모나스 플루오레센스로부터 유래될 수 있으며, 하나 이상의 카르복시산 모이어티, 하나 이상의 불포화된 모이어티 및 하나 이상의 알코올기를 포함하는 하이드록실화된 불포화된 지방산 구조를 가지며; 코어 구조의 분자량이 285 - 약 310이고, 15개 이상의 탄소와 3개 이상의 산소를 가지는 것으로 특정화할 수 있다.

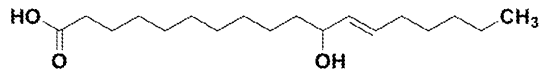
[0078] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에서, 하기 구조를 가지는 화합물을 제공한다:



[0079]

[0080] 상기 식에서, X는 각각 독립적으로 --OH, --NR₁, 또는 --S이고; R₁은 --H 또는 C₁-C₆ 알킬이고; n은 0 내지 15이고; R₂ 내지 R₄는 각각 독립적으로 --H, 알킬, 치환된 알킬, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 치환된 헤테로사이클릭, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 알콕시, 치환된 알콕시, 티오알킬, 치환된 티오알킬, 하이드록시, 할로젠, 아미노, 아미도, 카르복실, --C(O)H, 아실, 옥시아실, 카바메이트, 설포닐, 설포아미드, 또는 설퍼틸이고; m = 이중 결합 또는 삼중 결합이다.

[0081] 가장 구체적인 구현예에서, 이 화합물은 하기 구조를 가진다:



[0082]

[0083] 제조 방법

[0084] 전술한 바와 같이, 본 발명의 화합물과 조성물은, 슈도모나스 sp.의 식별 특징을 가지고 있는 유기체, 보다 구체적으로는 슈도모나스 플루오레센스 균주의 식별 특징을 가지고 있는 유기체, 또는 다른 예로, 미국 특허 6,194,194에 기술된 바와 같은 슈도모나스 플루오레센스 분리주 ATCC 55799의 식별 특징을 가지고 있는 유기체로부터 수득할 수 있거나, 수득가능하거나 또는 유래될 수 있다. 본 방법은 이들 유기체를 배양하는 단계와 이들 유기체의 세포로부터 이러한 화합물을 분리함으로써 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 수득하는 단계를 포함한다.

[0085] 구체적으로, 유기체는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 영양 배지에서 배양한다. 이 유기체는 교반 플라스크 배양, 소규모 또는 대규모 발효에 의해 실험실이나 산업적인 발효기에서 적정 배지 중의 세포 배양을 허용하는 조건 하에 배양할 수 있다. 배양은 당해 기술 분야에 공지된 공정을 이용하여, 탄소원, 질소원 및 무기염을 포함하는 적합한 영양 배지 중에서 이루어질 수 있다. 적합한 배지는 공개된 조성에 따라 제조하거나 또는 상업적인 소스로부터 이용가능하거나, 제조 또는 이용가능할 수 있다. 구체적인 구현예는 아래 실시예들과 미국 특허 6,194,194에 기술되어 있다.

[0086] 배양 후, 세포를 농축한 다음, 완충액에 현탁하여 세포 현탁물을 수득할 수 있다. 상기 현탁물로부터 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 추출할 수 있다. 추출은 크로마토그래피에 의해 분류할 수 있다. 크로마토그래피를 연체 동물, 예컨대 홍합, 달팽이(예, 수생 달팽이 및/또는 가든 달팽이) 및/또는 민달팽이에 대한 독성 활성을 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 분석할 수 있으며; 구체적인 일 구현예는 하기 실시예들에 기술되어 있다. 이러한 공정은 동일하거나 상이한 크로마토그래피 방법을 이용하여 1회 이상 반복할 수 있다.

[0087] 본 발명의 화합물은 또한 합성 방법에 의해 수득할 수도 있다. 다른 예로, 펩타이드 화합물의 경우, 이 화합물은 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 재조합 DNA 숙주에서 이들 화합물들을 코딩하는 핵산 서열을 발현시켜 수득할 수 있다.

[0088] 제형화

[0089] 본 발명의 조성물은 연체 동물, 구체적으로 복족강 및/또는 이매패강에 속하는 동물, 보다 구체적으로는, 홍합, 달팽이 및 민달팽이를 방제하는데 사용가능한, 화학제 또는 천연 살충제 제품을 포함할 수 있다. 본 발명은, (a) 슈도모나스 sp. 보다 구체적으로 슈도모나스 플루오레센스와 같이 미생물, 또는 다른 예로 슈도모나스 ATCC 55799의 식별 특징을 가지는 유기체로부터 수득가능하거나 유래되며; (b) 이매패강, 특히 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테마(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이로 이루어진 군으로부터 선택되는, 연체 동물의 클래스에 속하는 동물에 독성을 나타내며; (c) 액체 크로마토그래피/질량 분광분석(LC/MS)에 의해 결정지 약 540-550 및 약 1280-1335로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자량을 가지는, 분리된 화합물에 관한 것이다. 이 화합물은, 연체 동물, 특히 복족강 및/또는 이매패강의 일원, 보다 구체적으로 홍합, 달팽이 및 민달팽이를 방제하기 위해 사용될 수 있는 조성물로 제형화할 수 있다.

[0090] 그 예로는, 미국 특허 6,194,194에 예시된 바와 같이 슈도모나스 sp.로부터 유래된 물질 및 염소가 있으나, 이로 한정되지 않는다. 아울러, 본 발명에 사용되는 전술한 화합물을 조성물(또한, 다른 예로 "제형화"로 언급됨)로 만들 수 있으며, 임의의 형태로 제형화할 수 있다. 제형의 예로는, 비제한적인 예로, 유제화가능한 농축물(EC: emulsifiable concentrate), 수화성 분말(WP: wettable powder), 가용성 액체(SL), 에어로졸, 최소-용적의 농축 용액(ULV: ultra-low volume concentrate solution), 가용성 분말(SP), 마이크로캡슐제(microencapsulation), 수 분산성 과립제, 유동제(flowable), 마이크로에멀전(ME), 나노-에멀전(NE) 등이 있다. 본원에 기술된 임의의 제형에서, 활성 성분의 비율은 0.01% - 99.99%의 범위이다. 구체적인 구현예에서, 제형에는 계면활성제가 함유되지 않을 수 있다.

- [0091] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 불활성 물질의 예로는, 카올린, 미카, 석고, 엽상 규산염(phyllsilicate), 카보네이트, 셀페이트 또는 포스페이트 등의 무기 미네랄; 또는 목재 제품, 코르크, 통옥수수(corn cob) 분말, 왕겨(rice hull), 땅콩 껍질 및 호두 외피 등의 식물성 물질이 있으나, 이로 한정되지 않는다. 구체적인 구현예에서, 불활성 물질은, 약 1 내지 20 NTU(표준화된 탁도 단위)에 해당되는 약 1 내지 20 mg/L 비율로 물에 현탁한 점토 미네랄(카올리나이트, 녹점토, 애터필라이트)로부터 수득하거나 또는 유래될 수 있다. 홍합 사이펀 흡입(mussel siphoning)을 강화하기 위해 사용되는 불활성 물질은, 고형 형태로 또는 수용액, 바람직하게는 물에서의 현탁물로서, 홍합에 대하 처리가 이루어지는 장소(예, 고형 표면)나 물에 직접 적용할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 제품의 효능을 강화하기 위해, 점토, 실트, 침전물 또는 영양가는 없지만 충분히 작은 입자 크기를 가진 임의의 다른 물질과 같은 불활성 물질은, 화학제 또는 천연 살충제 제품의 처리 전에, 물에 현탁할 수 있다.
- [0092] **이용 방법**
- [0093] 본 발명의 화합물 및 조성물은, 연체 동물, 구체적으로 복족강 및/또는 이매패강에 속하는 동물, 보다 구체적으로 홍합(예, 드라이사나(*Dreissana*) sp.) 및/또는 복족강, 특히 비제한적으로, 수생 달팽이(예, 바이오파라리아(*Biomphalaria*) sp.)와 비제한적인 예로서 브라운 가든 달팽이, 화이트 가든 달팽이(예, 칸타레우스(*Cantareus*) sp., 코르누(*Cornu*) sp., 테바(*Theba*) sp.)를 비롯한 가든 달팽이 등의 달팽이, 및/또는 비제한적인 예로서 그레이 가든 민달팽이(예, 데로세라스(*Deroceras*) sp.), 띠무늬 또는 3줄 무늬 민달팽이(예, 레만니아(*Lehmannia*) sp.), 황갈색 민달팽이(예, 리마쿠스(*Limacus*) sp.) 및 온실 민달팽이(예, 밀락스(*Milax*) sp.) 등의 민달팽이를, 방제하기 위해, 수계(a body of water)나, 홍합, 달팽이 및/또는 민달팽이와 같은 연체 동물이 모여있는 표면 또는 다른 예로 페인트의 오손 방지제에 사용할 수 있다. 페인트에 오손 방지제로서 사용하는 경우, 이는 항-생장성의 살상 측면에서 유효한 양으로 제공된다. 홍합, 달팽이 및/또는 민달팽이 등의 연체 동물이 존재하는 표면은, 플라스틱, 콘크리트, 목재, 유리 섬유, 철로 제조된 파이프, 폴리비닐 클로라이드로 제조된 파이프 및 페인트 및/또는 코팅제로 피복된 표면을 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 코팅제는 안료, 결합제, 첨가제 및/또는 담체 유체(carrier fluid)로부터 제형화될 수 있으며, 바람직하게는 표면을 보호하거나 장식을 가미하기 위해 얇은 필름으로 적용된다. (활성 성분을 포함하는) 최종 제품은 10-200 mg/L, 보다 구체적으로는 25-100 mg/L (ppm) 또는 25-10000 mg/kg으로 사용될 것이다. 이는 건조 제품으로서 또는 물에 현탁된 형태로, 파이프, 댐 구조물, 홀딩 탱크, 및 개울, 강, 호수, 용수로(irrigation canal), 연못과 같이 개방된 수계에 특수 응용 펌프 및 혼합 시스템을 통해 적용될 것이다.
- [0094] 특정 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 침입성 연체 동물, 특히 홍합의 방제용 천연 살충 활성 및 살충 활성을 향상시키는 방법에 관한 것이다:
- [0095] 1. 화학제 또는 천연 살충제의 처리 수행 전 1-24시간 동안 사이펀 활성을 촉발시키기 위해 점토와 같은 불활성 물질을 물에 현탁하는 단계;
- [0096] 2. 화학제 또는 천연 살충제를 물에 바람직한 농도로 첨가하는 단계.
- [0097] 또한, 본 발명은 미생물 천연 살충제를 점토와 같은 불활성 물질과 조합 투여하여, 흡수, 즉 홍합의 치사율을 높이는 방법에 관한 것이다.
- [0098] 홍합의 사이펀 흡수를 활성화하기 위해, 이러한 점토(탁도) 처리는 약 1-6시간, 통상 약 3-4시간 동안, 그리고 화학제/살충제 처리 전 약 1-24시간, 통상 약 14-18시간 동안 수행되어야 한다. 다른 예로, 혼탁 처리는 화학제 또는 천연 살충제 처리와 동시에 적용할 수도 있다.
- [0099] 본 발명의 일 구현예에서, 홍합, 달팽이 및 민달팽이와 같은 연체 동물의 처리는 500 ml의 유리병 또는 아크릴 판으로 구성된 바이오박스 안에서 수행할 수 있다. 유리병에서, 처리하는 동안의 통기는 나일론 튜브에 연결된 수족관 에어 스톤(air stone)을 통한 기류에 의해 제공된다. 바이오박스의 경우, 물은 1분 당 1 갤런의 속도로 일정하게 흐른다.
- [0100] 혼탁 처리용 물질 뿐만 아니라 화학제/천연 살충제 제품용 물질은 파이프팅 또는 연동 펌프에 의해 수중에서 혼합할 수 있다. 바이오박스의 경우, 주입 부위에 패들 믹스를 이용하여 보다 균일한 혼합을 달성한다. 본 발명의 조성물은, 적용하기 전에 적량의 물 또는 그외 희석제를 사용하여 희석이 필요한, 농축물 또는 일차 조성물로서, 또는 직접 적용하기 위한 적합한 형태를 취할 수 있다.
- [0101] 혼탁 물질의 유효량은 어플리케이션, 물에 적용하는 경우 수온, 및 처리 기간에 따라 결정될 것이다. 일반적인

로, 조성물은, 측정되는 혼탁도가 20 NTU를 초과하지 않도록, 약 1 내지 약 20 mg/L의 비율로, 바람직하게는 약 5 내지 약 10 mg/L의 비율로 적용될 수 있다.

[0102] 실시예

[0103] 아래 실시예는 바람직한 구현예들과 본 발명의 활용성을 설명하기 위한 것이며, 본원에 첨부된 청구항에 언급되어 있지 않은 한 본 발명을 제한하는 의도는 아니다.

[0104] 실시예 1: 연체 동물 살상 실험

[0105] 재료 및 방법

[0106] 1. 24시간 동안 소형 페트리 디쉬에 쿠아가 홍합을 적응시킨다.

[0107] o 홍합의 생존 여부를 확인하기 위해 홍합을 페트리 디쉬에 붓는다. 죽고 빈 홍합은 뺀다.

[0108] o 살아있는/건강한 홍합 10개를 센다.

[0109] o 각 소형 페트리 디쉬에 경수와 함께 10개의 살아있는/건강한 홍합을 넣는다.

[0110] o 별개의 홍합 플레이트를 보관한다. 이는 다른 실험 플레이트에서 24시간 후 죽거나 빈 홍합을 대체하기 위해 사용할 "여분의 홍합"이다.

[0111] o 물 부피가 적기 때문에 통기는 필요하지 않다(DO가 높음).

[0112] 2. 홍합 처리 2일:

[0113] o 홍합을 체크한다(홍합 체크시 항상 고무 채집기(rubber policemen)를 사용한다. 핀셋은 죽은 홍합의 제거시에만 사용한다).

[0114] o 소형 페트리 디쉬 당 살아있는/건강한 홍합이 10개가 맞는지를 센다.

[0115] o 샘플을 준비한다.

[0116] o 각 샘플은 50 ml 팔콘 튜브에서 경수로 적절하게 희석한다. 처리하기 전에 볼텍스 혼합한다.

[0117] o EX: 70 ppm, 2 reps/샘플. 팔콘 튜브에 경수 34 ml을 넣는다. 동일 팔콘 튜브에 샘플 51 μ l를 넣는다. 처리 전에 볼텍스 혼합한다.

[0118] 3. 처리(Dosing):

[0119] o 샘플을 처리 전에 볼텍스 혼합한다.

[0120] o 25 ml의 혈청 파이펫을 이용하여, 상하로 파이펫팅하여 혼합한다. 혼합물 15 ml을 각 소형 페트리 디쉬에 파이펫으로 넣는다.

[0121] o 홍합을 24시간 동안 방해하지 않고 그대로 둔다. 시간과 날짜를 기록한다.

[0122] 4. 처리 24시간 후:

[0123] o 처리한지 24시간 후, 처리수를 제거하고, 홍합의 치사율을 체크한다.

[0124] o 처리수를 버린다. 각 소형 페트리 디쉬를 깨끗한 경수로 3번 행군 다음 물을 첨가한다.

[0125] o 모든 페트리 디쉬에 대해 이 공정을 반복한다.

[0126] o 모든 페트리 디쉬들을 실험하기 전에 자동멸균해야 한다. 자동멸균 후, 용기는 물로 행군다.

[0127] 5. 치사율 계산

[0128] o 치사율 (%) = $100 * (\text{처리군의 사멸 홍합의 총 수} - \text{무처리군의 사멸 홍합의 총수}) / \text{총 처리 홍합 수}$

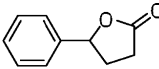
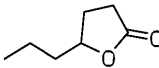
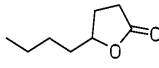
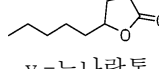
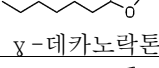
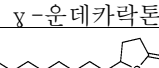
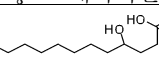
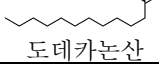
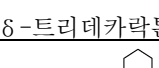
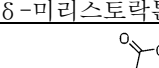
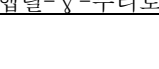
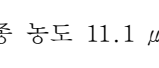
[0129] 시판 화합물을 이용한 실험

[0130] 시그마-알드리치사로부터 구입한 시판 화합물을 최종 농도 11.1 μ g/ml의 농도에서 실험하였다. 결과는 표 1에 나타낸다.

표 1

시판 화합물의 혼합 치사 효과

[0131]

번호	구조	농도 [μg/ml]	24 hr	48 hr	72 hr	96hr
SAR-013	 γ-페닐-γ-부티로락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-011	 γ-헵타락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-010	 γ-옥타락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-008	 γ-노나락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-014	 γ-데카노락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-009	 γ-운데카락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-001	 γ-도데카락톤	11.1	86.7±5.8	96.7±5.8	96.7±5.8	96.7±5.8
SAR-006	 4-하이드록시도데카논산	11.1	0	0	0	0
SAR-005	 도데카논산	11.1	0	0	0	0
SAR-003	 δ-트리데카락톤	11.1	3.3±5.7	10 ± 10	10 ± 10	10 ± 10
SAR-004	 δ-미리스토락톤	11.1	0	0	0	0
SAR-002	 α-헵틸-γ-부티로락톤	11.1	30± 10	66.7±15.3	73.3± 11.5	76.7 ±15.3

[0132]

합성 화합물

[0133]

합성한 화합물을 최종 농도 11.1 μg/ml로 쿠아가 혼합에 대해 스크리닝하였다. 아래 공정을 이용하여 화합물을 수득하였다.

[0134]

아미드의 합성: 디클로로메탄(20 ml) 중의 빙냉한 카르복시산(3 mmole) 용액에, 1-에틸-3-(3'-디메틸아미노프로필)카보디이미드(3.3 mmole) 및 4-디메틸아미노피리딘(3 mmole)을 순차적으로 첨가하였다. 5분 후, 반응 용액에 아민(3.3 mmole)을 첨가하였다. 반응물을 서서히 실온으로 승온시키고, 밤새 지속한다. 반응물을 에틸 아세테이트(200 mL)로 추출한다. 유기상을 무수 소듐 설페이트로 건조시킨다. 진공 하에 증발시킨 후, 잔류물을 실리카겔 컬럼을 통해 헥산 중의 적정 비율의 에틸 아세테이트를 사용하여 전개시킨다. 최종 산물의 수율은 85% 내지 90%이다. 최종 산물을 프로톤 NMR로 특정화한다.

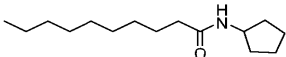
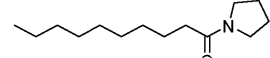
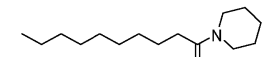
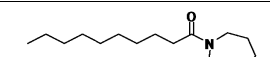
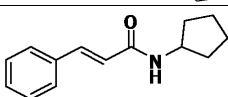
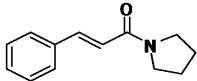
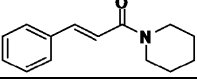
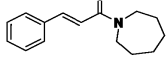
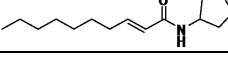
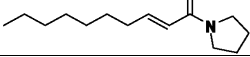
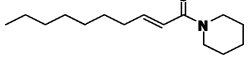
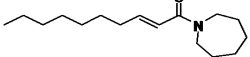
[0135]

N-사이클로펜틸신남아미드(SAR-023): ¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7.62 (d, J=15.6 Hz, 1H), 7.50 (d, J=7.0 Hz, 2H), 7.35 (m, 3H), 6.37 (d, J=15.6, 1H), 5.61 (d, J= 5.0, Hz, 1H, NH), 4.35 (sextet, J=7.0 , 1H), 2.06 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.46 (m, 2H).

- [0136] N-(트랜스-신나모일)피롤리딘 (SAR-024): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 7.70 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=7.0$ Hz, 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 (quintet, $J=7.0$, 2H), 1.91 (quintet, $J=7.0$, 2H).
- [0137] N-(트랜스-신나모일)피페리딘 (SAR-025): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 7.64 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=7.2$ Hz, 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).
- [0138] N-(트랜스-신나모일)헥사메틸렌이민(SAR-026): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 7.70 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=7.6$ Hz, 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).
- [0139] N-사이클로펜틸데칸아미드 (SAR-020): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 5.35 (br, 1H), 4.22 (sextet, $J=7.00$, 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).
- [0140] N-(데카노일)피롤리딘 (SAR-007): ^1H 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(quintet, $J=6.80$, 2H), 1.84(quintet, $J=6.80$, 2H), 1.62(quintet, $J=7.20$, 2H), 1.25-1.30 (m, 12H), 0.87 (t, $J=7.20$, 3H).
- [0141] N-(데카노일)피페리딘 (SAR-021): ^1H 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).
- [0142] N-(데카노일)헥사메틸렌이민 (SAR-022): ^1H 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).
- [0143] N-사이클로펜틸데센아미드 (SAR-027): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 6.82 (dt, $J_1=15.20$, $J_2=7.20$, 1H), 5.71 (d, $J=15.20$, 1H), 5.33 (br, 1H), 4.27 (sextet, $J=7.00$, 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).
- [0144] N-(데세노일)피롤리딘 (SAR-030): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 6.90 (dt, $J_1=15.20$, $J_2=7.00$, 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 (quintet, $J=7.00$, 2H), 1.85 (quintet, $J=7.00$, 2H), 1.44 (m, 2H), 1.28 (m, 8H), 0.88 (t, $J=7.00$, 3H).
- [0145] N-(데세노일)피페리딘 (SAR-031): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 6.82 (dt, $J_1=15.20$, $J_2=7.00$, 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 (quintet, $J=5.60$, 2H), 1.56 (quintet, $J=5.60$, 4H), 1.44 (quintet, $J=7.00$, 2H), 1.28 (m, 8H), 0.88 (t, $J=7.00$, 3H).
- [0146] N-(데세노일)헥사메틸렌이민 (SAR-032): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 6.91 (dt, $J_1=15.20$, $J_2=7.00$, 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).
- [0147] N-(데세노일)피페리딘 (SAR-033): ^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 6.82 (dt, $J_1=15.20$, $J_2=7.00$, 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 (quintet, $J=5.60$, 2H), 1.56 (quintet, $J=5.60$, 4H), 1.44 (quintet, $J=7.00$, 2H), 1.28 (m, 8H), 0.88 (t, $J=7.00$, 3H).
- [0148] 그 결과는 표 2에 나타낸다.

[0149]

쿠아가 홍합에 대한 합성 아미드 화합물의 효능

번호	구조	농도 [$\mu\text{g/ml}$]	24 hr	48 hr	72 hr	96hr
SAR-020		11.1	75 $\pm$ 7	75 $\pm$ 7	75 $\pm$ 7	75 $\pm$ 7
SAR-007		11.1	35 $\pm$ 7	50 $\pm$ 14	55 $\pm$ 21	65 $\pm$ 21
SAR-021		11.1	55 $\pm$ 21	55 $\pm$ 21	60 $\pm$ 14	65 $\pm$ 7
SAR-022		11.1	35 $\pm$ 7	40 $\pm$ 14	40 $\pm$ 14	45 $\pm$ 21
SAR-023		11.1	0	0	0	0
SAR-024		11.1	0	0	0	0
SAR-025		11.1	0	0	0	0
SAR-026		11.1	0	0	0	0
SAR-027		11.1	85 $\pm$ 7	95 $\pm$ 7	95 $\pm$ 7	95 $\pm$ 7
SAR-031		11.1	20 $\pm$ 14	35 $\pm$ 35	35 $\pm$ 35	40 $\pm$ 28
SAR-032		11.1	45 $\pm$ 21	50 $\pm$ 14	80 $\pm$ 14	80 $\pm$ 14
SAR-033		11.1	70 $\pm$ 14	75 $\pm$ 21	75 $\pm$ 21	75 $\pm$ 21

[0150]

실시예 2. 에르위니아 추출물

[0151]

에르위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*)는 LB 브로스(1 L: 10 g 트립톤, 5 g 효모 추출물, 10 g NaCl, pH=7.5)에서 배양한다. 접종원은, 글리세롤 스톱을 TSA(트립틱 소이 아가) 플레이트에 스트리킹하여 배양한다. 배양물의 순도는 콜로니 형태를 눈으로 검사하여 검증한다. 멸균된 10 μl 루프를 이용하여, 아가 표면으로부터 콜러니를 취하여, 스크류 캡이 달린 250 ml의 비-배플드형의 에를렌메이어 플라스크에서 50 ml LB 브로스에 재현탁한다. 액체 배양물은 200 rpm에서 25°C의 조건 하에 48-72시간 동안 인큐베이션한다.

[0152]

72시간 후, 전체 브로스를 에틸 아세테이트로 추출한다. 유기상을 진공 하에 건조시킨다. 건조된 추출물을 디메틸 설폭사이드(DMSO) 중에 5.0 mg/mL의 용액으로 만든다. 그런 후, 이 용액(100 μl)을 경수 45 mL에 첨가한다. 에틸 아세테이트 추출물의 최종 농도는 11.1 ppm이다.

[0153]

표 3에 나타낸 데이터는, 쿠아가 홍합에 대한 생활성 화합물들이, LB 배지에서 배양시 에르위니아 카로토보라에서 생산됨을 보여준다. 상기에서 언급된 화합물 **37** (도 1b)은 LB 배지에서 배양한 에르위니아 카로토보라에서 생산된 락톤 화합물들 중 하나이다[Gunter Brader, Solveig Sjoblom, Heidi Hyytiainen, Karen Sims-Huopaniemi, and E. Tapio Palva, Altering Substrate Chain Length Specificity of an acylhomoserine Lactone. Synthase in Bacterial Communication, The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11) 10403-10409].

표 3

[0154]

LB 배지에서 배양한 에르위니아 카로토보라의 에틸 아세테이트 추출물의 효능

처리	치사율% (24 hr)	치사율% (48 hr)	치사율% (72 hr)	치사율% (96hr)	치사율% (120 hr)	치사율% (144 hr)
에르위니아 카로토보라	30 ± 0	75 ± 7	80 ± 0	80 ± 0	80 ± 0	90 ± 14
블랭크	0	0	0	0	0	0

[0155]

실시예 3: 슈도모나스로부터 연체 동물에 대한 살상 화합물의 분리

[0156]

실험 A

[0157]

화합물 분류

[0158]

아래 과정은 슈도모나스 플루오레센스 CL-145A의 세정한 세포들로부터 추출된 화합물들을 분류하기 위해 사용된다:

[0159]

FM2 배양 배지에서 배양한 슈도모나스 플루오레센스 CL 145A (ATCC 55799)의 발효물 10 L로부터 유래된 세포 펠렛을 회석 완충액에 현탁하고, Amberlite XAD-7 수지와 세포 현탁물을 실온에서 2시간 동안 225 rpm으로 교반함으로써, 추출한다 (Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *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 the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Org. Chem.* 72:5025-5034). 수지와 세포 매스를 성긴 면을 통해 여과하여 수집한 다음, DI 수로 행구어, 염을 제거한다. 수지, 세포 매스 및 성긴 면을 이후 2시간 동안 아세톤에 침지한 다음, 아세톤을 여과하고, 회전식 증발기를 이용하여 진공 하에 건조하여, 조추출물을 수득한다. 그런 다음, 조추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피(H₂O/CH₃OH; 농도 구배 90:20 → 0:100%)를 이용하여 분획화하여, 7개의 분획을 수득한다. 이들 분획을 회전식 증발기를 이용하여 건조물로 농축시키고, 수득되는 건조된 잔류물은 담수 달팽이 배아 세포주(*Biomphalaria glabrata*)를 이용한 세포성 분석과 쿠아가 혼합을 이용한 생 혼합 시험관-테스트 바이오분석 2가지를 이용하여 생물학적 활성에 대해 탐색한다. 바이오분석은 실시예 2 및 3에 보다 상세하기 기술되어 있다. 그 후, 활성 분획은 역상/정상 HPLC (Spectra System P4000 (Thermo Scientific))를 실시하여, 순수한 화합물을 수득하고, 전술한 바이오분석으로 탐색하여 활성 화합물을 탐색/식별한다. 화합물의 정체를 검증하기 위해, LC/MS와 같은 추가적인 분광학적 데이터를 기록한다.

[0160]

도 3에 사용한 방법을 개략적으로 도시한다. 살아있는 혼합과 달팽이 세포 분석 양자 실험을 기초로, 4번과 5번 분획에 활성 화합물이 있는 것으로 확인되었다. 모든 화합물들은 HPLC (C-18 컬럼, 수 : 아세토니트릴 농도 구배 용매 시스템 (0-10 분; 30 - 40 % CH₃CN 수용액, 10-20 분; 40 - 60 % CH₃CN 수용액, 20-60 분; 60 - 80 % CH₃CN 수용액, 60-65 분; 80 - 100 % CH₃CN)에서 유속 2.5 mL/min으로 UV 210 nm에서 검출하여 정제하였고, 그 중 체류 시간 51.66 분의 피크 번호 20번, 체류 시간 52.56 분의 21번, 및 체류 시간 59.61분의 22A가, 바이오분석에서 달팽이 세포의 증식을 저해(예, OD600 수치 낮음)함을 확인하였다.

[0161]

활성 피크들에 대한 질량 분광분석 분석을 Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) 장치에서 +/- 이온화 모드를 이용하고, LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA)에서의 전스캔 모드(m/z 100-1500 Da)에서 수행하였다. 써모 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 Finnigan Surveyor PDA + 검출기, 자동샘플러 + MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm 컬럼 (Phenomenex)을 장착하여 수행한다. 용매 시스템은, 물(용매 A)과 아세토니트릴(용매 B)로 구성된다. 이동상은 B 용매 10%에서 시작하며, 20분간 B 용매 100%로 선형적으로 증가시킨 다음, 4분간 유지시키고, 최종적으로 3분간 다시 용매 B 10%로 변동시켜 3분간 유지한다. 유속은 0.5 mL/min이다. 주입 부피는 10 μl이고, 샘플을 자동 샘플러내에서 실온으로 유지시킨다. 화합물은 LC와 역상 크로마토그래피를 사용하는 LC/MS로 분석한다. 본 화합물들의 질량 분광분석 분석은 다음의 조건에서 수행한다: 질소 기체의 유속은 시트(sheath)의 경우와 aux/sweep 기체 유속의 경우에서 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화는, 분무 전압을 5000 V로 설정하고 모세관 전압을 35.0 V로 설정하여 수행하였다. 모세관 온도는 400 °C로 설정하였다. 데이터는 Xcalibur 소프트웨어로 분석하였다. 20번 피크의 활성 화합물은 + 이온화 모드에서 분자량 1294.75를 가진다. 다른 활성 화합물(피크 #22 A)에 대한 LC-MS 크로마토그램에서는 + 이온화 모드에서의 분자량이 1320.83인 것으로 추측되었다.

- [0162] 구조를 도출하기 위해, 활성 피크 #20으로부터 일부 정제된 화합물을 600 MHz NMR 장치를 이용하여 추가로 분석하였고, 그 결과 CDCl_3 중의 δ 값은 d 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, 0.68을 가지는 것으로 나타났다. 이 NMR 데이터는, 이 화합물에, 아미노, 에스테르, 카르복시산, 페닐, 인돌, 지방족 메틸, 에틸, 메틸렌, 옥시메틸렌, 메틴, o-메틸, 옥시메틴 및 설퍼 기들이 함유되어 있음을 의미한다.
- [0163] 마찬가지로, C18 컬럼 및 아세토니트릴 : 물 용매 시스템(0-10 분; 35 - 45 % CH_3CN 수용액, 10-20 분; 45 - 60 % CH_3CN 수용액, 20-50 분; 60 - 85 % CH_3CN 수용액, 50-60 분; 85 - 100 % CH_3CN 수용액, 60-70 분; 100 % CH_3CN)에서, 유속 10 mL/min, UV 210 nm 검출 조건에서, 활성 분획 4번을 HPLC로 분석하고, 바이오분석으로 분획들 분석함으로써, 살아있는 홍합과 달팽이 배아 세포 둘다에 대해 활성을 나타내는 복수개의 피크들을 입수하였다. 활성 대부분은 체류 시간 47.73분의 27번 피크와 체류시간 51.52분의 30번 피크에 집중되어 있었다.
- [0164] 27번 피크와 30번 피크는 LC/MS로 추가로 분석하였다. 그 결과, 27번 피크에는 약 643 및 984의 분자량을 가진 2개의 주 성분이 포함된 다중 화합물들이 포함되어 있었다. 30번 피크에는 보다 적은 수의 화합물이 포함되어 있었는데, 질량 분석한 결과 피크의 주된 성분의 분자량은 약 546인 것으로 확인되었다.
- [0165] 홍합에 대한 바이오분석 테스트
- [0166] 이러한 살아있는 홍합에 대한 바이오분석 테스트는, HPLC와 LC-MS를 분석툴로 이용한 샘플 분획화에서 활성 화합물의 동정을 가이드하는데, 사용한다.
- [0167] 막 채집한 쿠아가 홍합 20개를 염소 제거한 수돗물 250 mL이 든 병에 실온에서 넣는다. 이 병은 실온으로 유지시키고, 매니폴드내로 연결시켜, 버블링을 통해 일정하게 공기를 공급한다. 각 검사 대상(HPLC 분획 또는 피크)은 DMSO에 용해하고, 파이프트로 1 - 5 mg의 농도로 각각 병으로 옮기고, 이 검사 대상과 홍합을 함께 24 시간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 시간이 종료된 후, 각 병에 있는 물을 버리고, 홍합을 담수로 행군 다음 개방형 유리 페트리 디쉬에 옮겨 10일간 관찰한다. 홍합은 치사 여부에 대해 매일 체크하고, 죽은 홍합을 꺼내 버린다. 각 처리는 3세트로 수행하며, 10일간의 인큐베이션 기간이 끝나면, 각 처리에 대한 치사율을 계산한다.
- [0168] 세포를 기반으로 한 분석
- [0169] 다른 방법으로서, 세포를 기반으로 한 분석은 슈도모나스 플루오레센스 세포에서 발효 후 활성 화합물의 동정 및 식별을 용이하게 수행하기 위해 사용한다.
- [0170] 담수 달팽이(*Biomphalaria glabrata*, ATCC CRL-1494)의 배아 세포를, 바이오독소에 민감한 것으로 알려진 홍합 소화관 상피 세포의 모델 시스템으로 사용한다. 본 분석에서, 초파리 배지, 소 태아 혈청, d-갈락토스 및 락트알부민이 포함된 완전 배양 배지 중의 활발하게 성장하는 세포 200 μL 를 각 웰에 넣고, 플레이트를 닫은 후, 통제된 환경에서 23°C 5% 이산화탄소 하에 배양하였다. 활성도(생장 저해 = 낮은 탁도)는 SpectraMax 플레이트 리더에서 SoftMax Pro 소프트웨어를 이용하여 600 nm에서 측정하고, 테스트 화합물로서 순수한 DMSO를 음성 대조군으로 사용하여 비교한다. 각 처리는 4번 반복하고, 동일한 양성 대조군 처리군 하나를 각 플레이트에 포함시킨다.
- [0171] 실험 B
- [0172] **방법 및 재료**
- [0173] 아래 과정은 슈도모나스 플루오레센스의 세포 배양물로부터 추출된 화합물의 정제에 사용되며, 도 3에 요약 도시한다. 구체적으로, FM2 배양 배지에서 배양한 슈도모나스 플루오레센스 CL 145A (ATCC 55799)의 발효물 10 L로부터 유래된 세포 펠렛을 회석 완충액에 현탁하고, Amberlite XAD-7 수지와 세포 현탁물을 실온에서 2시간 동안 225 rpm으로 교반함으로써, 추출한다 (Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759 and Williams, P. G., Miller, E. D., Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Org. Chem.* 72:5025-5034). 수지와 세포 매스를 성긴 면을 통해 여

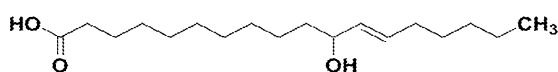
과하여 수집하고, DI 수로 행구어, 염을 제거한다. 수지, 세포 매스 및 성긴 면을 이후 2시간 동안 아세톤에 침지한 다음, 아세톤을 여과하고, 회전식 증발기를 이용하여 진공 하에 건조하여, 조추출물을 수득한다. 그런 다음, 조추출물을 역상 C18 진공 액체 크로마토그래피(H_2O/CH_3OH ; 농도 구배 90:20 $\rightarrow$ 0:100%)를 이용하여 분획화하여, 7개의 분획을 수득한다. 이들 분획을 회전식 증발기를 이용하여 건조물로 농축시키고, 수득되는 건조된 잔류물은 담수 달팽이 배아 세포주(*Biomphalaria glabrata*)를 이용한 세포성 분석과 쿠아가 홍합을 이용한 살아있는 홍합 시험관-테스트 바이오분석 2가지를 이용하여 생물학적 활성에 대해 탐색한다. 그 후, 활성 분획은 역상 HPLC (Spectra System P4000 (Thermo Scientific))를 실시하여, 순수한 화합물을 수득하고, 전술한 바이오분석으로 탐색하여 활성 화합물을 탐색/식별한다. 화합물의 정체를 검증하기 위해, LC/MS 및 NMR과 같은 추가적인 분광학적 데이터를 기록한다.

[0174] 활성 분획 4는 세파텍스 LH 20 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 추가로 분획화하여, 7개의 세분화된 분획을 수득한다. HPLC C-18 컬럼 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30)에서 물 : 아세토니트릴 농도 구배 용매 시스템 (0-10 분; 50 - 60 % CH_3CN 수용액, 10-20 분; 60-75 % CH_3CN 수용액, 20-45 분; 75 - 100 % CH_3CN 수용액, 45-55 분; 100 % CH_3CN 수용액, 55-70 분; 100 -0 % CH_3CN)으로 유속 8 mL/min으로 수행하고 210 nm에서 UV 검출하여, 체류 시간 45.59분의 활성 피크 21번과 체류시간 48.53분의 23번 피크를 수득함으로써, 필리페롤리드 A와 11-하이드록시-12-엔-옥타데카논산을 정제한다.

[0175] 활성 피크들에 대한 질량 분광분석 분석은, Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) 장치에서 +/- 이온화 모드를 이용하고, LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA)에서의 전스캔 모드(m/z 100-1500 Da)에서 수행한다. 써모 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 Finnigan Surveyor PDA + 검출기, 자동샘플러 + MS 펌프 및 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm 컬럼 (Phenomenex)을 장착하여 수행한다. 용매 시스템은, 물(용매 A)과 아세토니트릴(용매 B)로 구성된다. 이동상은 B 용매 10%에서 시작하며, 20분간 B 용매 100%로 선형적으로 증가시킨 다음, 4분간 유지시키고, 최종적으로 3분간 다시 용매 B 10%로 변동시켜 3분간 유지한다. 유속은 0.5 mL/min이다. 주입 부피는 10 μl 이고, 샘플은 자동샘플러내에서 실온으로 유지시킨다. 화합물은 LC와 역상 크로마토그래피를 사용하는 LC-MS로 분석한다. 본 화합물들의 질량 분광분석 분석은 다음의 조건에서 수행한다: 질소 기체의 유속은 시트(sheath)의 경우와 aux/sweep 기체 유속의 경우에서 각각 30 및 15 arb로 고정하였다. 전기분무 이온화는, 분무 전압을 5000 V로 설정하고 모세관 전압을 35.0 V로 설정하여 수행하였다. 모세관 온도는 400 $^{\circ}C$ 로 설정하였다. 데이터는 Xcalibur 소프트웨어로 분석하였다. 활성 화합물인 필리페롤리드 A의 분자량은 (-) 이온화 모드에서 295.65이다. 다른 활성 화합물에 대한 LC-MS 크로마토그램에서, (-) 이온화 모드에서 297.74의 분자량인 것으로 추측되었다.

[0176] 구조를 유추하기 위해, 분자량 296의 정제된 화합물 필리페롤리드 A를 $^{500} MHz$ NMR 장치를 이용하여 추가로 분석하였고, 내부 표준 물질로 테트라메틸실란(TMS, 0.00 ppm)을 기준으로 하였다. 이 화합물의 1H NMR δ 값은 5.62, 5.42, 4.55, 3.97, 2.58, 2.35, 2.04, 1.88, 1.73, 1.64, 1.54, 1.39, 0.92이고, ^{13}C NMR 값은 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, 13.3이다. 보다 상세한 1D 및 2D NMR 분석을 통해, 화합물의 구조가 공지된 화합물과 같은 필리페롤리드 A인 것으로 검증되었다.

[0177] 분자량 298인 정제된 2번째 화합물을 500 MHz NMR 장치를 이용하여 추가로 분석하였고, 그 결과 이의 1H NMR δ 값은 5.61, 5.41, 3.96, 2.27, 2.04, 1.69, 1.51, 1.42, 1.32, 0.92이었고, ^{13}C NMR 값은 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, 14.3이었다. 보다 상세한 1D 및 2D NMR 분석을 통해, 화합물의 구조가 미생물 소스에서 보고되지 않았음을 확인하였다. 이 화합물, 11-하이드록시-12-엔-옥타데카논산의 구조는 아래와 같이 표시된다:

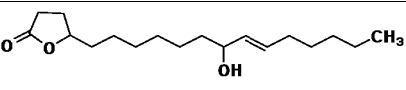
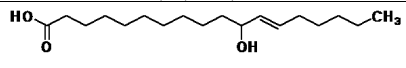


[0178]

[0179] 슈도모나스 세포 배양물로부터 분리된 화합물의 효능은 전술한 방법을 이용하여 검사하였다. 그 결과는 아래 표 4에 나타낸다.

[0180]

필리페롤리드 A와 11-하이드록시-12-엔-옥타데카논산의 연체 동물 살상 효과

구조	농도 [$\mu\text{g/ml}$]	치사율% 24 hr	치사율% 48 hr	치사율% 72 hr	치사율% 96hr
 필리페롤리드 A	16	53.3 ± 15.3	53.3 ± 15.3	70 ± 10	80 ± 10
 11-하이드록시-12-엔-옥타데카논산	16	0	20 ± 20	33.3 ± 20.8	40 ± 26.5

[0181]

실시예 5: 카울린 효능

[0182]

슈도모나스 플루오레센스 박테리아를 이용한 미생물 천연 살충제 효과에 있어서의 카울린 점토의 효능을 11.8℃에서 수행되는 바이오박스 실험으로 조사한다. 실험 첫날, 카울린 점토를 연동 펌프를 통해 농축된 스탁 용액으로부터 바이오박스에, 최종 탁도가 약 20 NTU(표준화된 탁도 단위)이 되도록 가한다. 쿠아가 혼합 50개를 양말단이 나일론 메쉬로 봉인된 원-뿔의 긴 아크릴 관에 넣고, 이 관을 처리를 위해 상기 바이오박스의 바닥에 둔다. 점토 적용 시간은 6시간이며, 이후 아크릴 관내 혼합을 18시간 동안 바이오박스로 유입되는 담수에 노출시킨다. 다음날, 바이오박스의 바닥에서 여분의 점토를 세정하여 제거하고, 수성 현탁물 중의 천연 살충제를 최종 농도 200 ppm으로 연동 펌프를 통해 가한다. 천연 살충제 처리를 6시간 한 후, 관내 혼합은 바이오박스 안에서 담수를 분당 1 갤런으로 흐르게 하면서 인큐베이션한다. 치사율%를 측정하기 위해 5주간 매주 혼합을 관찰하고 수를 센다. 대조군 처리에는 무처리 대조군, 카울린 점토만 처리한 군(천연 살충제 무처리) 및 천연 살충제만 처리한 군(점토 사전-처리 안함)을 포함시킨다. 모든 처리는 3세트로 반복 수행한다.

[0183]

표 5와 도 4에 제시된 결과들은, 천연 살충제를 처리하기 전에 카울린 점토에 18시간 노출시키면 점토 사전-처리를 하지 않은 혼합에 비해 치사율이 현저하게 증가됨을 보여준다. 이러한 현상은, 생물학적 활성은 낮은 기간 동안 차가운(11.8℃) 수중에서 회수하고 처리한 혼합의 사이펀을 통한 흡입 활성 증가로 설명될 수 있다. 이러한 사이펀을 통한 흡입 증가는 살충제 제품의 흡수를 증가시키고, 이로써 혼합 치사율 증가로 이어지게 된다.

표 5

[0184]

각 시간대(일)에 측정된 치사율%로서 나타낸 천연 살충제의 효과

	치사율 %					
	1	9	16	21	27	34
무처리 대조군	0	0	0	0	0	00
카울린 20NTU	0	0	0	0	0	1
카울린 20NTU + 200 ppm	0	35	64	71	77	83
200 ppm	0	22	46	55	58	63

[0185]

실시예 6: 달팽이에 대한 감마-도데카라톤 및 N-(테세노일)피롤리딘의 효과

[0186]

달팽이 실험: 적량의 테스트 화합물을 먼저 아세톤(2 mL)에 용해한다. 이 용액을 2.5 g의 옥수수 전분에 넣고 잘 혼합한다. 제조된 혼합물을 페트리 디쉬(Φ25 mm)로 옮긴다. 그런 후, 페트리 디쉬를 자연 건조를 위해 후드에 넣어 둔다. 건조 후, 페트리 디쉬에 물(2 mL)을 넣어, 페이스트를 만든다.

[0187]

브라운 가든 달팽이(*Cantareus aspersus*)를 가정의 정원에서 채집하여, 실험실에서 양배추나 홍당근을 주면서 적어도 하루 사육한다. 비슷한 크기의 개체들을 각 처리군으로 선별하여 1 L 비이커에 넣는다. 달팽이를 활동적인 상태로 만들기 위해, 약간의 물을 달팽이와 비이커에 핸드 분무기를 이용하여 분무한다. 물을 분무한 다음, 화학제-함유 옥수수 전분이 든 페트리 디쉬를 비이커 안에 넣고, 비이커의 윗부분을 알루미늄 호일로 덮는다. 식이 행태, 옥수수 전분 섭취량 및 치사율을 24시간째에 기록한다.

[0188]

데이타(표 6)는, 옥수수 전분 1 g 당 100 mg의 감마-도데카라톤(SAR-014)이 브라운 가든 달팽이를 강력하게 쫓아버리는 것으로 나타났다. 그러나, 옥수수 전분 1 g 당 100 mg의 N-테세노일)피롤리딘 (SAR-030)은 이를 섭취한 브라운 가든 달팽이를 모두 죽게 한다.

표 6

[0189] 브라운 가든 달팽이에 대한 화학제의 효능

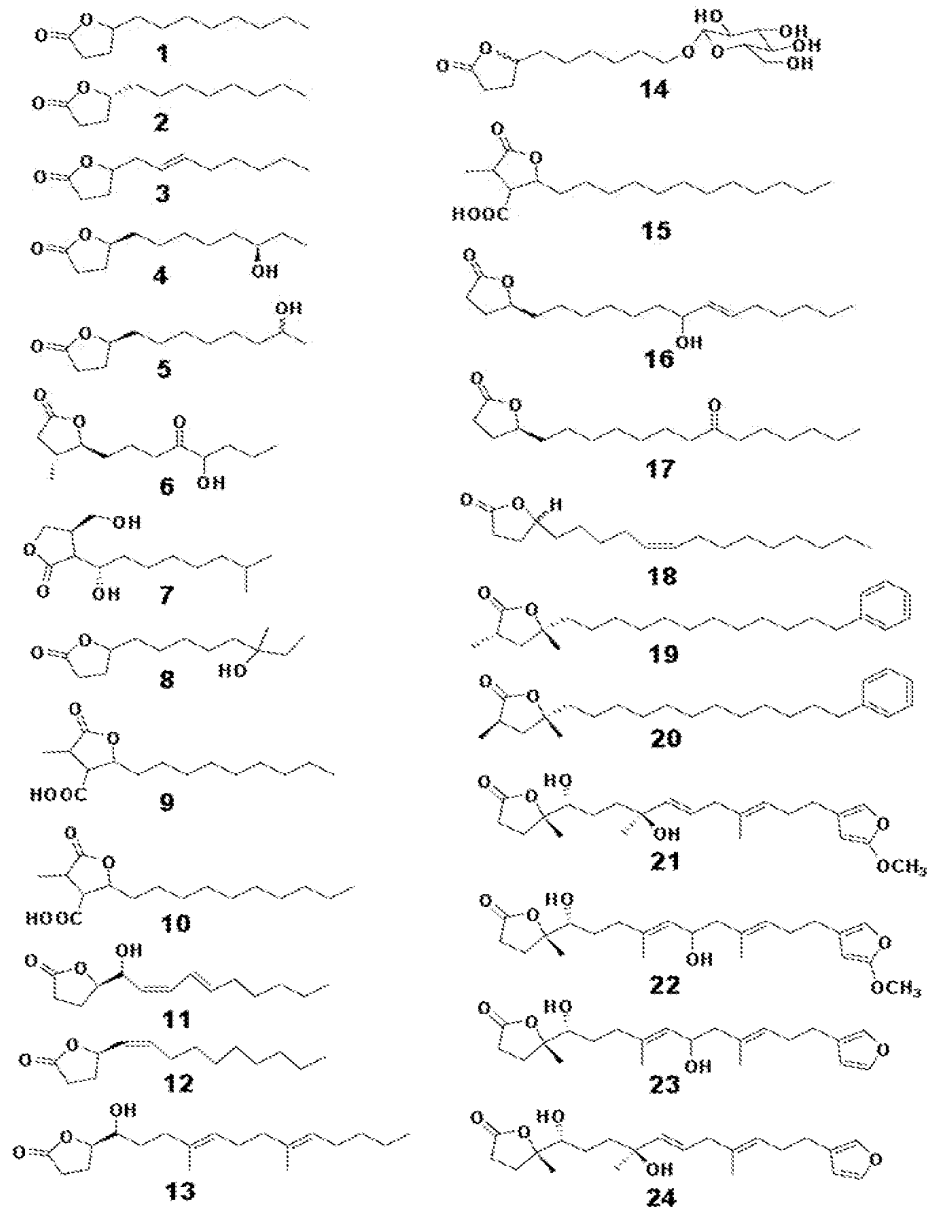
처리	화학제	용량 (mg/g 옥수수 전분)	섭식 양태	옥수수 전분 섭취량	24시간 치사율
대조군		0	모든 개체가 옥수수 전분을 섭취함	2시간 이내에 옥수수 전분이 모두 소모됨	0%
1	SAR-014	100	모든 개체가 옥수수 전분에서 즉각적으로 도망감	24시간 후 0%	0%
2	SAR-030	100	개체들 5마리 중 4마리가 전분을 조금 먹은 후 떠남	24시간 후 5% 미만의 옥수수 전분이 소모됨	옥수수 전분을 먹은 개체들 모두 죽음

[0190] 본 발명은 구체적인 구현예들을 참조하여 설명되어 있지만, 다양한 등가체, 변화 및 변형을 이용할 수 있고 이러한 것 역시 본 발명의 범위에 포함됨은 자명한 것이므로, 구체적인 내용을 한정하는 것으로 해석되서는 안된다.

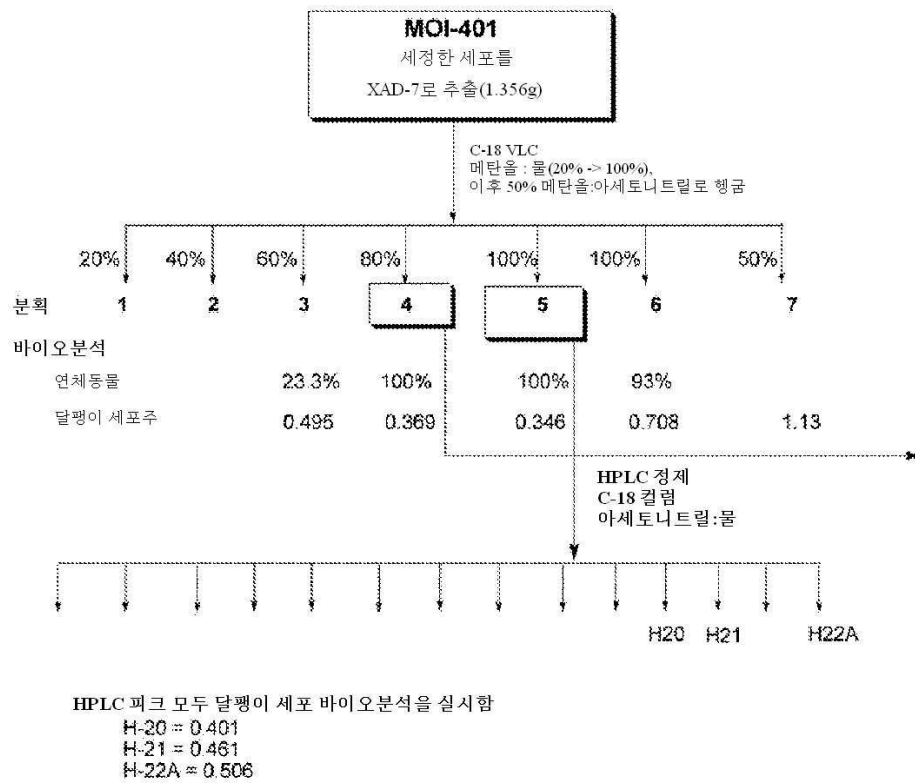
[0191] 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 참조문헌들이 인용되어 있으며, 이들 각각은 전체 내용이 원용에 의해 본 발명에 포함된다.

도면

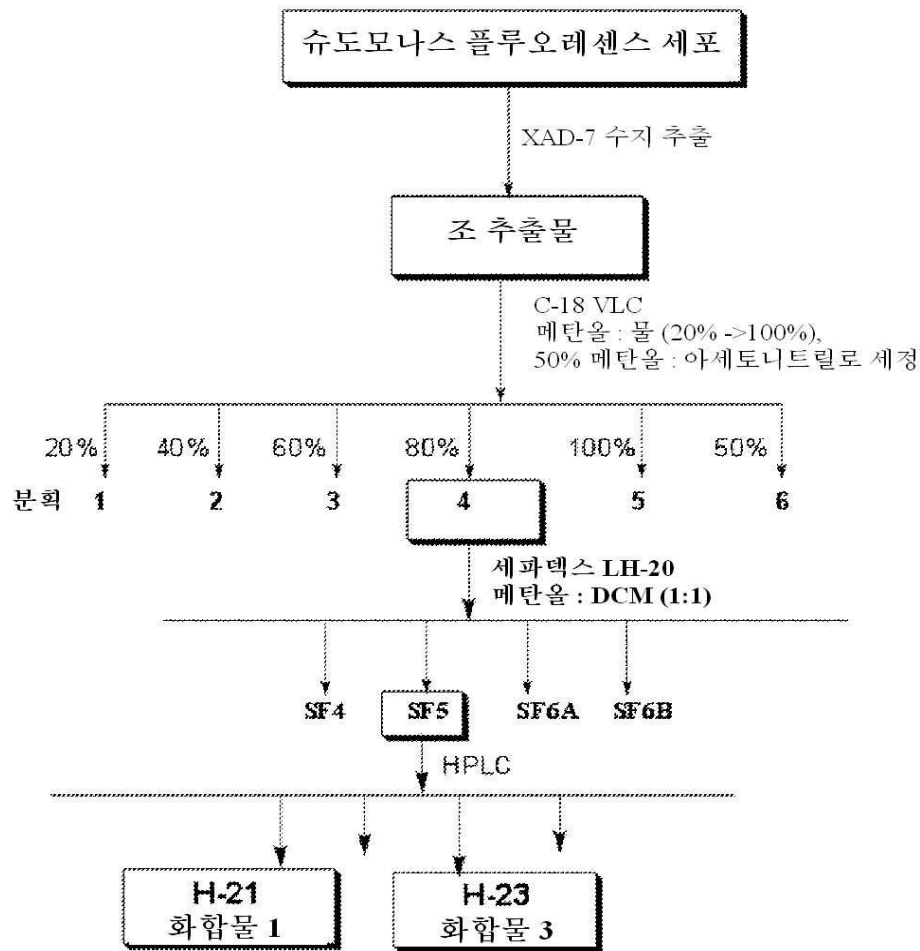
도면1a



도면2



도면3



도면4

