



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101098707 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 30

(21) 申请号 200580046525. 8

弗拉维亚·马里内利

(22) 申请日 2005. 01. 19

恩里科·塞尔瓦 佛朗哥·帕伦蒂

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

11/035, 296 2005. 01. 12 US

代理人 肖善强

(85) PCT申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2007. 07. 12

A61K 38/12 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/004843 2005. 01. 19

(56) 对比文件

US 6699839 B1, 2004. 03. 02, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

W02006/075988 EN 2006. 07. 20

审查员 吴立

(73) 专利权人 森帝奈拉医药品公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 阿梅里加·拉扎里尼

卢西亚诺·加斯塔尔多

吉安帕罗·坎迪亚尼

伊斯梅拉·奇奇利亚托

达尼埃莱·洛西

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 18 页

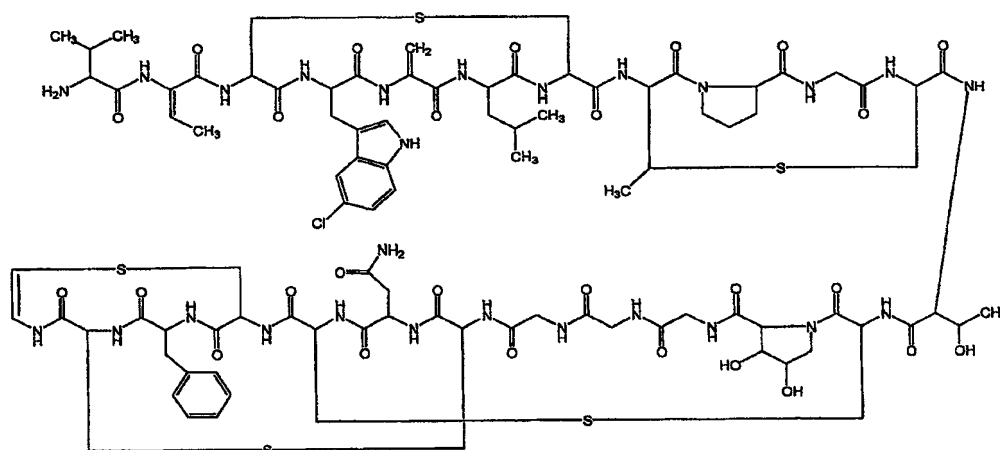
(54) 发明名称

抗生素 107891、其因子 A1 和 A2、可药用盐和组合物及其用途

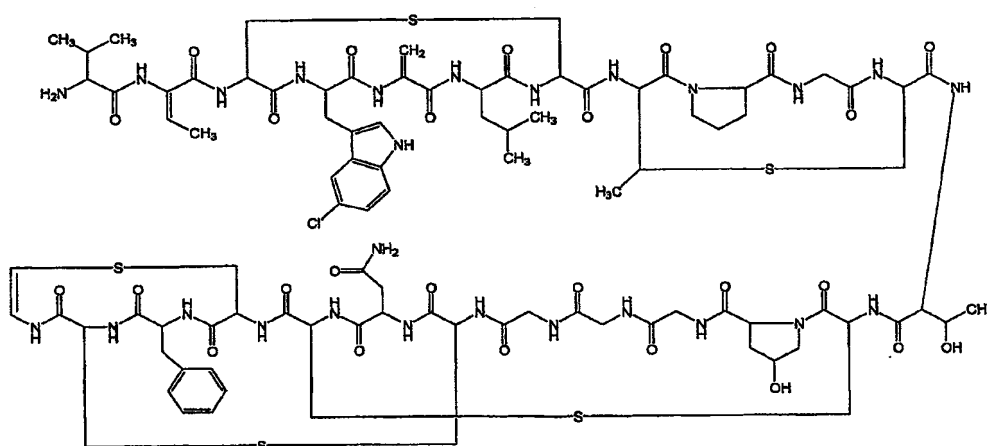
(57) 摘要

本发明涉及微生物来源的抗生素物质, 尤其是被命名的抗生素 107891, 其由 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 发酵生产, 本发明还涉及所述抗生素物质的可药用盐及其组合物, 以及它们作为具有针对易感微生物的抑制活性的抗细菌剂的用途。抗生素 107891 是包含被命名为因子 A1 和 A2 的两个因子的复合体, 其具有肽结构, 所述结构含有羊毛硫氨酸和甲基羊毛硫氨酸作为组成部分, 这是羊毛硫抗生素组的抗生素的典型特征。抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 展示出针对革兰氏阳性细菌 (包括甲氧苯青霉素抗性和万古霉素抗性菌株) 的良好抗细菌活性, 对一些革兰氏阴性细菌 (例如 *M. catharralis*, *Neisseria* 的种和 *H. influenzae* 和 *Mycobacteria*) 也有活性。

1. 因子 A1, 其是下式化合物



2. 因子 A2, 其是下式化合物



3. 抗生素 107891, 其是包含权利要求 1 所述的因子 A1 和权利要求 2 所述的因子 A2 的混合物。

4. 用于生产权利要求 1 所述的因子 A1、权利要求 2 所述的因子 A2 和权利要求 3 所述的抗生素 107891 及其与酸的盐的方法, 所述方法包括如下步骤:

在有氧条件下, 在含有可吸收碳源、氮源和无机盐源的水性营养培养基中, 培养 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024;

从菌丝体和 / 或经过滤的发酵培养液分离出所得到的抗生素; 以及
纯化经分离的抗生素 107891。

5. 如权利要求 4 所述的方法, 其中, 对所述菌株 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 进行预培养。

6. 权利要求 4 所述的方法, 其中, 对所述抗生素 107891 的分离通过对所述发酵培养液进行过滤来进行, 按照选自下述组的技术从经过滤的发酵培养液回收抗生素, 所述组由用水不可混溶溶剂提取、通过加入非溶剂或通过改变溶液的 pH 进行的沉淀、吸收色谱、分配色谱、反相分配色谱、离子交换色谱、分子排阻色谱等或两种或多种所述技术的组合构成。

7. 权利要求 4 所述的方法,其中,对所述抗生素 107891 的分离通过将所述菌丝体与所述发酵培养液的上清液分离开来,用水可混溶溶剂对菌丝体加以提取,由此在去除没用的菌丝体之后,获得含有粗制抗生素的水可混溶溶液,可单独对其进行加工,或与经过滤的发酵培养液合并之后被加工,以便通过选自下述组的技术回收所述抗生素 107891,所述组由用溶剂提取、通过加入非溶剂或通过改变溶液的 pH 进行的沉淀、吸收色谱、分配色谱、反相分配色谱、离子交换色谱、分子排阻色谱等或两种或多种所述技术的组合构成。

8. 权利要求 7 所述的方法,其中,在进行加工以便回收所述抗生素之前,降低所述菌丝体提取物中所述水可混溶溶剂的浓度。

9. 权利要求 6 所述的方法,其中,将经过滤的发酵培养液与吸收树脂接触,用极性的、水可混溶溶剂或其与水的混合物对所述树脂加以洗脱,由此获得含有粗制抗生素 107891 的溶液。

10. 权利要求 9 所述的方法,其中,所述吸收树脂选自聚苯乙烯、混合的聚苯乙烯-二乙烯基苯和聚酰胺树脂构成的组。

11. 权利要求 7 所述的方法,其中,用 C₁-C₃ 烷醇提取菌丝体,将菌丝体提取物与吸收树脂接触,用极性的、水可混溶溶剂或其与水的混合物对所述树脂加以洗脱,由此获得含有粗制抗生素 107891 的溶液。

12. 权利要求 6 所述的方法,其中,含有所述粗制抗生素 107891 的溶液被合并,并被进一步加工,以用于对所述抗生素 107891 的进一步纯化。

13. 权利要求 9 所述的方法,其中,对含有所述粗制抗生素 107891 的所述溶液进行浓缩,然后冷冻干燥,产生粗制抗生素 107891 固体产物。

14. 权利要求 9 所述的方法,其中,含有被吸收的抗生素的所述吸收树脂被合并,用极性的、水可混溶的溶剂或其与水的混合物对合并的混合物加以洗脱。

15. 权利要求 4 所述的方法,其中,通过色谱程序来纯化所述抗生素 107891。

16. 权利要求 15 所述的方法,通过制备性 HPLC 或中等压力色谱来进行。

17. 权利要求 4 所述的方法,其中,通过制备性 HPLC 从经纯化的抗生素 107891 分离因子 A1 和因子 A2。

18. 包含抗生素的药物组合物,所述抗生素选自权利要求 3 所述的抗生素 107891、权利要求 1 所述的因子 A1、权利要求 2 所述的因子 A2 和所述因子的任何比例的混合物或其与酸的可药用盐。

19. 如权利要求 18 的药物组合物,还包含可药用载体。

20. 用作为药剂的权利要求 3 所述的抗生素 107891、权利要求 1 所述的因子 A1、权利要求 2 所述的因子 A2 和所述因子的任何比例的混合物或其与酸的可药用盐。

21. 权利要求 3 所述的抗生素 107891、权利要求 1 所述的因子 A1、权利要求 2 所述的因子 A2 和所述因子的任何比例的混合物或其与酸的可药用盐用于生产用于治疗或预防细菌感染药剂的用途。

22. 菌株 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 的生物上纯的培养物。

抗生素 107891、其因子 A1 和 A2、可药用盐和组合物及其用途

[0001] 本申请是国际申请,其基于提交于2005年1月12日的美国申请[代理人案号892,280-195],该美国申请是提交于2005年1月11日的美国申请[代理人案号892,280-499]的部分继续(continuation-in-part)申请,美国申请[代理人案号No.892,280-499]是提交于2004年7月12日的PCT/EP2004/007658的§371国家申请,PCT/EP2004/007658要求了提交于2003年7月18日的EP申请03016306.7的优先权,所有这些申请文件都通过引用整体并入本文。

[0002] 本发明涉及来自微生物来源的抗生素物质,尤其是被任意地命名的抗生素107891,其是包含因子A1和因子A2的复合体,本发明还涉及其可药用盐、其可药用组合物,以及它们作为抗细菌剂的用途。

[0003] 本发明的另一目的是提供用于制备抗生素107891的方法,所述方法包括培养 *Microbispora* sp. 107891(下文中称为 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024)或保持有生产所述抗生素的能力的其变体或突变体,从菌丝体和/或从发酵培养液回收本发明的抗生素,通过色谱手段分离出纯的物质,以及将因子A1和A2分开。

[0004] 抗生素107891是新颖的抗微生物剂,其具有肽结构,所述结构含有羊毛硫氨酸(lanthionine)和甲基羊毛硫氨酸作为组成部分。这是羊毛硫抗生素(lantibiotics)的典型特征,特别是主要对细胞壁生物合成发挥作用的亚组的典型特征。

[0005] 羊毛硫抗生素是肽,其含有硫醚氨基酸——羊毛硫氨酸以及若干其它经修饰的氨基酸(H.G.Sahl and G.Bierbaum,(1998)“Lantibiotics:biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria”,Ann.Rev.Microbiol.52:41-79)。已知羊毛硫抗生素的大部分具有抗细菌活性,虽然一些已被报道为对于不同的药理学目标具有活性。基于其结构,抗细菌的羊毛硫抗生素被粗略分为两组:A型羊毛硫抗生素,典型地是伸长的两性肽;而B型羊毛硫抗生素是紧凑的、球形的(O.McAuliffe,R.P.Ross and C.Hill,(2001)“Lantibiotics:structure,biosynthesis and mode of action”,FEMS Microb.Rev.25:285-308)。尼生素(nisin)是A型羊毛硫抗生素的典型代表,而actagardine(花园霉素(gardimycin))和mersacidin属于B型羊毛硫抗生素亚类。尼生素型和mersacidin型的羊毛硫抗生素都与被膜结合的肽聚糖前体脂II相互作用,但是这两类在细菌增殖过程中产生的影响并不相同。尼生素型的羊毛硫抗生素主要通过透过胞质膜来杀细菌(H.Brotz,M.Josten,I.Wiedemann,U.Schneider,F.Gotz,G.Bierbaum and H.G.Sahl,(1998):“Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin,epidermin and other lantibiotics”,Mol.Microbiol.30:317-27),而mersacidin型的羊毛硫抗生素主要通过抑制细胞壁生物合成来杀细菌细胞(H.Brotz,G.Bierbaum,K.Leopold,P.E.Reynolds and H.G.Sahl,(1998):“The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II”,Antimicrob Agents Chemother.42:154-60)。

[0006] US6,551,591B1中描述了 *Microbispora corallina* 菌株 NRRL30420 产生的两

种抗生素,其分别被称为 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 。上述专利中报道的物理化学数据(例如,质谱数据、分子量、氨基酸含量)以及对 LC-MS 实验分析中驻留时间的比较清楚表明,抗生素 107891 复合体及其组分因子 A1 和因子 A2 是与抗生素 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 有所区别的化学物质。

[0007] EP0592835A2 描述了抗肿瘤抗生素 BU-4803TA₁、A₂、B、C₁、C₂ 和 D。抗生素 BU-4803TA₁、A₂ 和 B 是从 *Microbispora* ATCC55327(AA9966) 的发酵培养液回收的,而抗生素 BU4803TC₁、C₂ 和 D 是对抗生素 BU4803TA₁、A₂ 和 B 分别进行转化(transformation)的产物,转化在这些抗生素贮存于二甲基亚砷中进行。EP0592835A 中报道的关于上述抗生素的物理化学数据(例如,外观、紫外吸收、分子量、抗肿瘤活性)清楚表明,它们是与抗生素 107891 复合体及其因子 A1 和 A2 不同的化学物质。

[0008] 菌株和发酵

[0009] 在环境中分离出了 *Microbispora* sp. 107891,并根据《布达佩斯条约》的规定,于 2003 年 2 月 27 日将其保藏于 American Type Culture Collection(ATCC), 10801 University Blvd, Manassas VA, 20110-2209 U. S. A.。菌株编号为 PTA-5024。

[0010] 对抗生素 107891 的生产通过下述方法达成:培养能生产其的 *Microbispora* sp. 菌株,即 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 或保持有生产所述抗生素的能力的其变体或突变体;从整个培养液和/或从分离的菌丝体和/或从经过滤的发酵培养液分离出所得到的抗生素;以及通过色谱手段纯化经分离的抗生素。在任何情况下都优选在有氧条件下,在含有易于吸收的碳源、氮源和无机盐源的水性营养培养基中生产抗生素 107891。通常用于发酵领域的营养培养基中的很多都可使用,但是某些培养基是优选的。

[0011] 优选碳源是蔗糖、果糖、葡萄糖、木糖等。优选氮源是大豆粗粉(soybean meal)、蛋白胨、肉类提取物、酵母提取物、胰蛋白胨、氨基酸、经水解酪蛋白等。可被包括进培养基的无机盐有能产生钠、钾、铁、锌、钴、镁、钙、铵、氯、碳酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根等离子的惯用可溶盐。

[0012] 优选地,在发酵管或摇瓶中对生产抗生素 107891 的菌株进行预培养,然后用该培养物接种用于生产大量物质的发酵罐。用于预培养的培养基可以与用于更大规模发酵的培养基相同,但也可使用其它培养基。可在 17°C 至 37°C 之间培养生产抗生素 107891 的菌株,最优温度为 28-30°C。

[0013] 在发酵期间,可通过在易感(susceptible)微生物上进行生物试验和/或通过 HPLC 分析来监测抗生素 107891 的生产。抗生素 107891 的最大生产通常发生在发酵大约 90 小时之后,并且在 200 小时之前。

[0014] 通过培养 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 或能生产抗生素 107891 的其变体或突变体,来生产抗生素 107891,并且在培养液和/或在菌丝体中找到所述抗生素。

[0015] 在本说明书和权利要求书中,除非另有指明,术语“抗生素 107891”指包含因子 A1 和 A2 的抗生素 107891 复合体。

[0016] Microbispora sp. ATCC PTA-5024 的形态特征

[0017] *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 在多种标准固体培养基上生长良好。使用在加入了 1ml/l 维生素溶液(硫胺氢氯酸 25mg/l、泛酸钙 250mg/l、烟酸 250mg/l、生物素 0.5mg/l、核黄素 1.25g/l、维生素 B126.25mg/l、对氨基苯甲酸 25mg/l、叶酸 500mg/l、盐酸吡哆醛

500mg/l) 的腐殖酸-痕量盐琼脂 (Humic acid-Trace Salts Agar, 以 g/l 表示的组成: 腐殖酸 0.5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001、 $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001, MOPS2、琼脂 20) 上培养的培养物来测量显微尺寸。

[0018] 在液体培养基 (V6 培养基, 以 g/l 表示的组成: 右旋糖 22、肉类提取物 5、酵母提取物 3、酪蛋白 3、 NaCl 1.5) 中, 在 28°C 培养 6 小时后没有观察到菌丝体的断裂。在腐殖酸-痕量盐琼脂 (28°C 培养 21 天后) 上的显微检查揭示了有分支的、未断裂的基部 (substrate) 菌丝体和单轴分支的气生 (aerial) 菌丝体; 还可看到许多长直并且少分支的气生菌丝。孢子的特征性纵向对 (longitudinal pair) 处于从分支侧面产生或直接从主气生菌丝产生的短孢子梗上。孢子是球形的并且不能运动。没有观察到孢子囊样体或其它特殊结构。

[0019] Microbispora sp. ATCC PTA-5024 的培养特征

[0020] 在 28°C 和 200rpm 下, AF/MS 液体培养基 (见实施例 1) 中对 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 进行 6 天的培养, 然后将其转移 (5% 接种体) 至新的 AF/MS 液体培养基, 再培养 6 天, 最后接种 (7% 接种体) 进 100ml V6 液体培养基 (见实施例 1)。在 28°C 和 200rpm 培养 6 天后, 通过离心收获菌丝体, 用灭菌盐水洗三次, 然后稀释以提供合适的接种体。以交叉划线的方式将悬浮液的小份划线到 Shirling 和 Gottlieb (E. B. Shirling and D. Gottlieb, (1966): "Method for Characterization of Streptomyces species", Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340) 推荐的多种培养基以及 S. A. Waksman (1961): "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol. 2:328-334 推荐的培养基上。

[0021] 使用无淀粉的培养基 ISP4 (加入有 1ml/l 的上述维生素溶液) 作为基础培养基来测定使用多种碳水化合物作为碳和能量来源的能力; 每种碳源以 1% (w/v) 的终浓度加入。

[0022] 在 ISP2 培养基上测定 NaCl 耐受性、生长的 pH 范围以及在不同温度下生长的能力。所有培养基都在 28°C 温育三周, 除非特别指明, 这表示 21 天。在自然日光下评定颜色, 这使用 Maerz 和 Paul (A. Maerz and M. R. Paul, 1950-A Dictionary of Colour, 2nd edition. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York) 的色图 (Colour Atlas) 来进行。按照 Williams et al. (S. T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath & M. J. Sackin, 1983-Numerical classification of *Streptomyces* and related genera-J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813) 所述, 在 sloppy 硝酸盐培养基中评估将硝酸盐还原为亚硝酸盐的能力。

[0023] 在表 I 中记录菌株 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 的生长、菌落外观、基部和气生菌丝体颜色以及色素产生。在所用的培养基的大部分上存在营养生长, 而与之不同地, 它们中仅有一部分存在气生菌丝体。在所用的任何培养基上都没有显示出明显的色素化。菌株的生理特征呈现于表 II 中。生长和气生菌丝体的产生在 17°C 存在而在 43°C 不存在。ISP2 上气生菌丝体的产生在高于 6 的 pH 下出现, 但是在存在 1% NaCl 时不存在。

[0024] 使用多种碳水化合物用以生长的能力显示于表 III 中。

[0025] 表 I: *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 的生长特征

[0026]

培养基	生长和形态	反面颜色号
ISP2 酵母提取物 - 麦芽提取物琼脂	大量生长, 褶皱表面; 浅粉红色 (2A8) 气生菌丝体良好生长。浅橙 (organish)/ 淡褐色可溶色素略有产生。	5E12 浅橙 / 红
ISP3 燕麦琼脂	大量生长; 浅粉红色 (2A8) 气生菌丝体 良好生长, 特别是在交叉划线的臂端 (arm)。浅橙色可溶色素略有产生。	11H10 浅橙 / 粉红
ISP4 无机盐 - 淀粉琼脂	良好生长; 没有气生菌丝体产生。 没有可溶色素产生。 淀粉被水解。	11I9 橙
Glu/Asp 葡萄糖 - 天冬酰胺琼脂	离散生长, 稀疏; 稀疏的米色 / 浅橙色 (9B4) 气生菌丝体在交叉划线的臂上产生。 没有产生可溶色素。	12K12 浅橙 / 淡褐
ISP6 蛋白胨 - 酵母提取物 - 铁琼脂	生长有所不足, 高且盘旋状地产生浅粉红色 单个菌落, 其具有光滑表面; 没有产生 气生菌丝体。培养基没有变深。	未检测到
ISP7 酪氨酸琼脂	稀疏的浅橙 / 淡褐基部菌丝体生长不良; 没 有产生气生菌丝体。培养基没有变深。	未检测到
ISP3+YE 燕麦 / 1% 酵母提取物琼脂	大量生长, 褶皱表面; 稀疏浅粉红色气生 菌丝体的产生非常不足。没有产生可溶色 素。	4B12 浅橙 / 红

[0027] (ISP4 和葡萄糖 - 天冬酰胺琼脂加有 1ml/L 的维生素溶液)

[0028] 表 II : *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 的生理特征。

[0029]

测试	反应
淀粉水解	阳性
酪蛋白水解	阴性
苹果酸钙消化	阴性
石蕊牛乳酪化	阴性
石蕊牛乳凝结	阴性
明胶液化	阴性至轻微阳性
酪氨酸反应	阴性
硝酸盐还原	阳性
生长的 pH 范围 (14 天)	在 4.2 不生长, 在 5.5 至 8.8 良好; 在该范围外 没有进行测试。pH ≤ 6.5 时没有气生菌丝体。
NaCl% 耐受性	≤ 2; 在 ≥ 1 时没有气生菌丝体。
生长的温度范围	17°C 至 37°C。在整个范围都存在气生菌丝 体。在 43°C 不生长。

[0030] 表 III : *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 对碳源的利用

[0031]

碳源	生长 (14 天)
阿拉伯糖	++
纤维素	-
果糖	++
肌醇	+/-
甘露糖醇	+++
棉子糖 (raffinose)	-
鼠李糖	-

蔗糖	+++
木糖	+++
葡萄糖	++
甘油	++
没有糖	-

[0032] +++ :大量 ;++ :良好生长 ;+ :适当生长 ;+/- :生长有所不足 ;- :没有生长 ;气生菌丝体一直不存在。

[0033] Microbispora s.d. ATCC PTA-5024 的化学分类学特征

[0034] 在 28℃ 在旋转摇床上, 于 GYM 培养基 (葡萄糖 4g/l ;酵母提取物 4g/l ;麦芽提取物 10g/l) 中培养 *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024, 收获菌丝体, 用灭菌蒸馏水洗两次, 随后冷冻干燥。按照 Staneck and Roberts, (J.L. Staneck and G.D. Roberts, (1974) : " Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography ", *Appl. Microbiol.* 28 :226-231) 的方法, 进行对氨基酸的分析。按照 Minnikin et al. (D.E. Minnikin, A.G.O' Donnell, M. Goodfellow., G. Alderson, M. Athalye, A. Schaal and J.H. Parlett, (1984) : " An integrated procedure of isoprenoid quinones and polar lipids ", *J. Microbiol. Meth.* 2 :233-241) 的程序提取甲基萘醌类 (menaquinones) 和极性脂类。通过薄层色谱来分析极性脂类 (D.E. Minnikin, V. Patel, L. Alshamaony, and M. Goodfellow, (1977) : " Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria ", *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27 : 104-117), 通过 HPLC 来分析甲基萘醌类 (R.M. Kroppenstedt, (1982) : " Separation of bacterial menaquinones by HPLC using reverse phase RP18 and a silver loaded ion exchanger as stationary phase ", *J. Liquid. Chromat.* 5 :2359-2367 ; R.M. Kroppenstedt, (1985) : " Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms ", in : *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. No 20 SAB Technical Series pp. 173-199, M. Goodfellow and D.E. Minnikin eds, Academic Press, London), 通过气-液色谱来分析脂肪酸甲酯 (L.T. Miller, (1982) : " A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids ", *J. Clin. Microbiol.* 16 :584-586 ; M. Sasser, (1990) : " Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids ", *USFCC News Letters* 20 : 1-6)。通过 Minnikin et al. (D.E. Minnikin, L. Alshamaony, and M. Goodfellow, (1975) : " Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin layer chromatographic analysis of whole organism methanolizates ", *J. Gen. Microbiol.* 88 :200-204) 的方法来检查分枝菌酸 (mycolic acid) 存在与否。

[0035] 菌株 *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 的全细胞水解产物含有内消旋-二氨基庚二酸作为肽聚糖的二氨基酸。占据主要地位的甲基萘醌类是 MK-9(III、VIII-H₄)、MK-9(H₂) 和 MK-9(H₀)。极性脂类的情况由下述物质的存在表征: 磷脂酰乙醇胺、甲基磷脂酰乙醇胺、磷脂酰-甘油、二磷脂酰-甘油、磷脂酰-肌醇、磷脂酰-肌醇甘露糖苷和含 N-乙酰葡糖胺的磷脂, 即, 根据 Lechevalier et al. (H.A. Lechevalier, C. De Brieve and M.P. Lechevalier, (1977) : " Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : phospholipid composition ", *Biochem. Syst. Ecol.* 5 :246-260) 的 IV 型磷脂。脂肪酸的主要

组分为反异 (anteiso) 15:0、异 16:0、n-16:0、反异 17:0 和 10-甲基-十七烷 (10-Me-17:0), 即, 3c sensu Kroppenstedt (R. M. Kroppenstedt, (1985): " Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms ", in: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20SAB Technical Series pp. 173-199. M. Goodfellow and D. E. Minnikin eds, Academic Press, London)。没有探测到分枝菌酸。

[0036] Microbispora sp. ATCC PTA-502416S rDNA 测序

[0037] 按照公开的程序 (P. Mazza, P. Monciardini, L. Cavaletti, M. Sosio and S. Donadio, (2003): " Diversity of Actinoplanes and related genera isolated from an Italian soil ", Microbial Ecol. 5 :362-372), 获得菌株 Microbispora sp. ATCC PTA-5024 的 16rRNA 基因 (16s rDNA) 的部分序列, 即对应于全部 rRNA 的 95% 的 1443 个核苷酸。这示于 SEQ ID NO :1 中。

[0038] 将该序列与 US6,551,591B1 中报道的菌株 Microbispora corallina NRRL30420 (MF-BA-1768) 的序列相比较。比对两条序列, 发现 1456 个比对的位置中 31 个有所不同, 它们产生了 2.13% 的总序列分歧。通常, 共享少于 97.5% 的序列同一性的任何两条链属于不同物种 (Stackebrandt, E. and Embley, M. T. (2000) " Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment ". In: Nonculturable Microorganisms in the Environment, R. R. Colwell and D. J. Grimes (eds). ASM, Press, Washington DC, pp. 57-75)。因此, 2% 的水平序列分歧是相当高的 (Rossell-Mora, R., and Amann, R. (2001). " The Species Concept for Prokaryotes ". FEMS Microbiol. Rev. 25 :39-67), 这表明 Microbispora sp. ATCC PTA-5024 和 Microbispora corallina NRRL30420 (MF-BA-1768) 是不同菌株。

[0039] 对菌株 Microbispora sp. ATCC PTA-5024 的鉴定

[0040] - 生产抗生素 107891 的菌株被归于 Microbispora 属、Streptosporangiaceae 科, 因为其具有下述化学分类学和形态学特征:

[0041] - 细胞壁中存在内消旋二氨基庚二酸;

[0042] - 大量的 MK-9 (III, VIII-H₄) 和根据 Lechevalier et al. (H. A. Lechevalier, C. De Brieve and M. P. Lechevalier, (1977): " Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition ", Bio. chem. Syst. Ecol. 5 :246-260) 的 IV 型磷脂;

[0043] - 3c sensu Kroppenstedt (R. M. Kroppenstedt, (1992): " The genus Nocardiosis ", in: The Prokaryotes, Vol II, , pp. 1139-1156, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer eds; New York, Springer-Verlag) 的脂肪酸情况;

[0044] - 不存在分枝菌酸;

[0045] - 在气生菌丝侧向分支的短孢子梗尖端上孢子特征性纵向对的形成。不能运动的孢子。

[0046] - 16rRNA 基因 (16S rDNA) 的部分序列, 即, 对应于全部 rRNA 的 95% 的 1443 个核苷酸 (示于 SEQ ID NO :1 中) 显示出与已被描述过的 Microbispora 物种的 16S rDNA 序列的 >97% 的同一性。

[0047] 与其它微生物一样, 生产抗生素 107891 的菌株的特征会改变。例如, 可通过用多

种已知诱变剂（例如，紫外线和化学物质，例如亚硝酸、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍等）处理来获得菌株的人工变体和突变体。就本发明的目的而言，菌株 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 的所有能生产抗生素 107891 的天然和人工变体和突变体都视为与该菌株等同，并且因此在本发明的范围内。

[0048] 抗生素 107891 的提取和纯化

[0049] 如上文所述，抗生素 107891 在菌丝体和发酵培养液的经过滤级分中几乎相等地分布。

[0050] 可对收获的培养液进行加工，以使菌丝体和发酵培养液上清液分开，可用水可混溶溶剂对菌丝体加以提取，以在除去没用的菌丝体后，获得含有抗生素 107891 的溶液。然后该菌丝体提取物可被单独加工，或与上清液合并之后一起被加工，这按照下文所述用于上清液级分的程序来进行。当水可混溶溶剂可导致对从菌丝体提取物回收抗生素的操作的干扰时，可通过蒸馏回收水可混溶溶剂，或可用水将其稀释至非干扰浓度。

[0051] 术语“水可混溶溶剂”在本申请中使用时具有该术语的领域中目前给出的含义，其指在使用条件下，其可以以合理宽的浓度范围与水混溶。可用于提取本发明的化合物的水可混溶有机溶剂的例子是：低级烷醇，例如（C₁-C₃）烷醇，例如甲醇、乙醇和丙醇；苯基（C₁-C₃）烷醇，例如苯甲醇；低级酮，例如（C₃-C₄）酮，例如丙酮和甲乙酮（ethyl methylketone）；环状醚，例如二氧杂环己烷和四氢呋喃；二醇及其部分酯化的产物，例如乙二醇、丙二醇和乙二醇单甲醚，低级酰胺，例如二甲基甲酰胺和二乙基甲酰胺；乙酸二甲亚砷和乙腈。

[0052] 从生产微生物的发酵培养液的上清液回收化合物按照本身已知的技术来进行，其包括用溶剂提取、通过加入非溶剂或通过改变溶液的 pH 来进行沉淀、通过分配（partition）色谱、反相分配色谱、离子交换色谱、分子排阻色谱等或两种或多种所述技术的组合来进行。用于从经过滤的发酵培养液回收本发明化合物的程序包括：用水不可混溶有机溶剂提取抗生素 107891，接着沉淀经浓缩的提取物，这可能通过加入沉淀剂来进行。

[0053] 在这种情况下，本申请中使用的术语“水不可混溶溶剂”也具有本领域目前给所述术语的含义，其指下述溶剂，在使用的条件下，所述溶剂在合理宽的浓度范围内，与水略有混溶或者实际上不可混溶，其适用于想要的目的。

[0054] 可用于从发酵培养液提取本发明化合物的水不可混溶有机溶剂的例子是：

[0055] 至少四个碳原子的烷醇，其可以是直的、带支链的或环状的，例如正丁醇、1-戊醇、2-戊醇、3-戊醇、1-己醇、2-己醇、3-己醇、3,3-二甲基-1-丁醇、4-甲基-1-戊醇、3-甲基-1-戊醇、2,2-二甲基-3-戊醇、2,4-二甲基-3-戊醇、4,4-二甲基-2-戊醇、5-甲基-2-己醇、1-庚醇、2-庚醇、5-甲基-1-己醇、2-乙基-1-己醇、2-甲基-3-己醇、1-辛醇、2-辛醇、环戊醇、2-环戊基乙醇、3-环戊基-1-丙醇、环己醇、环庚醇、环辛醇、2,3-二甲基-环己醇、4-乙基环己醇、环辛基甲醇、6-甲基-5-庚烯-2-醇、1-壬醇、2-壬醇、1-癸醇、2-癸醇和 3-癸醇；至少五个碳原子的酮，例如甲基异丙基酮、甲基异丁基酮、甲基正戊基酮、甲基异戊基酮及其混合物。

[0056] 如本领域已知的，从经过滤的发酵培养液提取产物可通过下述方法来改善：调节 pH 为合适的值，和 / 或加入适当的有机盐，与抗生素形成在提取溶剂中可溶的离子对。

[0057] 如本领域已知的，相分离可通过向水相加盐来改善。

[0058] 当提取之后回收含有大量水的有机相时,进行水的共沸蒸馏可能是方便的。通常,这需要加入能与水形成最小共沸混合物的溶剂,如果必要的话,接着加入沉淀剂,以沉淀想要的产物。能与水形成最小共沸混合物的有机溶剂的例子是:正丁醇、苯、甲苯、丁醚、四氯化碳、氯仿、环己烷、2,5-二甲基咪唑、己烷和间二甲苯;优选溶剂是正丁醇。

[0059] 沉淀剂的例子是石油醚、低级烷基醚(例如乙醚、丙醚和丁醚)和低级烷基酮(例如丙酮)。

[0060] 根据用于回收抗生素 107891 的一种优选程序,可将经过滤的发酵培养液与吸附基质接触,接着用极性、水可混溶溶剂或其混合物进行洗脱,在减压下浓缩至油状残余物,用上文提到的类型的沉淀剂进行沉淀。

[0061] 可方便地用于回收本发明的化合物的吸附基质的例子是聚苯乙烯或混合的聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂(例如,M112或S112,Dow Chemical Co.、Amberlite® XAD2或XAD4,Rohm&Haas、Diaion HP20,Mitsubishi)、丙烯酸树脂(例如,XAD7或XAD8,Rohm&Haas)、聚酰胺,例如聚己内酰胺、尼龙和交联的聚乙烯吡咯烷酮(例如,聚酰胺-CC6、聚酰胺-SC6、聚酰胺-CC6.6、聚酰胺-CC6AC和聚酰胺-SC6AC,Macherey-Nagel&Co.,Germany;PA400,M. Woelm AG,Germany);以及聚乙烯吡咯烷酮树脂 PVP-CL(Aldrich Chemie GmbH&Co.,KG,Germany)和受控制的孔交联葡聚糖(例如,Sephadex® LH-20,Pharmacia Fine Chemicals,AB)。优选地,使用聚苯乙烯树脂,特别优选的是 DiaionHP20 树脂。

[0062] 在聚苯乙烯树脂、聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂、聚酰胺树脂和丙烯酸树脂的情况下,优选的洗脱剂是水可混溶溶剂或其水性混合物。水性混合物可含有适当 pH 值的缓冲液。

[0063] 在这种情况下,用于本说明书和权利要求书的术语“水可混溶溶剂”也具有上文所述本领域目前给予所述术语的含义。

[0064] 用于分离和纯化抗生素的后续程序可在来自培养液上清液和来自菌丝体的合并的提取物上进行。例如,当通过在吸收树脂上吸收来回收经过滤的发酵培养液中或上清液中含有的抗生素产品的部分、且用水可混溶溶剂从菌丝体中提取其中含有的抗生素产品的部分、接着吸附到吸收树脂上时,可以合并来自两组吸收树脂中每种洗脱级分,可选地,这在浓缩之后进行,然后将其作为整体批次进行进一步加工。或者,当用于不同提取阶段的两组吸收树脂是同一类型并且具有相同功能特征时,它们可被合并到一起,可对混合物进行整体洗脱步骤,例如,用水可混溶溶剂或其与水的混合物来进行。

[0065] 在任何情况下,无论是否是可用于回收粗制抗生素 107891 的程序,通常在从不同提取阶段产生的产品组合得到的粗制材料的混合物上进行后续纯化步骤。

[0066] 对粗制抗生素 107891 的纯化可通过本身已知的任何技术来完成,但其优选通过色谱程序来进行。这些色谱程序的例子是报道的与回收步骤相关的那些,其还包括固定相(例如硅胶、氧化铝、活化硅酸镁等)上进行的色谱或者硅烷化硅胶上进行的反相色谱(其具有多种衍生官能团,用水可混溶溶剂或上文所述的类型的水可混溶溶剂的水性混合物来进行洗脱)。

[0067] 例如,可使用制备性 HPLC 色谱,其中 RP-8 或 RP-18 作为固定相,用 HCOONH_4 缓冲液: CH_3CN 的混合物作为洗脱体系。

[0068] 从纯化步骤回收的活性级分被合并到一起,在真空下浓缩,通过加入上文所述的

类型的沉淀剂来沉淀,以单轮或多轮进行干燥或冻干。在产品含有残余量的甲酸铵或其它缓冲盐的情况下,它们可通过下述方法被除去:将抗生素 107891 吸收到固相萃取柱(例如, SPE Superclean LCP18Supelco(Bellefonte PA,USA))上,接着用蒸馏水洗,用合适的水性溶剂混合物(例如,乙醇:水)进行洗脱。然后通过除去洗脱溶剂来回收抗生素。

[0069] 从而,获得经纯化的抗生素 107891 复合体干燥制剂,其为白色粉末。

[0070] 如本领域中通常的那样,可通过大量分析程序来监测生产以及回收和纯化步骤,所述程序包括针对易感微生物的抑制试验,以及使用 HPLC 或与质谱偶联的 HPLC 的分析控制。

[0071] 一种优选的分析性 HPLC 技术在装备有柱 Waters Symmetry-shield RP8, 5 μ (250x4.6mm) 的 Waters 设备(Waters Chromathography, Milford, MA) 上进行,以 1ml/min 流速在 50°C 的温度洗脱。

[0072] 洗脱用多步程序来进行:时间=0(30%相 B);时间=8 分钟(30%相 B);时间=28 分钟(40%相 B);相 A 是乙腈:100mM 甲酸铵缓冲液(pH:5.0)5:95(v/v),相 B 是乙腈。UV 检测仪处于 282nm。

[0073] 将来自柱的洗脱液将按照 5:95 的比例分开,将其中的大部分(大约 950 μ l/分钟)转移分流至光电二极管阵列检测仪。剩下的 50 μ l/分钟转移分流至 Finnigan LCQ 离子阱质谱仪(Thermoquest, Finnigan MAT, San JoséCA) 的 ESI 接口。

[0074] 在下述条件下进行质谱分析:

[0075] 样品进口条件:

[0076] Sheat 气 (N₂) 60psi;

[0077] Aux 气 (N₂) 5psi;

[0078] 毛细加热器 250°C;

[0079] 样品进口电压设置:

[0080] 极性正负均有;

[0081] 离子喷雾电压: +/-5kV;

[0082] 毛细电压: +/-19kV;

[0083] 扫描条件:最大离子时间 200ms;

[0084] 离子时间 5ms;

[0085] 完整微扫描 3;

[0086] 片断:持续 30 分钟,扫描事件正 (150-2000m/z) 和负 (150-2000m/z)。

[0087] 在这些分析性 HPLC 条件按下,抗生素 107891 因子 A1 和 A2 分别展示出 13.2 分钟和 13.9 分钟的驻留时间。在同样的 HPLC 系统中, Ramoplanin A2 因子 (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romano, M. Denaro and B. Cavalleri, (1992): " Isolation, structure determination and biological activity of A-16686Factors A ' 1, A ' 2 and A ' 3 glycolipodepsipeptide antibiotics ", J. Ind. Microbiol. 11:13-8) 以 7.5 分钟的驻留时间被洗脱。

[0088] 可通过制备性 HPLC,从抗生素 107891 复合体的经纯化样品分离出抗生素 107891 因子 A1 和 A2。

[0089] 使用 25 分钟线性梯度洗脱(从 30%至 45%的相 B),以 3.5ml 流速,在 Symmetry

Prep. C18 柱上,从经纯化的抗生素 107891 复合体(溶解于 DMSO :甲酸 95 :5 (v/v) 中)分离和纯化因子 A1。

[0090] 相 B 是乙腈。相 A 是 25mM 甲酸铵缓冲液 (pH4.5) :乙腈 95 :5 (v/v)。合并含有纯的抗生素 107891 因子 A1 的洗脱级分,在真空下浓缩。冻干得到的溶液,产生作为白色粉末的纯的因子 A1。

[0091] 在 Symmetry Prep. C18 柱上,通过等度洗脱,从经纯化的抗生素 107891 复合体样品(溶解于乙酸 :乙腈 :100mM 甲酸铵缓冲液 (pH4) 50 :120 :80 (v/v) 混合物中)分离和纯化因子 A2。在 7ml 流速下,用 100mM 甲酸铵缓冲液 (pH4) :乙腈(比例为 82.5 :17.5 (v/v)) 的混合物来进行等度洗脱。合并含有纯的抗生素 107891 因子 A2 的洗脱级分,在真空下浓缩。冻干得到的溶液,产生作为白色粉末的纯的因子 A2。

[0092] 因为(如在 2-甲氧乙醇 (MCS) :H₂O 12 :3 (v/v) 中进行的酸 / 碱滴定所示) 抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 含有碱性官能团,按照传统程序,它们能与合适的酸形成盐,并且它们还可以以游离碱的形式存在。

[0093] 可用酸将以游离碱的形式获得的抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 转化为相应的盐,这包括无毒的可药用盐。合适的盐包括通过与有机酸和无机酸(例如,氢氯酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、三氯乙酸、琥珀酸、柠檬酸、抗坏血酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、帕莫酸 (pamoic)、粘液酸、谷氨酸、樟脑酸、戊二酸、羟基乙酸、酞酸、酒石酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯甲磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸、肉桂酸等酸) 的标准反应形成的那些盐。游离碱形式的抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 的加成盐溶于合适的溶剂(典型地,低级烷醇或低级烷醇 / 水混合物),向获得的溶液中逐渐加入化学计量的合适的选用的酸,通过加入非溶剂来沉淀出所获得的盐。然后再通过过滤或蒸发溶剂回收形成的加成盐。

[0094] 或者,可以通过冻干制备实质上无水的形式的这些盐;在这种情况下,用合适的量的不可挥发酸来溶解抗生素 107891 或其因子 A1 或其因子 A2 与可挥发酸的盐。然后过滤溶液分离任何不可溶解的物质,以单次或多次方式冻干。

[0095] 当加入合适的阴离子时想要的盐会沉淀的情况下,还可从抗生素 107891 或其因子 A1 或其因子 A2 的另一种盐形式的溶液获得加成盐。

[0096] 本发明的非盐化合物向相应的加成盐的转化以及反过来的过程,即,本发明的化合物的加成盐向非盐形式的转化是普通技术人员知识范围内的,并被本发明所包括。

[0097] 抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 的盐的形成可作用于很多目的,包括对所述抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 进行分离、纯化,以及它们作为治疗剂或者动物生长促进剂的用途。就治疗用途而言,通常使用可药用盐。

[0098] 术语“可药用盐”指可用于对温血动物的治疗中的那些无毒盐。

[0099] 抗生素 107891 复合体、其因子 A1 和 A2 以及所述因子的任何比例的混合物可原样施予,或者作为与可药用载体的混合物施予,还可联合其它抗微生物剂(例如,青霉素、头孢菌素、氨基糖苷以及糖肽)施予。

[0100] 联合疗法因此包括顺序、同时以及分别施予活性化合物,施予以下述方式进行,所述方式使得被施予的第一种物质的治疗效应在施予后续物质时不会完全消失。

[0101] 本发明的化合物或其可药用加成盐可被配制为适合非肠道、口服和局部施予的形

式。就在涉及对抗生素易感的微生物的任何感染的治疗中进行的 i. v. 施予而言,非肠道制剂例如处于含有合适的增溶剂(例如,聚丙二醇或二甲基乙酰胺)和表面活性剂(例如,聚乙烯山梨聚糖单油酸酯或聚氧化蓖麻油)的水中,或是灭菌水中的基于环糊精或磷脂的制剂,用于注射。可注射制剂还可用合适的环糊精获得。

[0102] 抗生素 107891 复合体、其因子 A1 和 A2 以及所述因子的任何比例的混合物还可以以合适的药用形式使用,例如胶囊、片剂或水悬浮液,用于口服施予,或者与合适的膏剂或胶冻用于局部应用。除了它们在人类和兽医疗法中作为药剂的用途之外,本发明的化合物还可作为动物生长促进剂来使用。就此目的而言,本发明的化合物在合适的饲料中口服施予。使用的精确浓度是:当消耗正常量的饲料时,提供有效于促进生长的量的活性试剂所需的。

[0103] 将本发明的活性化合物加入到动物饲料中优选通过下述方法来完成:制备合适的饲料预混合物,其中含有有效量的活性化合物,以及将所述预混合物并入完全的配给物中。或者,可将含有活性成分的中间浓缩物或饲料补充剂掺进饲料。此类饲料与混合物以及完全配给物被制备以及施予的方式被描述于参考书(例如"Applied Animal Nutrition", W. H. Freedman and CO., S. Francisco, U. S. A., 1969 或"Livestock Feeds and Feeding" 0and Bbooks, Corvallis, Ore., U. S. A., 1977) 中。

[0104] 抗生素 107891 的物理化学特征

[0105] A) 质谱

[0106] 在 MS 实验中,在配有电喷雾源的 Thermofinnigan LCQ deca 设备上,使用 Thermofinnigan 校正混合物,抗生素 107891 在分别对应于复合体因子 A1 和 A2 的最低同位素组成的 $m/z = 1124$ 和 $m/z1116$ 处显示出了两个双质子化离子。电喷雾条件是:喷雾电压:4.7kV;毛细温度:220°C;毛细电压:3V;灌注模式 $10 \mu l/$ 分钟。从具有 0.1% 三氟乙酸的甲醇:水 80/20(v/v) 中的 0.2mg/ml 溶液来记录谱,其被示于图 1A(完全扫描低分辨率谱)和图 1B(放大扫描高分辨率谱)中。

[0107] B) 用 Bruker FT-IR 光谱仪(型号 IFS48)在 KBr 中记录的抗生素 107891 的红外谱展示出在 3263、2929、1661、1533、1402、1114、1026(cm^{-1}) 的吸收最大值。红外谱示于图 2 中。1631、1596 和 1346 处的吸收条带归结于甲酸铵的残余量。

[0108] C) 在甲醇:H₂O(80:20 的比例)中,使用 Perkin-Elmer 光谱仪 Lambda16 获得的抗生素 107891 的 UV 谱展示出在 226 和 267nm 处的两处肩峰(shoulder)。UV 谱示于图 3 中。

[0109] D) 40°C 时,在 Bruker AMX600 核磁谱仪上,在甲醇-d₄:H₂O(pH4.3HCl)40:10(v/v) 混合物中,记录 ¹H-NMR 谱,其中应用水抑制序列。使用 3.31ppm 的甲醇-d₄ 残余信号作为内标。

[0110] 抗生素 107891 的 ¹H-NMR 谱示于图 4 中。溶解于甲醇-d₄:H₂O(0.01N HCl)40:10(v/v) 中的抗生素 107891 的 ¹H-NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号组(ppm 表示),这是用 MeOH-d₄ 作为内标(3.31ppm), [$\delta =$ ppm, 多重性(归结于)]: 0.93d(CH₃), 0.98d(CH₃), 1.07t(重叠的 CH₃), 1.18t(重叠的 CH₃), 1.26s(CH₃), 1.30t(重叠的 CH₃), 1.62-1.74m(CH₂), 1.78d(CH₃), 1.80d(CH₃), 2.03m(CH₂), 2.24m(CH), 2.36m(CH₂), 2.72-3.8m(肽性 α CH), 3.8-5.2m(肽性 α CH), 5.53-6.08s(CH₂), 5.62d(CH 双键), 6.42m(CH), 6.92d(CH 双键), 7.0-7.55m(芳香族的 CH), 7.62-10.4d 和 m(芳香族的、肽性的 NH)。

[0111] E) 40℃时,在 Bruker AMX600 核磁谱仪上,在甲醇-d₄:H₂O(pH4.3HCl) 40:10(v/v) 混合物中,记录 ¹³C-NMR 谱,其中使用 49.15ppm 的甲醇-d₄ 残余信号作为内标。抗生素 107891 的去偶合 ¹³C-NMR 谱 bb 示于图 5 中。

[0112] 溶解于甲醇-d₄:H₂O(0.01N HCl) 40:10(v/v) 中的抗生素 107891 的 ¹³C-NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号组(ppm 表示),这是用 MeOH-d₄ 作为内标(49.15ppm), [δ = ppm, (归结于)]:13.6-23.2(脂肪族 CH₃), 26.16-73(脂肪族的 CH₂ 以及肽性 α CH), 105-136(芳香族的以及双键 CH 和季碳), 164.3-176.3(肽性羰基)。

[0113] F) 抗生素 107891 复合体溶解于 2-甲氧乙醇(MCS):H₂O 12:3(v/v) 中,其中含有 0.01M 氢氯酸的摩尔过量。然后用 0.01N 氢氧化钾溶液对溶液进行反滴定。得到的滴定曲线显示出一个碱性可离子化官能团。

[0114] 抗生素 107891 及其因子 A1 和 A2 的氨基酸组成

[0115] A) 测定抗生素 107891 复合体中的“抗酸”氨基酸

[0116] 对抗生素 107891 进行完全酸水解(HCl 6N, 105℃, 24h), 鉴定出抗酸处理的抗生素的氨基酸部分。用这种方法,酸不稳定氨基酸不能被检测到。合适的衍生化之后,通过 HPLC-MS 和 GC-MS 分析来研究水解产物,将其与经过类似衍生化的标准氨基酸的混合物相比较。对于 HPLC 分析而言,用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯(AccQ-Tag™Fluor 试剂盒)处理经水解的样品;对于 GC 分析而言,用无水甲醇中的 3N HCl 和三氟乙酸酐的混合物来处理样品。

[0117] 在同时具有 DAD 和 MS 探测的液相色谱系统上进行定量 HPLC 分析。HPLC 方法具有下述条件:

[0118] 柱:AccQ-Tag™(Waters C18NovoPak4 μ m3. 9x150mm)

[0119] 柱温:37℃

[0120] 流:1mL/分钟

[0121] 相 A:乙酸铵 140mM pH5(乙酸)

[0122] 相 B:水:乙腈 60:40(v/v)

[0123] 洗脱程序

[0124]

时间(分钟)	0	5	30	35	40	41
% B	5	5	80	95	95	5

[0125] UV 探测:254nm

[0126] MS 条件是下述这些:

[0127] 质谱仪:装备有标准电喷雾源的 Finnigan LCQ Deca

[0128] 毛细温度:250℃

[0129] 源电压:4.70kV

[0130] 源电流:80 μ A

[0131] 毛细电压:-15V

[0132] 在配有 MS-EI 探测的气相色谱上进行定量 GC 分析。

[0133] GC 方法使用如下条件:

[0134] 柱:J&W Scientific DB-5, 30mx0.254mm IDx0.25 μ m FT

[0135] 载气:氮

- [0136] 注射模式 :无分流
- [0137] 注射器温度 :200℃
- [0138] 转移导管温度 :300℃
- [0139] 温度程序 :从 50℃至 100℃,以 2.5℃ / 分钟进行 (10 分钟),从 100℃至 250℃,以 10℃ / 分钟进行 (15 分钟),250℃进行 15 分钟
- [0140] 注射体积 :1 μ l
- [0141] MS 条件是下述这些 :
- [0142] 质谱仪 :Finigan TSQ700
- [0143] 离子化模式 :电子冲击
- [0144] 电压设置 :
- [0145] 灯丝电流 :400mA
- [0146] 电子倍增器 :1400V
- [0147] 电子能量 :70eV
- [0148] 正离子模式
- [0149] 扫描条件 :
- [0150] 扫描范围 :40-650amu
- [0151] 扫描时间 :1 秒
- [0152] 在抗生素 107891 的水解产物上获得的 LC/MS 和 GC/MS 谱图中,鉴定出了下述氨基酸 (还有其它未鉴定的峰):羊毛硫氨酸、甲基羊毛硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸、缬氨酸、天冬氨酸 (NMR 研究表明,这是天冬酰胺的转化产物,天冬酰胺通过水解产生天冬氨酸)、苯丙氨酸和亮氨酸。
- [0153] 在与关于复合体报道的条件同样的条件 (衍生化和 HPLC-MS) 下,对抗生素 107891 的因子 A1 和 A2 进行完全酸水解。在装备有 PTV 注射器的 Thermo Finnigan Trace GC-MS 设备上进行分析。
- [0154] GC 方法具有下述条件 :
- [0155] 柱 :Restek RTX-5MS, 15mx0.25mm IDx0.25 μ m FT
- [0156] 载气 :氦
- [0157] 界面温度 :250℃
- [0158] 温度程序 :50℃,1.5 分钟,从 50℃至 100℃,以 20℃ / 分钟进行 (10 分钟),100℃,1 分钟,从 100℃至 135℃,以 20℃ / 分钟进行,135℃,1 分钟,从 135℃至 250℃以 20℃ / 分钟进行,在 250℃进行 1 分钟
- [0159] 注射体积 :1 μ l
- [0160] 注射器 :无分流模式,基础温度 50℃,转移温度 280℃,转移速率 14.5℃ / 分钟
- [0161] MS 条件是下述这些 :
- [0162] 离子化模式 :电子冲击
- [0163] 电压设置 :
- [0164] 灯丝电流 :149 μ A
- [0165] 电子倍增器 :200V
- [0166] 电子能量 :70eV

[0167] 正离子模式

[0168] 扫描条件：

[0169] 扫描范围：33-500amu

[0170] 扫描时间：0.6 秒

[0171] 在抗生素 107891 的因子 A1 的水解产物中，HPLC/MS 和 GC/MS 色谱展示了下述氨基酸与其它未鉴定的峰的共同存在：羊毛硫氨酸、甲基羊毛硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸、缬氨酸、天冬氨酸（NMR 研究表明，这是天冬酰胺的转化产物，天冬酰胺通过水解产生天冬氨酸）、苯丙氨酸和亮氨酸。

[0172] 在因子 A2 上进行的上述程序揭示了下述氨基酸与其它未鉴定的峰的共同存在：羊毛硫氨酸、甲基羊毛硫氨酸、甘氨酸、脯氨酸、缬氨酸、天冬氨酸（NMR 研究表明，这是天冬酰胺的转化产物，天冬酰胺通过水解产生天冬氨酸）、苯丙氨酸和亮氨酸。

[0173] B) 对抗生素 107891 复合体中以及其因子 A1 和因子 A2 中的 5- 氯色氨酸加以测定

[0174] 按照 Simpson RJ, Neuberger MR, Liu TY, " Complete Aminoacid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate ". Journal Biol. Chem(United States), April 10, 1976, 251(7), 1936-40 所述的方法，对经纯化的 107891 复合体及其单因子 A1 和 A2 进行完全水解。

[0175] 该水解程序预防了在矿物质酸消化期间通常不稳定的氨基酸的降解，因此允许对来自肽的水解产物的这些氨基酸（包括色氨酸）加以测定。5- 氯 -DL- 色氨酸的标准样品购自 Biosynt AG, Staad, Switzerland, 通过 NMR 分析验证其结构；DL- 色氨酸购自 Merck KGaA, Darmstadt, Germany。

[0176] 将因子 A1 (1.5mg) 悬浮于 0.6ml 4N 甲磺酸（含有 0.2% (w/v) 3-(2-氨基乙基) 吡啶作为用于水解的催化剂）中。水解在 115°C 进行 16 小时。然后用 5N NaOH 中和水解产物，用等量蒸馏水稀释。通过 LC-MS 对 100 μ l 该溶液进行分析。分离在装备有 Symmetry C18 (5 μ m) 3.9x20mm 前柱 (precolumn) 的 Symmetry C₁₈ (5 μ m) 4.6x250mm 柱 (Waters Co. Milford MA, USA) 上进行。洗脱以 1ml/分钟流速进行 25 分钟，其中使用 0% 至 50% 相 B 的线性梯度。相 A 是 25mM HCOONH₄ 缓冲液 (pH 4.5)；CH₃CN 95:5 (v/v)，相 B 是 CH₃CN。UV 探测在 280nm 进行。HPLC 设备偶联有 Finnigan LCQ 离子阱质谱仪 (Thermoquest, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA)。将来自柱的洗脱液以 50 μ l/分钟转入 LCQ 质谱仪的电喷雾离子化 (ESI) 界面。MS 分析在下述条件下进行：样品进口：剪切气 (N₂)，60psi；毛细加热器，210°C；样品进口电压极性：正负均有；离子喷雾电压，+/-4.5KV；毛细电压，+/-21V；扫描条件：最大离子时间 50ms；完全微：扫描 3。

[0177] 色氨酸和 5- 氯色氨酸的标准物在 8.1 分钟和 11.5 分钟的驻留时间被洗脱下来，这分别对应于 m/z 205 和 239 处的 M+H⁺。在抗生素 107891 因子 A1 的水解产物中，11.5 分钟 (238.97 处的 m/z) 的峰表明了 5- 氯色氨酸的存在。

[0178] 具有 0.3 μ g/ml 探测极限的色谱系统可用来探测标准色氨酸。该值低于能指示出测试抗生素样品中所述氨基酸存在的值。在上述极限内，在抗生素 107891 因子 A1 的水解产物色谱图中没有探测到色氨酸。从对因子 A2 的水解产物和对抗生素 107891 复合体的经纯化样品的水解产物进行的 LC-MS 分析获得了相同的结果。

[0179] 对抗生素 107891 因子 A1 和因子 A2 的质谱

[0180] 抗生素 107891 因子 A1 在 $m/z = 1124$ 时显示出了双重质子化离子, 因子 A2 在 $m/z 1116$ 处显示, 这对应于使用 ThermoFinnigan 校正混合物, 在配有电喷雾源的 ThermoFinnigan LCQ deca 设备上进行的 MS 实验中的最低同位素组成。电喷雾条件是: 喷雾电压: 4.7kV; 毛细温度: 250°C; 毛细电压: 8V; 灌注模式, 10 μ l/分钟。从乙腈:水 50:50 (v/v) 的 0.1mg/ml 溶液 (具有 0.5% 乙酸) 记录谱, 其被示于图 6A (完全扫描低分辨率谱) 和图 6B (放大扫描高分辨率谱) 以及图 7A (完全扫描低分辨率谱) 和图 7B (放大扫描高分辨率谱) 中。

[0181] 通过使用配有电喷雾源的 Bruker Daltonics APEX II, 4.7Tesla 质谱仪, 已测定了抗生素因子 A1 和因子 A2 的精确质量。基于这些数据, 因子 A1 被赋予了 2246.71 ± 0.06 的分子量, 这是从 $m/z 1124.36124$ (精确度 30ppm) 的 $[M+2H]^{2+}$ 计算得到的单同位素质量, 这通过高分辨率 ESI-FTMS 来测定。因子 A1 被赋予了 2230.71 ± 0.06 的分子量, 这是从 $m/z 1116.36260$ (精确度 30ppm) 的 $[M+2H]^{2+}$ 计算得到的单同位素质量, 这通过高分辨率 ESI-FTMS 来测定。

[0182] 对抗生素 107891 因子 A1 及 A2 与抗生素 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 的比较

[0183] A) 从 NNRL collection 获得 US6, 551, 591B1 描述的 Microbisporacoralline NNRL30420 (MF-BA-1768)。在该探索实验中, 在 US6, 551, 591B1 描述的条件, 在 Erlenmeyer 瓶中, 发酵 M. coralline NNRL30420 (MF-BA-1768) 菌株。通过用甲醇稀释来对收获的培养液加以提取。离心菌丝体之后, 将上清液上样至 HP20 聚苯乙烯吸收树脂, 用甲醇:水 70:30 混合物加以洗脱, 其被减少为小体积, 然后冻干。

[0184] 在色谱图中, 两个峰显示出了 1091 和 1108 $[M+2H]^{2+}$ 信号, 这对应于 6, 551, 591B1 中针对 MF-BA-1768 β_1 和 MF-BA-1768 α_1 分别报道的 $[M+2H]^{2+}$ 。

[0185] 然后向上述提取物加入抗生素 107891 因子 A1 和 A2, 通过 LC-MS 分析该混合物。我们发现: 抗生素 MF-BA-1768 β_1 和 MF-BA-1768 α_1 的峰以及抗生素 107891 因子 A1 和 A2 的峰具有不同的驻留时间以及不同的 $[M+2H]^{2+}$ MS 片段。

[0186] B) 在进一步的实验中, 进行对 Microbispora sp. 菌株 NRRL20420 (MF-BA-1768) 的 301 罐式发酵, 按照 US6, 551, 591B1 的描述来对收获的培养液进行加工。在 HP20 聚苯乙烯树脂和聚酰胺 CC60.1-0.3mm (Macherey-Nagel) 树脂上顺序进行纯化步骤之后, 通过制备性 HPLC 获得以纯的形式存在的两种单独的物质, 所述 HPLC 在 μ 10 颗粒尺寸 C18 Phenomenex (Torrance CA, USA) Luna (250x12.2mm) 柱上进行, 以流速 27ml/分钟洗脱, 使用下述多步骤程序: 时间 = 0 (32% 的相 B); 时间 = 8 分钟 (32% 的相 B); 时间 = 20 分钟 (36% 的相 B); 时间 = 32 分钟 (90% 的相 B)。相 A 是水中的 0.05% 甲酸 (v/v), 相 B 是 CH_3CN 。

[0187] 这些物质展示出针对葡萄球菌和肠球菌的抗细菌活性, 如表 IV 所示。在 LC-MS 实验中, 两种物质展示出 $[M+2H]^{2+}$ 双重质子化离子信号, 所述信号对应于 US 专利 6, 551, 591 所述的抗生素 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 。

[0188] 表 IV

[0189]

菌株	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	MF-BA-1768 α_1	MF-BA-1768 β_1	107891 A1	107891 A2	107891 复合体
1400 <i>Staphylococcus aureus</i> cl. isol. Met r	0.13	0.5	0.13	0.13	0.13
568 <i>Enterococcus faecium</i> cl. isol.	4	16	1	2	2
569 <i>Enterococcus faecium</i> cl. isol. Van A	4	8	1	2	2
559 <i>Enterococcus faecalis</i> cl. isol.	4	8	1	2	1
560 <i>Enterococcus faecalis</i> cl. isol. Van A	4	8	0.5	1	0.5

[0190] 抗微生物试验的实验条件与用于下表 VI 中报道的试验的条件相同。

[0191] 对经分离的抗生素 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 的 LC-MS 分析在装备有 Symmetry C18(5 :m)3.9x20mm 前柱的 Symmetry C₁₈(5 :m)4.6x250mm 柱 (Waters ;Milford MA,USA) 上进行 (都保持在温度为 50℃ 的烘箱中)。洗脱以 1ml/ 分钟的流速进行,其采用下述多步骤洗脱程序 :时间 = 0(30% 的相 B) ;时间 = 8 分钟 (30% 的相 B) ;时间 = 20 分钟 (45% 的相 B) ;时间 = 24 分钟 (90% 相 B) ;以及时间 = 28 分钟 (90% 相 B)。相 A 是 25mM HCOONH₄ 缓冲液 (pH4.5) :CH₃CN95 :5(v/v),相 B 是 CH₃CN。HPLC 设备偶联有 Finnigan LCQ 离子阱质谱仪 (Thermoquest, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA)。将来自柱的洗脱液以 100 μ l/ 分钟转入 LCQ 质谱仪的 ESI 接口。MS 分析在下述条件下进行 :样品进口 :sheat 气流 (N₂), 25psi ;aux 气流, 5psi ;毛细加热器, 210℃ ;样品进口电压极性 :正负均有 ;离子喷雾电压, +/-4.75KV ;毛细电压, +/-12V ;扫描条件 :最大离子时间 50ms ;完全微 :扫描 3。

[0192] 各抗生素因子 MF-BA-1768 α_1 和 MF-BA-1768 β_1 以及抗生素 107891 因子 A1 和 A2 单独以及在混合物中被分析。结果概括于下表 V 中。

[0193] 表 V

[0194]

	驻留时间 (分钟)	[M+2H] ²⁺
MF-BA-1768 β_1	12.86	1091
抗生素 107891A1	16.3	1124
抗生素 107891A2	16.81	1116
MF-BA-1768 α_1	18.1	1108

[0195] 在同样的色谱系统中,雷莫拉宁 (ramoplanin) 因子 A2(L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romano, M. Denaro and B. Cavalleri, (1992) : " Isolation, structure determination and biological activity

of A-16686Factors A' 1,A' 2and A' 3glycolipodepsipeptideantibiotics ",J. Ind. Microbiol. 11 :13-18) 以 11.00 分钟的驻留时间被洗脱。

[0196] 抗生素 107891 因子 A1 和 A2 的 NMR 谱

[0197] 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上,应用水抑制序列 (water suppression sequence), 于 298K, 在 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 混合物中记录抗生素 107891 因子 A1 和因子 A2 的 1H -NMR 谱。乙腈 -d3 在 1.94ppm 的残余信号作为内标考虑。

[0198] A) 抗生素 107891 因子 A1 的 1H -NMR 谱示于图 8 中。

[0199] 溶解于 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 中的抗生素 107891 因子 A1 的 1H -NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号的组 (以 ppm 表示), 其中用 CD_3CN 作为内标 (1.94ppm), $[\delta = ppm, 多重性; (归结于)]$: 0.84d(CH_3), 0.89d(CH_3), 0.94t(重叠的 CH_3), 1.1d(CH_3), 1.13d(CH_3), 1.15t(重叠的 CH_3), 1.49m(CH_2), 1.69d(CH_3), 1.75m(CH_2), 2.11m(CH), 2.26m(CH), 2.5m(CH_2), 2.68-3.8m(肽性 CH_β), 3.8-5.0m(肽性 CH_α), 5.45-6.17s(CH_2), 5.58d(CH 双键), 6.36m(CH), 6.86d(CH 双键), 7.0-7.45m(芳香族 CH)。二甲基亚砷信号以 2.58ppm 存在, 甲酸酯信号还以 8.33ppm 存在, 作为杂质。

[0200] B) 抗生素 107891 因子 A2 的去偶合 1H -NMR 谱 bb 示于图 9 中。

[0201] 溶解于 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 中的抗生素 107891 因子 A2 的 1H -NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号的组 (以 ppm 表示), 其中用 CD_3CN 作为内标 (1.94ppm), $[\delta = ppm, 多重性; (归结于)]$: 0.84d(CH_3), 0.88d(CH_3), 0.94d(CH_3), 1.06d(CH_3), 1.14d(CH_3), 1.48m(CH_2), 1.65-1.75m(CH_2), 1.67d(CH_3), 2.15m(CH), 2.25m(CH), 2.5m(CH_2), 2.77-3.8m(肽性 CH_β), 3.8-4.9m(肽性 CH_α), 5.45-6.14s(CH_2), 5.59d(CH 双键), 6.34m(CH), 6.84d(CH 双键), 7.0-7.42m(芳香族 CH)。二甲基亚砷信号以 2.58ppm 存在, 甲酸酯信号还以 8.32ppm 存在, 作为杂质。

[0202] 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上, 于 298K, 在 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 混合物中记录抗生素 107891 因子 A1 和因子 A2 的 ^{13}C -NMR 谱, 乙腈 -d3 在 1.39ppm 的残余信号用作为内标。

[0203] C) 抗生素 107891 因子 A1 的 ^{13}C -NMR 谱示于图 10 中。溶解于 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 中的抗生素 107891 因子 A1 的 ^{13}C -NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号的组 (以 ppm 表示), 其中用 CD_3CN 作为内标 (1.39ppm), $[\delta = ppm, (归结于)]$: 13.6-23.03(脂肪族 CH_3), 25.69-77.9(脂肪族 CH_2 和肽性 CH_α), 105-137.3(芳香族和双键 CH 和季碳), 165.6-176.6(肽性羰基)。

[0204] D) 抗生素 107891 因子 A2 的 ^{13}C -NMR 谱示于图 11 中。溶解于 $CD_3CN :D_2O(1 :1)$ 中的抗生素 107891 因子 A1 的 ^{13}C -NMR 谱在 600MHz 展示出下述信号的组 (以 ppm 表示), 其中用 CD_3CN 作为内标 (1.39ppm), $[\delta = ppm, (归结于)]$: 13.6-22.9(脂肪族 CH_3), 25.65-73(脂肪族 CH_2 和肽性 CH_α), 105-137.3(芳香族和双键 CH 和季碳), 165.7-176.1(肽性羰基)。

[0205] 抗生素 107891 因子 A1 和 A2 的 UV 和 I.R 谱

[0206] A) 用 Bruker FT-IR 光谱仪 (型号 IFS48) 在 KBr 中记录的抗生素 107891 因子 A1 的红外谱展示出在 3294、3059、2926、1661、1529、1433、1407、1287、1114、1021 处 (cm^{-1}) 的吸收最大值。红外谱示于图 12 中。

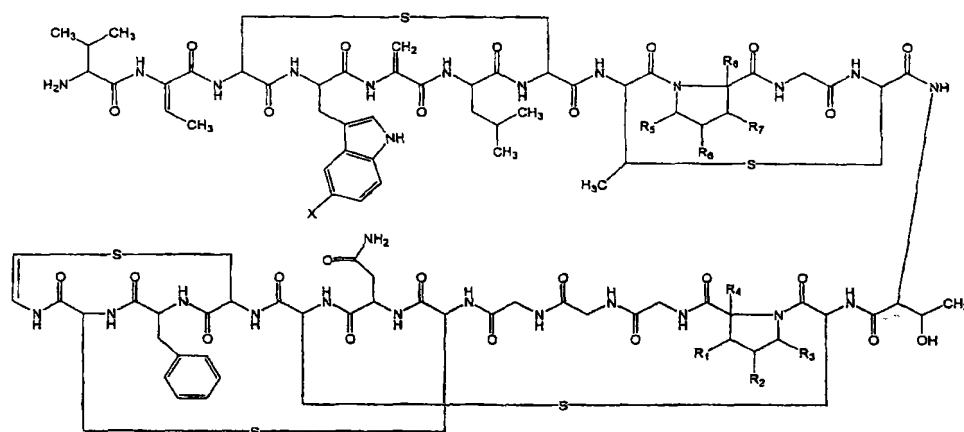
[0207] B) 在甲醇 : H_2O 80 :20 (v/v) 中, 使用 Perkin-Elmer 光谱仪 Lambda16 获得的抗生素 107891 因子 A1 的 UV 谱展示出在 226 和 267nm 处的两处肩峰。UV 谱示于图 13 中。

[0208] C) 用 Bruker FT-IR 光谱仪 (型号 IFS48) 在 KBr 中记录的抗生素 107891 因子 A2 的红外谱展示出在 3296、3060、2928、1661、1529、1433、1407、1288、1116 处 (cm^{-1}) 的吸收最大值。红外谱示于图 14 中。

[0209] D) 在甲醇 :H₂O 80 :20 (v/v) 中, 使用 Perkin-Elmer 光谱仪 Lambda16 获得的抗生素 107891 因子 A2 的 UV 谱展示出在 226 和 267nm 处的两处肩峰。UV 谱示于图 15 中。

[0210] 基于上述物理化学数据, 认为抗生素 107891 具有下述结构式:

[0211]



[0212] 其中, X 是卤素 (F、Cl、Br、I), 其中 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 可以独立地是 H、OH、烷基 (带支链的或不带支链的、被取代的或未被取代的) 或芳基 (被取代的或未被取代的)。

[0213] 在一种替代性实施方式中, R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 可以是 H 或 OH。因此, R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 的可能组合包括下述这些:

[0214]

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H
H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

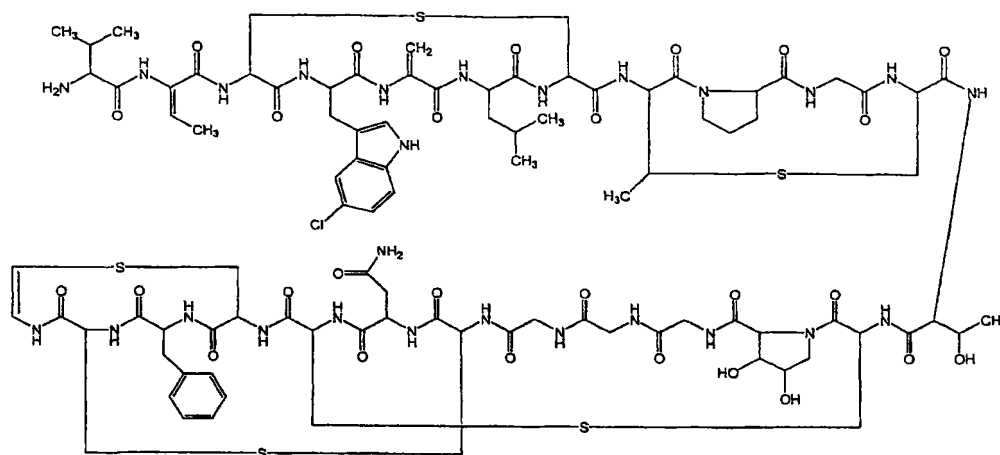
[0215] 类似地, R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 可以是 H 或 OH。因此, R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 的可能组合包括下述这些:

[0216]

R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H
H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

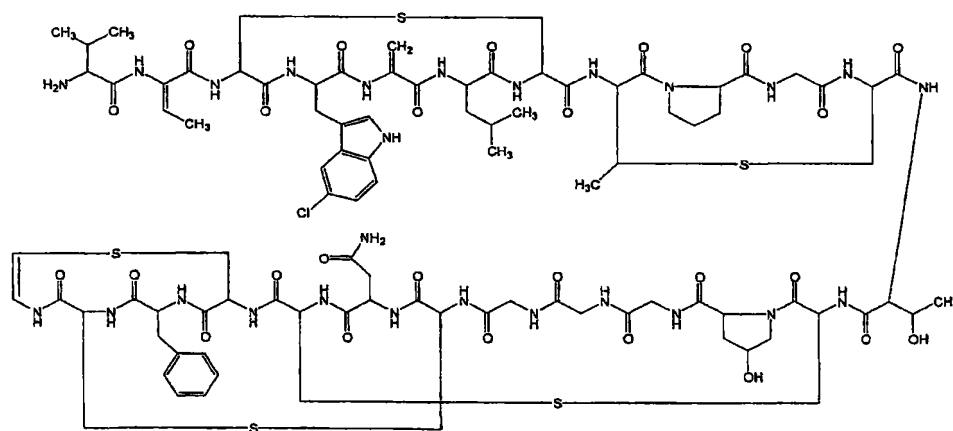
[0217] 此外,基于上述物理化学数据,可将下述结构式指派给抗生素 107891 的因子 A1,其中, X 是 Cl, R₁ 是 H, R₂ 是 OH, R₃ 是 H, R₄、R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 是 H,这和其可药用盐一起都是本发明的优选实施方式:

[0218]



[0219] 此外,基于上述物理化学数据,可将下述结构式指派给抗生素 107891 的因子 A2,其中, X 是 Cl, R₁ 是 OH, R₂ 是 OH, R₃ 是 H, R₄、R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 是 H,这和其可药用盐一起都是本发明的优选实施方式:

[0220]



[0221] 抗生素 107891 的体外生物活性

[0222] 通过按照 National Committee for Clinical Laboratory Standards recommendations (NCCLS, document M7-A5) 所述的培养基微稀释 (microdilution) 方法, 测定抗生素 107891 的抗微生物活性。

[0223] 所用的菌株是来自 American Type Culture Collection (ATCC) 的菌株或临床分离株。试验结果示于表 VI 和表 VII 中。

[0224] 将抗生素 107891 溶解于 DMSO 中, 以获得 1000 μ g/ml 贮液, 随后在水中稀释以获得工作溶液。所用的培养基是: 对 Staphylococci、M. catarrhalis、Enterococci 和 L. monocytogenes 而言, 阳离子受调节的 Mueller Hinton 培养基 (CAMHB); 对于 Streptococci 而言, Todd Hewitt 培养基 (THB); 对于 Neisseria spp. 而言, GC 培养基 + 1% Isovitalex + 1% haemine; 对于 H. influenzae 而言, Brain Heart Infusion + 1% C 补充剂; 对于 Lactobacilli 而言, Lactobacillus 培养基; 对于 M. smegmatis 而言, 富含 Middlebrook OADC 的 Middlebrook 7H9; 对于 C. albicans 而言 RPMI 1640 培养基; 对于 Clostridia 而言, Wilkins Chalgren 培养基 + 去氧酶 (oxyrase) (1:25v/v); 对于 Propionibacteria 而言, 含有半胱氨酸 (cysteine) (0.5g/L) 的 Brucella 培养基。细菌接种体为 10^5 CFU/ml。C. albicans 接种体为 1×10^4 CFU/ml。所有试验都在存在 0.02% 牛血清清蛋白 (BSA) 的情况下进行。培养物在 35°C 空气下温育, 除了 Clostridia 和 Propionibacteria 菌株之外, 它们需要厌氧气氛。18-24 小时后, 进行目测读数, 测定 MIC。MIC 被定义为没有可见生长时抗生素的较低浓度。

[0225] 表 VI: 抗生素 107891 的抗微生物活性

[0226]

微生物		MIC ($\mu\text{g/ml}$)
		107891
819	<i>Staph. aureus</i> Smith ATCC19636	≤ 0.13
4061	<i>Staph. aureus</i> LIMI	≤ 0.13
3798	<i>Staph. aureus</i> 临床分离株 VISA	2
1400	<i>Staph. aureus</i> 临床分离株 Met-R	≤ 0.13
613	<i>Staph. aureus</i> 临床分离株 Met-R	≤ 0.13
3797	<i>Staph. aureus</i> 临床分离株 VISA Me	2
4064	<i>Staph. aureus</i> LDM2 GISA Met-R	0.5
1729	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	8
1730	Met-S	2
147	<i>Staph. epidermidis</i> ATCC12228	≤ 0.13
1139		4
44	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	≤ 0.13
2868	Pen-I	< 0.13
49	<i>Strept. pyogenes</i>	≤ 0.13
535	<i>Ent. faecalis</i> Van-S	1
560	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	0.5
A533	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	1
568	<i>Ent. faecium</i> Van-S	2
569	<i>Ent. faecium</i> Van-A	1
B518	<i>Ent. faecium</i> Van-A	2
A6345	<i>Ent. faecium</i> Van-A Lin-R	4
3754	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
834	<i>Listeria garviae</i>	≤ 0.13
148	<i>Listeria delbrueckii</i> ATCC4797	4
1450	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.125
823	<i>Haemophilus influenzae</i>	32
970	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 19418	32
3924	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1
76	<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC8176	0.25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC13080	0.5
997	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.25
47	<i>Escherichia coli</i>	>128
145	<i>Candida albicans</i>	>128

[0227] 表 VII : 抗生素 107891 针对厌氧细菌的抗微生物活性

[0228]

微生物	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
	抗生素 107891
ATCC 27520 <i>Propionibacterium limphophilum</i>	0,015
ATCC 25564 <i>Propionibacterium granulosum</i>	0,03
ATCC 14157 <i>Propionibacterium propionicus</i>	4
P9 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
1329 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,5
ATCC 25746 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,015
ATCC 6919 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
ATCC 6922 <i>Propionibacterium acnes</i>	$\leq 0,0039$
ATCC 1348 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,25
4018 <i>Clostridium difficile</i>	$\leq 0,125$
4025 <i>Clostridium difficile</i>	$< 0,125$
4022 <i>Clostridium difficile</i>	$\leq 0,125$
4032 <i>Clostridium perfringens</i>	$< 0,125$
4043 <i>Clostridium butyricum</i>	$\leq 0,125$
4009 <i>Clostridium beijerinckii</i>	$\leq 0,125$
4052 <i>Clostridium septicum</i>	$\leq 0,125$
60601 <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	> 128

[0229] 抗生素 107891 展示出了针对革兰氏阳性细菌的良好抗细菌活性。

[0230] 针对 *Staphylococcus* spp. (包括甲苯氧青霉素抗性 (MSRA) 和糖肽中间产物 (GISA) 抗性菌株) 的 MIC 范围为 0.13-4 $\mu\text{g/ml}$, 针对 *Enterococcus* spp. (包括万古霉素抗性 (VRE)) 的近来临床分离株的 MIC 范围为 0.5-4 $\mu\text{g/ml}$ 。针对 *Streptococcus* spp. 的 MIC 为 $\leq 0.13 \mu\text{g/ml}$ 。

[0231] 抗生素 107891 对厌氧革兰氏阳性菌株也有活性。针对 *Clostridia* 的 MIC 为 $\leq 0.13 \mu\text{g/ml}$; 针对 *Propionibacteria* 为 $\leq 0.004-4 \mu\text{g/ml}$ 。针对 *L. monocytogenes* (MIC 0.125 $\mu\text{g/ml}$) 和 *Lactobacilli* 菌株 (MIC 范围 $\leq 0.13-4 \mu\text{g/ml}$) 也显示了抗微生物活性。一些革兰氏阴性细菌对抗生素 107891 易感; MIC 为: 对 *M. catharralis* 而言, 1-0.25 $\mu\text{g/ml}$, 对 *Meisseria* spp. 而言, 0.5-0.25 $\mu\text{g/ml}$, 对 *H. influenzae* 而言, 32 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0232] 抗生素 107891 对于测试的 *E. coli* 和 *C. albicans* 菌株没有活性。

[0233] 在时间-杀死 (time-kill) 实验中, 抗生素 107891 展示出针对 *S. aureus* GISA 和 *E. faecalis* VanA 菌株的杀细菌活性; 在 24 小时, Mueller Hinton 培养基中杀细菌浓度为 MIC 值。

[0234] *S. aureus* 可导致对生命有威胁的感染, MRSA 临床上特别重要, 因为其对所有青霉素和头孢菌素以及多种其它抗生素都有抗性; 此外, 其容易以患者-患者形式传播, 导致感染爆发, 这与保健机构重点相关 (W. Witte, (1999): "Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:1-9)。The Centers for Disease Control (CDC) National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS) 报道, 美国医院中 *S. aureus* 的甲苯氧青霉素抗性从 1975 年的 2.4% 增加直 1991 年的 29%, 在加强护理单元中具有更高层次的抗性

(L. Archibald, L. Philips, D. Monnet, J. E. Jr Mc Gowan, F. Tenover, R. Gaynes, (1997) : " Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States : increasing importance of the intensive care unit ", *Clinic Infect. Dis.* 24 :211-5)。医院葡萄球菌感染与相当大的发病率和致死率相关,这延长了住院持续期,并增加了住院成本。MSRA 菌株中的大多数对于最常使用的抗微生物剂(包括目前使用的大环内酯类,氨基糖苷类以及 β -内酰胺抗生素,包括最新一代的头孢菌素)中的很多都有抗性。

[0235] 具有万古霉素抗性的、在医院获得的、导致感染(例如心内膜炎、脑膜炎和败血症)的病原体日益成为治疗的挑战(Y. Cetinkaya, P. Falk and C. G. Mayhall, (2000) : " Vancomycin-resistant enterococci ", *Clin. Microbiol. Rev.* 13 :686-707 ;L. B. Rice, (2001) : " Emergence of vancomycin-resistant enterococci ", *Emerg. Infec. Dis.* 7 :183-7)。

[0236] *S. pneumoniae* 和 *M. catarrhalis* 被认为是重要的人类病原体。它们是呼吸道感染(特别是儿童中耳炎和老年人的下呼吸道感染)的常见诱因。*S. pneumoniae* 和 *M. catarrhalis* 近来已被认为是呼吸道的最常见病原体(M. C. Enright and H. McKenzy, (1997) : " *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen ", *J. Med. Microbiol.* 46 :360-71)。

[0237] *Clostridia* 能导致多种疾病:气性坏疽和相关的创伤性感染、破伤风、肉毒杆菌中毒(botulism)、抗生素相关的腹泻(CDAD)和伪膜性结肠炎(pseudomembranous colitis)。这些微生物中的大多数产生外毒素,外毒素在疾病发病机理中有着重要作用。*C. difficile* 是致病剂,其导致 25% 的 CDAD 以及几乎所有的伪膜性结肠炎。过去数年来,在具有万古霉素抗性肠球菌感染或定位(colonization)的患者中已出现了 *C. difficile* 共感染(J. G. Bartlett, (1992) : " Antibiotic associated diarrhea ", *Clinic. Infect. Dis.* 15 :573-581)。

[0238] 抗生素 107891 因子 A1 和 A2 的体外生物学活性

[0239] 表 VIII 报道了抗生素 107891 的各因子 A1 和 A2 的抗微生物活性。通过上文所述的微培养液稀释方法来测定 MIC。

[0240] 表 VIII :抗生素 107891 因子 A1 和 A2 的抗微生物活性

[0241]

微生物		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		因子 A1	因子 A2
819	<i>Staph. aureus</i> Met-S	≤ 0.03	≤ 0.03
1524	<i>Staph. aureus</i> Met-R	≤ 0.03	≤ 0.03
2235	<i>Staph. aureus</i> Met-R	0.06	0.06
3894	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	≤ 0.03	0.06
3881	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	0.06	≤ 0.03
602	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	0.25	0.25
3919	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-R	≤ 0.0015	≤ 0.0015
3915	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	≤ 0.0015	≤ 0.0015
4323	<i>Ent. faecalis</i> VanA	≤ 0.03	≤ 0.03
J1	<i>Ent. faecalis</i> VanA	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> VanB	0.5	0.5
4397	<i>Ent. faecalis</i> VanB	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> VanB	2	2
6349	<i>Ent. faecium</i> Van A LNZ-R	2	2
4	<i>Ent. faecium</i> Van A	1	1
3	<i>Ent. faecium</i> Van A	0.5	0.5
D561	<i>Ent. faecium</i> Van A	2	2
A8	<i>Ent. faecium</i> Van A	0.5	0.5
4339	<i>Ent. faecium</i> VanD	0.25	0.25
4174	<i>Ent. gallinarum</i>	1	1
997	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.5	0.25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i>	0.25	0.25
1016	<i>Propionibacterium. acnes</i>	≤ 0.03	0.06

[0242] 抗生素 107891 的体内生物学活性

[0243] 重量为 23-25g 的雌性 ICR 小鼠 (Harlan Italia SpA-S.Pietro alNatisone, Italy) 被用于在有免疫活性或中性粒细胞缺乏的小鼠中进行的急性致死性感染实验。中性粒细胞缺乏是通过在小鼠感染之前四天及一天分别腹腔施予 200 和 100mg/kg 环磷酰胺来诱导的。

[0244] 在有免疫活性的小鼠中, 通过腹膜内接种甲氧苯青霉素抗性葡萄球菌的临床

分离株 (Staph. aureus SA3817) 或标准甲氧苯青霉素易感菌株 (Staph. aureus Smith ATCC19636) 的细菌悬浮液来诱导感染, 或者在中性粒细胞缺乏的小鼠中通过接种糖肽抗性肠球菌的临床分离株 (Ent. faecalis A533) 来诱导感染。提供悬浮于 0.5mL5% 细菌粘蛋白 (Difco) 中的细菌攻击 (challenge) (大约 10^6 个细胞 / 小鼠)。未受处理的动物在感染后 24-72 小时内死亡。攻击之后 10-15 分钟内开始进行抗生素处理。抗生素 107891 以不同水性配方一次性静脉 (iv) 或皮下 (sc) 施予。通过 Spearman-Kärber 方法 (D. J. Finney, (1952): "The Spearman-Kärber method", in: Statistical methods in biological assay, pp. 524-530, Charles Griffin & Co., Ltd., London), 从第 7 天存活的动物百分比来计算 50% 有效剂量 (ED_{50}) 和 95% 置信极限。结果示于下表 IX 中。

[0245] 抗生素 107891 在高达 200mg/kg 的最大测试剂量时仍无毒性。

[0246] 表 IX 抗生素 107891 在小鼠急性致死性感染中的 ED_{50} 。

[0247]

配方	菌株	途径	ED_{50} mg/kg	95% 置信极限
A	MSSA	iv	2.1	1.7-2.7
		sc	2.1	1.7-2.7
		iv	3.2	2.7-3.9
A	VanA	sc	11.1	9.2-13.5
		sc	4.2	3.5-5.1
		iv	3.7	2.8-4.9
B	MRSA	sc	12.7	10.7-15.0
C	VanA			

[0248] 配方:

[0249] A: 10% (v/v) DMSO、10% (w/v) β 羟丙基环糊精 (Sigma)、 H_2O 中 80% (v/v) 的 5% (w/v) 葡萄糖

[0250] B: 10% (v/v) DMSO、0.1M 水性 CH_3COOH 中 40% (v/v) 的 PEG400

[0251] C: H_2O 中 50% (v/v) 的 PEG400

[0252] 菌株:

[0253] I. MSSA: Staph. aureus Smith819ATCC19636

[0254] II. MRSA: Staph. aureus 3817, 临床分离株

[0255] III. VanA: Ent. faecalis A533, 临床分离株, 在中性粒细胞缺乏小鼠中

附图说明

[0256] 图 1A (完全扫描低分辨率谱) 和 1B (放大扫描高分辨率谱) 代表抗生素 107891 的质谱, 其展示出 m/z 1124 和 m/z 1116 处的双重质子化离子。

[0257] 图 2 代表分散于 KBr 中的抗生素 107891 的 I. R. 吸收谱。

[0258] 图 3 代表甲醇: H_2O 中溶解的抗生素 107891 的 UV 谱。

[0259] 图 4 代表 40°C 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上 (应用水抑制序列时) 甲醇- d_4 : H_2O (pH4. 3HCl) 40:10 (v/v) 混合物中记录的 1H -NMR 谱。

[0260] 图 5 代表 40°C 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上甲醇- d_4 : H_2O (pH4. 3HCl) 40:10 (v/v)

混合物中记录的¹³C-NMR谱。

[0261] 图 6A(完全扫描低分辨率谱)和 6B(放大扫描高分辨率谱)代表抗生素 107891 因子 A1 的质谱,其展示出 m/z1124 处的双重质子化离子 [M+2H]²⁺。

[0262] 图 7A(完全扫描低分辨率谱)和 7B(放大扫描高分辨率谱)代表抗生素 107891 因子 A2 的质谱,其展示出 m/z1116 处的双重质子化离子 [M+2H]²⁺。

[0263] 图 8 代表 298K 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上(应用水抑制序列时)CD₃CN :D₂O(1 : 1) 混合物中记录的抗生素 107891 因子 A1 的¹H-NMR 谱。

[0264] 图 9 代表 298K 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上(应用水抑制序列时)CD₃CN :D₂O(1 : 1) 混合物中记录的抗生素 107891 因子 A2 的¹H-NMR 谱。

[0265] 图 10 代表 298K 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上 CD₃CN :D₂O(1 :1) 混合物中记录的抗生素 107891 因子 A1 的¹³C-NMR 谱。

[0266] 图 11 代表 298K 在 Bruker AMX600 核磁谱仪上 CD₃CN :D₂O(1 :1) 混合物中记录的抗生素 107891 因子 A2 的¹³C-NMR 谱。

[0267] 图 12 代表分散于 KBr 中的抗生素 107891 的因子 A1 的 I. R. 吸收谱。

[0268] 图 13 代表甲醇 :H₂O 中溶解的抗生素 107891 的因子 A1 的 UV 谱。

[0269] 图 14 代表分散于 KBr 中的抗生素 107891 的因子 A2 的 I. R. 吸收谱。

[0270] 图 15 代表甲醇 :H₂O 中溶解的抗生素 107891 的因子 A2 的 UV 谱。

[0271] 实施例

[0272] 实施例 1 *MicrobisDora* sp. ATCC PTA-5024 的发酵方法

[0273] 28°C时将 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 菌株保持于燕麦琼脂斜面上,保持 2-3 周。用 5ml 灭菌水刮下一个斜面上的微生物内容,将其接种进 500ml Erlenmeyer 瓶,其中含有 100ml 种子培养基 (AF/MS),该培养基组成为 (g/l) :右旋糖,20 ;酵母提取物,2 ;大豆粗粉,8 ;NaCl,1 和碳酸钙,4。在蒸馏水中制备培养基,在 121°C 灭菌 20 分钟之前将 pH 调节为 7.3。在以 200rpm 运转的旋转式摇床上,于 28°C 培养经接种的瓶。4-6 天后,取该培养物的 5%,接种进含有同样的发酵培养基的第二系列的瓶。72 小时温育之后将 200ml 转移进含有 3l 同样的营养培养基的 4l 生物反应器中。

[0274] 发酵在 30°C、700rpm 搅拌和 0.5vvm 通气下进行。72 小时后,将培养物 (1.5l) 转移进含有 15l 相同的营养培养基的 20l 生物反应器中。发酵在 30°C、500rpm 搅拌和 0.5vvm 通气下进行 48 小时,然后转移至生产罐。在含有 200l 生产培养基 M8 的 300l 发酵罐中进行对抗生素 107891 的生产,所述培养基 M8 组成为 :淀粉,20 ;葡萄糖,10 ;酵母提取物,2 ;水解的酪蛋白,4 ;肉类提取物,2 和碳酸钙,3。在去离子水中制备培养基,在 121°C 灭菌 25 分钟之前将 pH 调节为 7.2。冷却后,用大约 14l (7%) 预培养物对发酵罐接种。在 29°C、180rpm 搅拌和 0.5vvm 通气下运行发酵罐,顶部压力为 0.36bar。在发酵 96 小时后对发酵罐进行收获。

[0275] 用同样体积的甲醇提取所有培养液之后,通过前文所述的 HPLC 来监测抗生素 107891 的生产。提取在室温搅拌下进行 1 小时。

[0276] 实施例 2 *MicrobisDora* sp. ATCC PTA-5024 的替代性发酵方法

[0277] 将 *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 接种进含有 100ml 生长培养基 (G1) 的 500ml Erlenmeyer 瓶中,该培养基组成为 (g/l) :葡萄糖,10 ;麦芽糖,10 ;大豆油,10 ;大豆粗粉,

8 ;酵母提取物,2 和碳酸钙,4。在去离子水中制备培养基,在 120°C 灭菌 20 分钟,无需 pH 调节。在 28°C 对经接种的瓶温育 120-168 小时,这在 200rpm 搅拌下进行,直到观察到良好的生长。然后用该瓶接种 (3%)41 生物反应器,其中含有 31 种子培养基 AF/MS,该培养基组成如实施例 1 所述。30°C、700rpm 搅拌以及 0.5vvm 通气下进行 120 小时的发酵后,取 1.51 培养物转移进 201 生物反应器,其中含有 151 同样的营养培养基。发酵在 30°C、600rpm 搅拌和 0.5vvm 通气下进行 96 小时,然后转移进生产罐。

[0278] 在含有 2001 生产培养基 (V6) 的 3001 发酵罐中获得对抗生素的生产,该培养基 V6 组成为 (g/l):右旋糖,20 ;酵母提取物,5 ;肉类提取物,5 ;经水解酪蛋白,3 ;蛋白胨,5 以及 NaCl,1.5。在用 NaOH 调节至 pH7.5 的去离子水中制备培养基,在 121°C 灭菌 20 分钟。

[0279] 用 141 种子培养物 (7%) 接种发酵罐,发酵在 29°C,180rpm 搅拌及用每分钟 1001 标准空气 (0.5vvm) 通气下进行。通过按照前文所述的 HPLC 来监测抗生素 107891 的生产。大约 160 小时对发酵进行收获。

[0280] 实施例 3 回收抗生素 107891

[0281] 通过正切过滤 (tangential filtration) 系统 (0.1 μ m 孔径的膜, KochCarbo-Cor, Koch Wilmington, USA), 对实施例 1 中所述的发酵培养液加以过滤, 以获得 1701 上清液和 301 经浓缩的菌丝体。在滤液 (A) 和菌丝体 (B) 中都发现了抗生素 107891 复合体。

[0282] (A) 在室温下,存在 Diaion HP-20 聚苯乙烯树脂 (41) 的情况下,对经过滤的培养液加以搅拌。然后回收树脂,用 101 甲醇 :水 4 :6 (v/v) 加以洗涤,分批进行洗脱,最开始用 101 甲醇 :水 9 :1 (v/v),然后用 101 甲醇 :丁醇 :水 (9 :1 :1) (v/v) 来进行洗脱。在旋转式蒸发仪上将含有抗生素 107891 的合并洗脱级分浓缩至小体积,然后冷冻干燥,产生 32g 粗材料。将该粗材料溶解于正丁醇 (1 升) 中,然后用 800ml 水顺序提取三次。在减压下浓缩有机相至油状残余物,其溶解于甲醇中。加入石油醚后,通过沉淀获得 5g 粗制抗生素制剂。

[0283] (B) 加入 251 甲醇后,对含有菌丝体的保留物部分进行 1 小时搅拌,过滤以获得 451 菌丝体提取物。然后用水 (201) 对该溶液加以稀释,在室温下用 Diaion HP-20 聚苯乙烯树脂 (11) 搅拌一夜。然后回收树脂,用 21 甲醇 :水 40 :60 (v/v) 进行洗涤,用 31 甲醇 :水 85 :15 (v/v) 以及接着用 21 甲醇 :水 90 :10 (v/v) 顺序分批洗脱。通过对 *Staphylococcus aureus* 进行的琼脂分散试验,以及通过前文所述的分析用 HPLC 方法,针对抗生素 107891 对洗脱级分加以监测。

[0284] 合并含有抗生素 107891 的洗脱级分,在减压下浓缩,冷冻干燥,产生 8.1 克粗制抗生素 107891。

[0285] 实施例 4 对抗生素 107891 的替代回收方法

[0286] 将从实施例 2 所述的 2001 发酵罐中收获的培养液调节为 pH6.8,通过正切过滤 (0.1 μ 孔径的膜, Koch Carbo-Cor) 对培养液加以过滤。在室温下,用 21Diaion HP20 树脂 (Mitsubishi Chemical) 对渗透物 (1801) 进行过夜分批搅拌,然后收集树脂。

[0287] 向含有浓缩菌丝体的正切过滤设备中的保留物部分 (大约 201) 加入甲醇 (251)。对该悬浮液进行 1 小时搅拌,然后用微过滤系统过滤至残余保留物体积为大约 201。然后加入额外的甲醇 (251),顺序重复上述过程,总共 5 个循环。用 1601 去矿物质水稀释合并的甲醇提取物 (大约 1251),在室温下用 31Diaion HP20 树脂分批搅拌过夜。然后收集树脂,

与按照前述过程用于提取培养液渗透物的 Diaion HP20 树脂合并。用 20:1 水:甲醇 6:4(v/v) 在色谱柱中洗合并的树脂。用 23:1 甲醇:50mM 甲酸铵缓冲液 (pH3.5):正丁醇 9:1:1(v/v) 对抗生素 107891 加以洗脱。然后在真空下浓缩该洗脱液至终体积为 31。然后将经浓缩的溶液于 pH4.5 上样至 2.51 聚酰胺 CC60.1-0.3mm(Macherey-Nagel) 的柱,该柱用水:甲醇 7:3(v/v) 进行过调节。用水:甲醇 7:3(v/v) 洗该柱,然后用 25mM 甲酸铵缓冲液 (pH3.5):甲醇 7:3(v/v) 洗。用水:甲醇 3:7(v/v),然后 1:9(v/v) 的混合物的对抗生素加以洗脱。用 1:9 比例的 25mM 甲酸铵缓冲液 (pH2.8):甲醇完成洗脱。合并含有抗生素 107891 的洗脱物,在真空下浓缩至终体积为 11。用 7M 氢氧化铵将经浓缩溶液的 pH 从 4 调节至 5.7,然后离心混合物,以收集沉淀。将该固体悬浮于水中,冷冻干燥,产生 6.96g 抗生素 107891 制剂。

[0288] 实施例 5 对抗生素 107891 的纯化

[0289] 通过中等压力色谱,在 100g 反相 C8(EC)40-70 μ m 颗粒尺寸、60A 孔径、IST(International Sorbent Technology, Mid-Glamorgan, UK) 上,使用装备有 B-687 梯度形成器 (gradient former)、B-684 级分收集器、B-685 玻璃柱 70X460mm 的 Büchi B-680 Medium Pressure Chromatography System (Büchi laboratoriums-technik AG, Flawil Switzerland),对按照实施例 3 制备的粗制抗生素 107891 (3.6g) 加以纯化。用相 A:相 B 8:2(v/v) 的混合物对树脂预先进行调节,然后以 25ml/分钟,用 60 分钟线性梯度 (60 分钟内,从 20%至 60%的相 B) 对树脂进行洗脱。

[0290] 相 A 是乙腈:20mM 甲酸铵缓冲液 (pH6.6) 10:90(v/v),相 B 是乙腈:20mM 甲酸铵缓冲液 (pH6.6) 90:10(v/v)。

[0291] 合并含有抗生素 107891 的级分,在真空下浓缩,冻干两次除水,产生 430mg 的经纯化抗生素 107891。

[0292] 实施例 6 通过制备性 HPLC 来纯化抗生素 107891

[0293] 通过在 Hibar prepacded lichrosorb RP8 (7 μ m 颗粒尺寸) 柱 RT250-25mm, Merck 上进行制备性 HPLC 来对抗生素 107891 进行进一步纯化,其中以 30ml/分钟的流速,使用 25 分钟的线性梯度洗脱 (从 30%至 45%的相 B)。相 A 是 25mM 甲酸铵缓冲液 (pH4.5):乙腈 95:5(v/v),相 B 是乙腈。

[0294] 将来自实施例 5 的抗生素 107891 样品 (300mg) 溶解于 1.5ml 350:1 DMSO:甲酸 95:5(v/v) 中,每次色谱加工 300 μ l。典型地,抗生素 107891 在 15-16 分钟被洗脱。5 次色谱的洗脱级分 (含有抗生素 107891 的) 被收集起来,在真空下浓缩。对残余溶液顺序冻干三次除水,产生作为白色粉末的 31mg 抗生素 107891。

[0295] 实施例 7 对抗生素 107891 的各因子 A1 和 A2 进行分离和纯化

[0296] 通过制备性 HPLC,使用两种不同的洗脱程序,在 Symmetry Prep C18 (7 μ m 颗粒尺寸) 柱 7.8x300mm Waters (Mildfold USA) 上,从实施例 5 的抗生素 107891 复合体分离和纯化因子 A1 和 A2。

[0297] A) 以 3.5ml 流速,通过 25 分钟线性梯度洗脱 (从 30%至 45%的相 B) 来纯化因子 A1。相 A 是 25mM 甲酸铵缓冲液 (pH4.5):乙腈 95:5(v/v),相 B 是乙腈。将经纯化的抗生素 107891 复合体 (15mg) 溶解于 350 μ l DMSO:甲酸 95:5(v/v) 中,每次色谱加工这么多的复合体。典型地,A1 和 A2 因子在 11-13 分钟的时间段被洗脱出来。然后通过 HPLC,在上

文所述的分析条件下对洗脱级分加以分析。合并含有纯的抗生素 107891 因子 A1 的 14 次色谱的级分,在真空下浓缩。对得到的溶液顺序进行三次冻干除水,产生了 15mg 作为白色粉末的纯因子 A1。

[0298] B) 通过用 100mM 甲酸铵缓冲液 (pH4) :乙腈 82.5 :17.5 (v/v) 以 7ml 流速进行等度洗脱来纯化因子 A2。将经纯化的抗生素 107891 复合体 (5mg) 溶解于 250 μ l 乙酸 :乙腈 :100mM 甲酸铵缓冲液 (pH4) 50 :120 :80 (v/v) 混合物中,每次色谱加工这么多复合体。典型地, A1 和 A2 因子在 9-10 分钟的时间段被洗脱出来。通过 HPLC,在上文所述的分析条件下对洗脱级分加以分析。合并含有纯的抗生素 107891 因子 A2 的 20 次色谱的级分,在真空下浓缩。对得到的溶液顺序进行两次冻干除水,产生了 8mg 作为白色粉末的纯因子 A2。

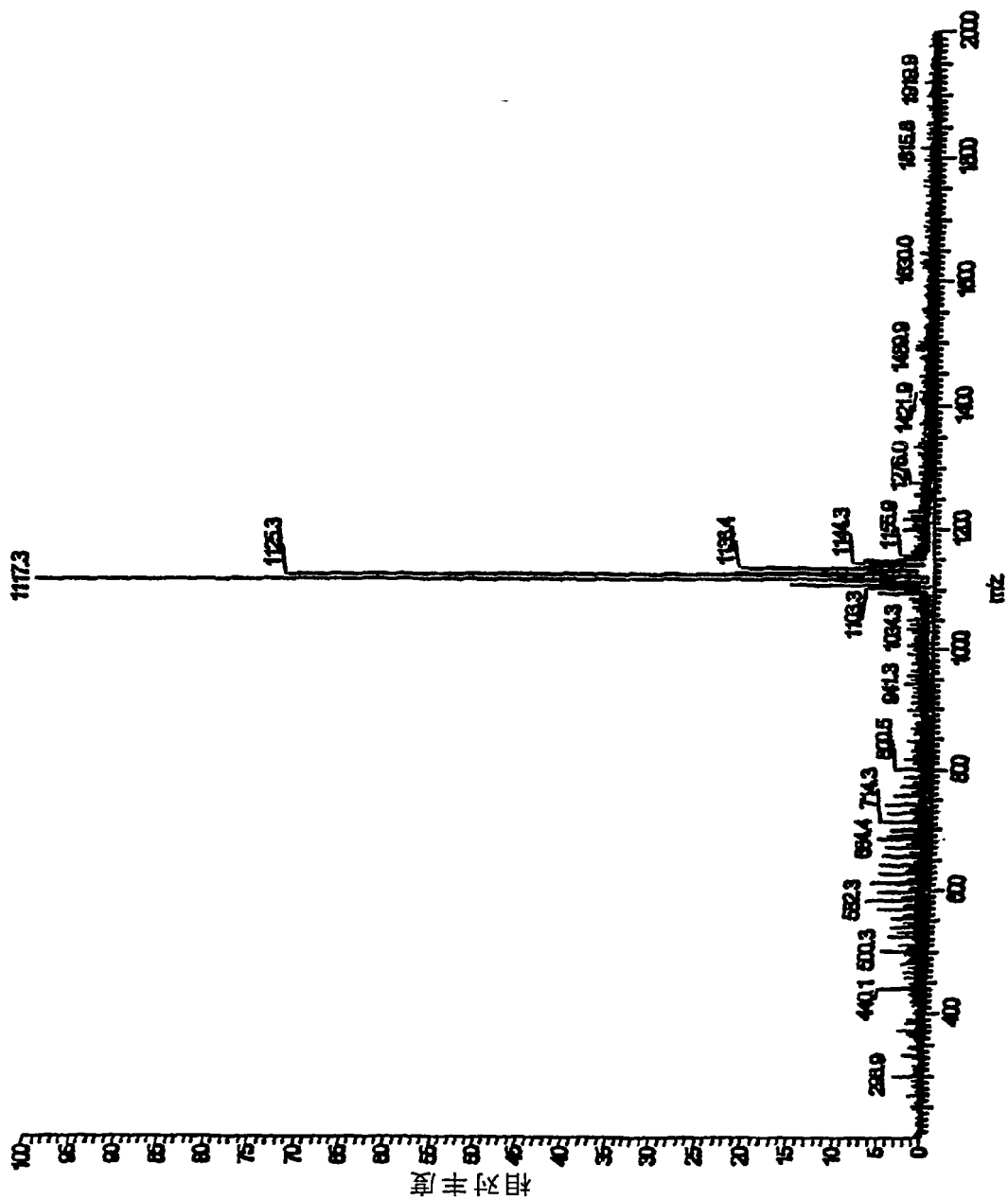


图1A

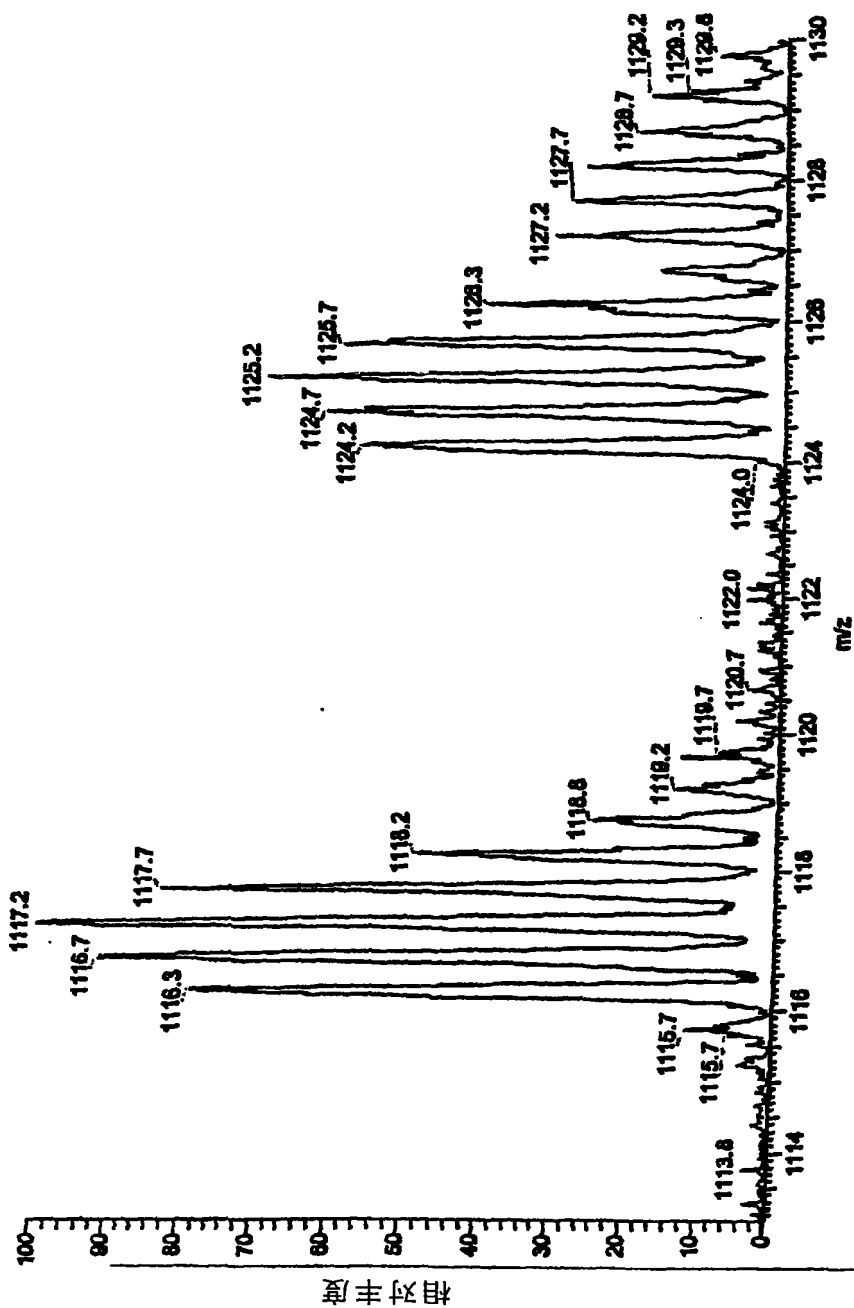


图1B

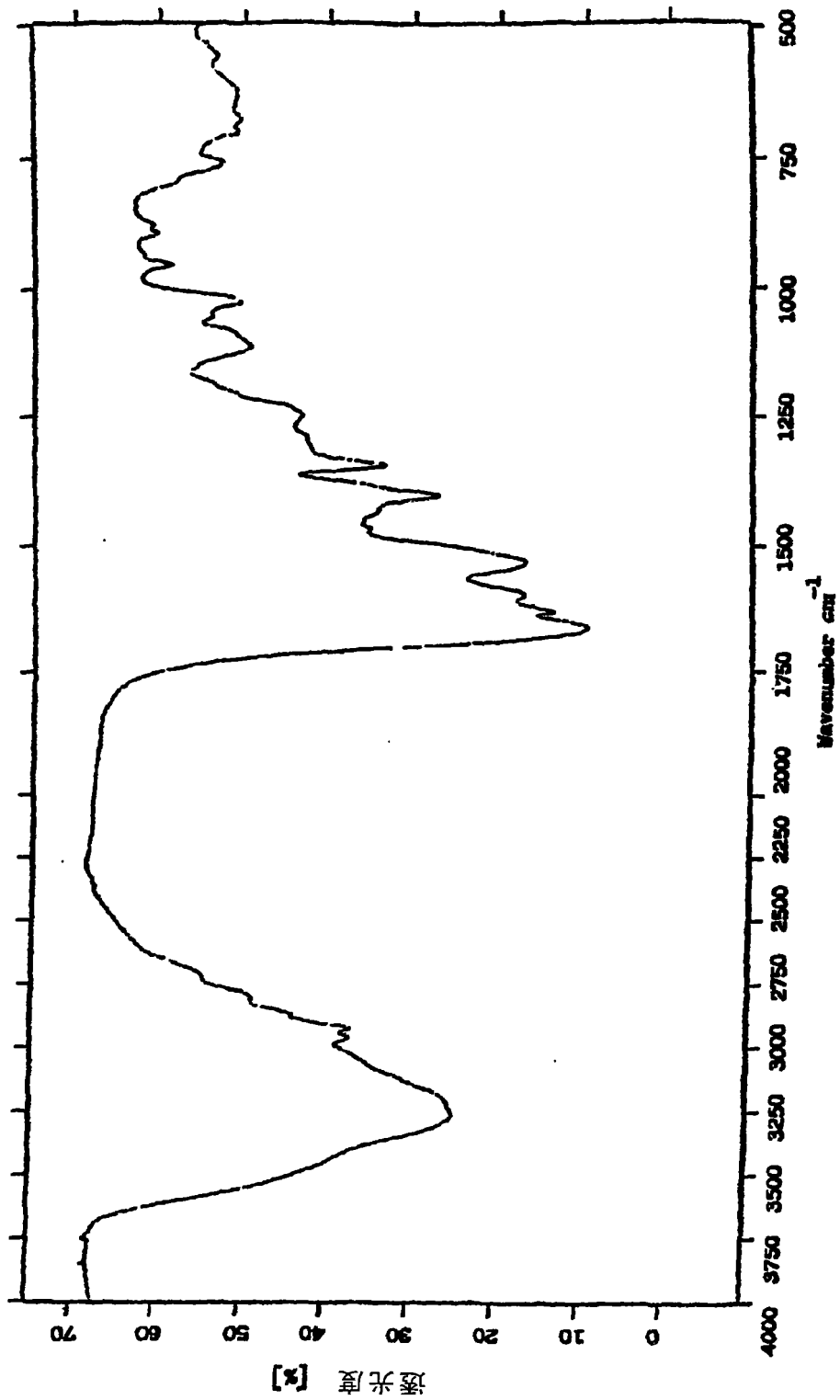


图2

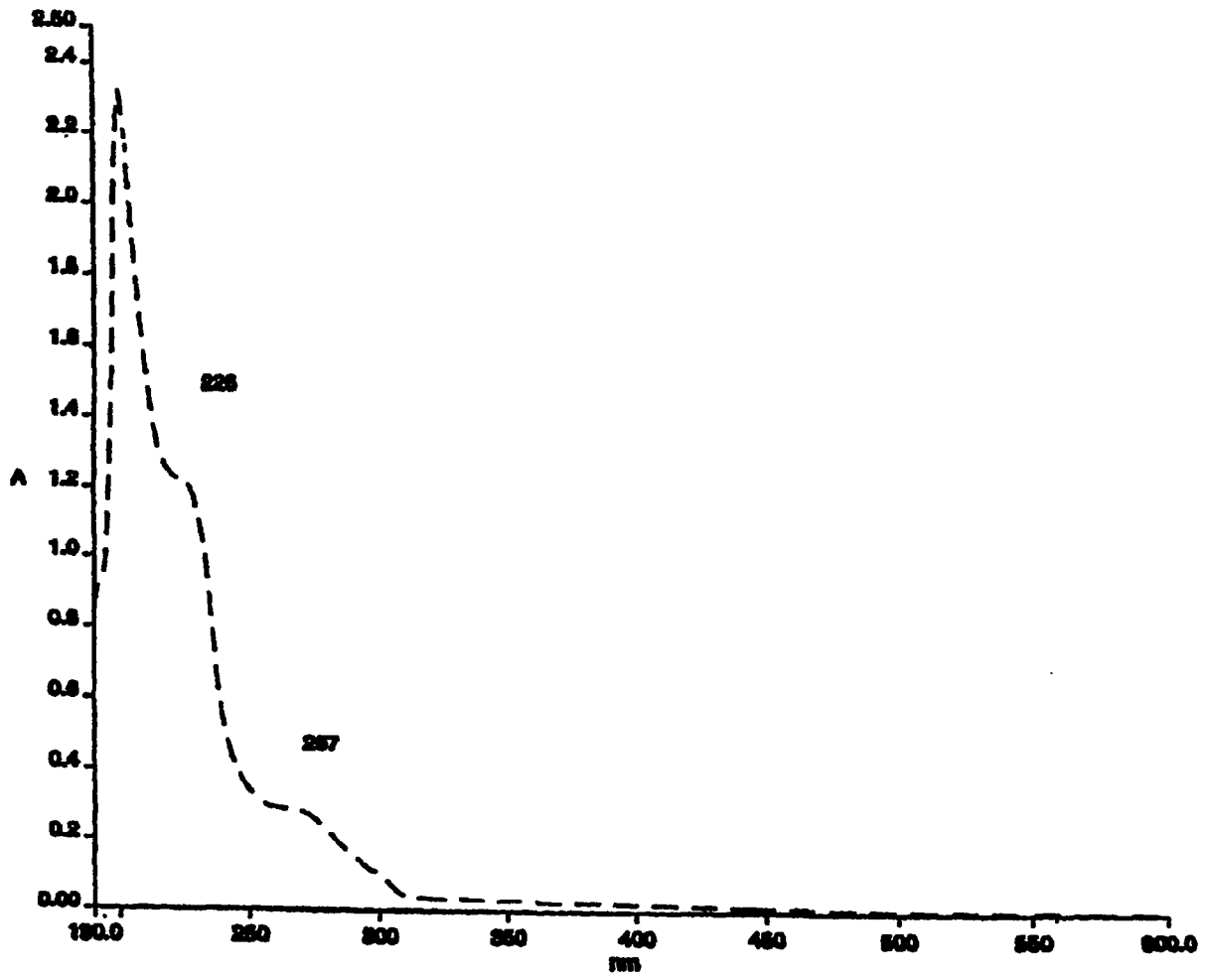


图3

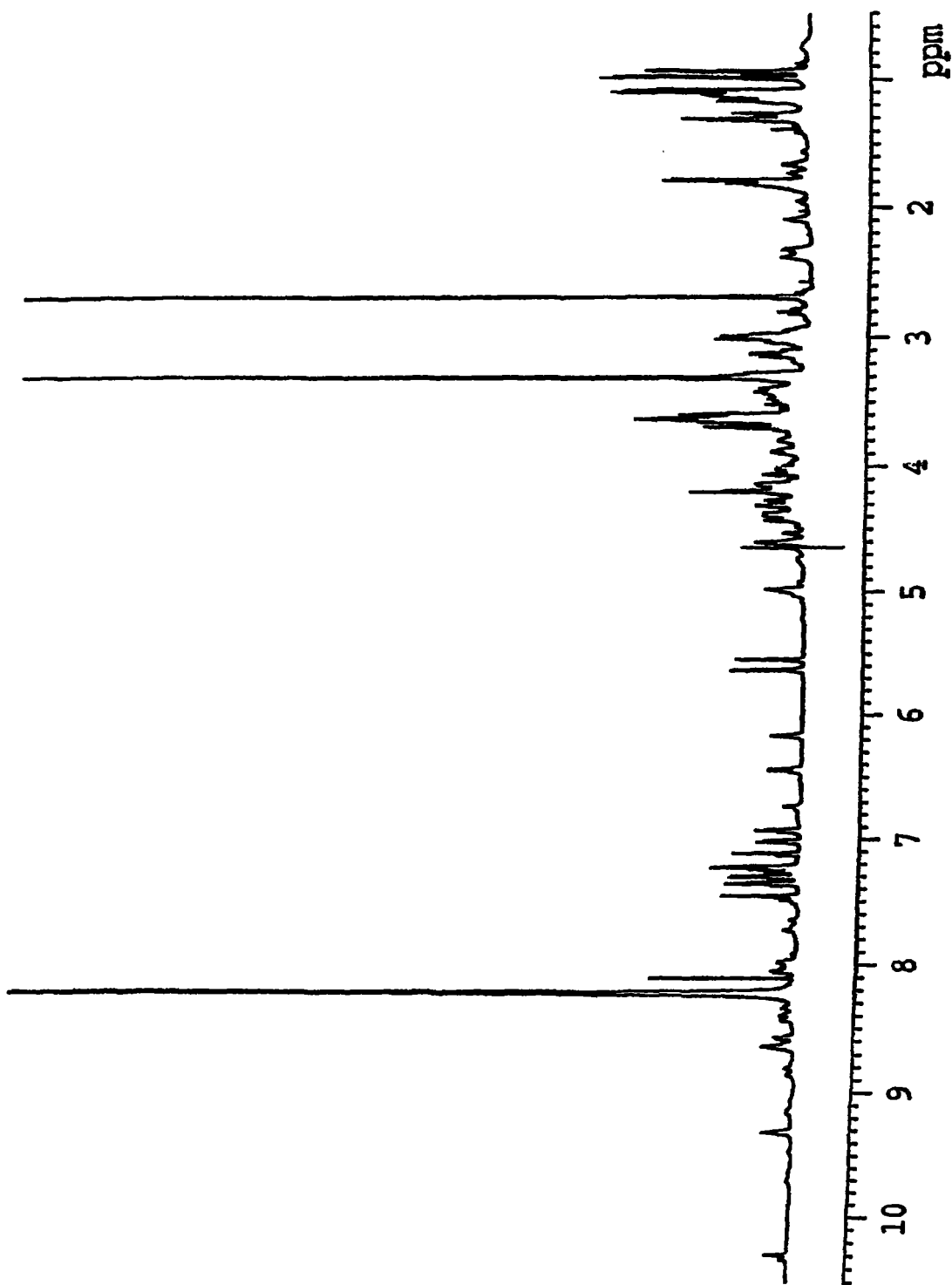


图4

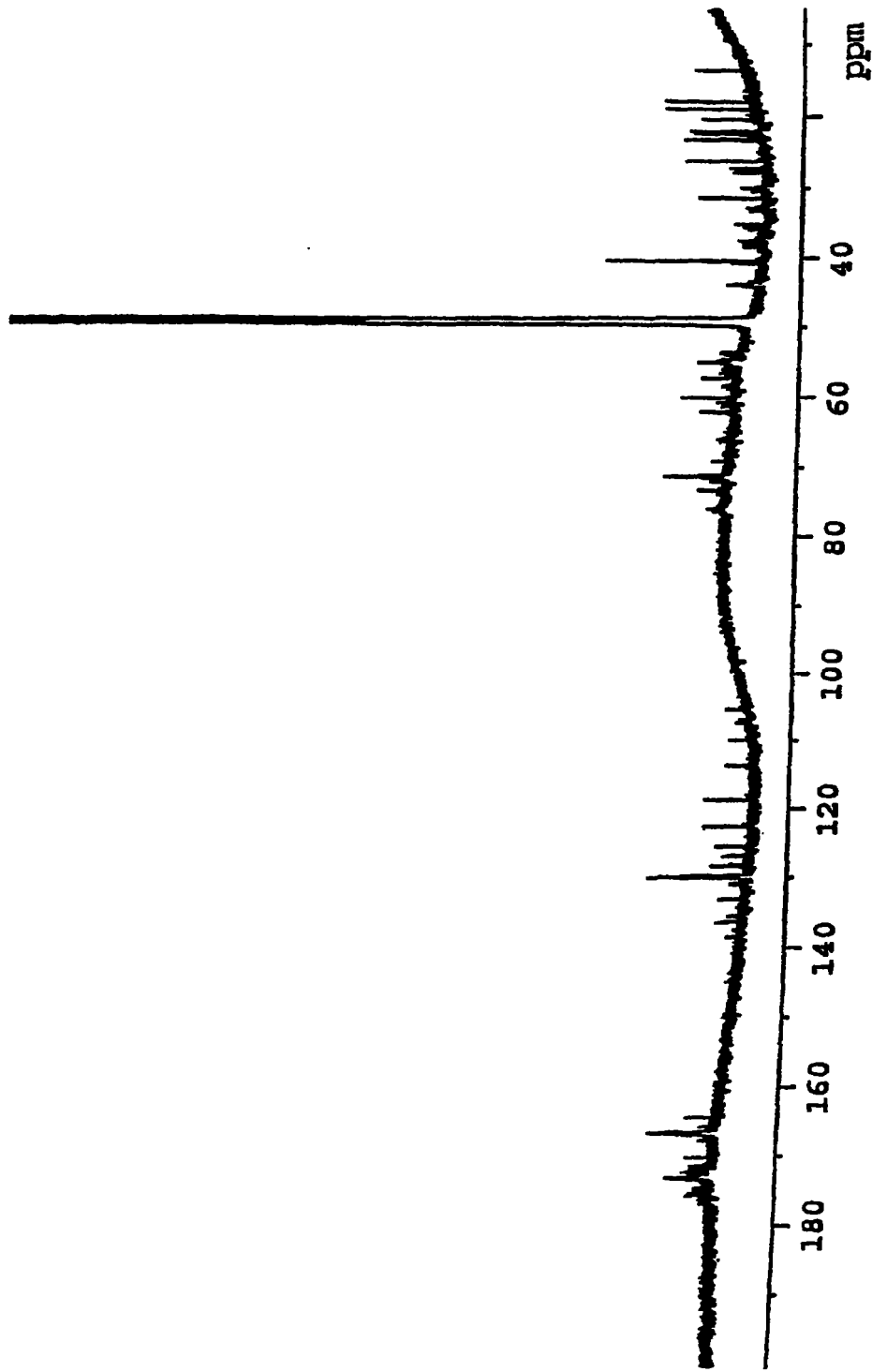


图5

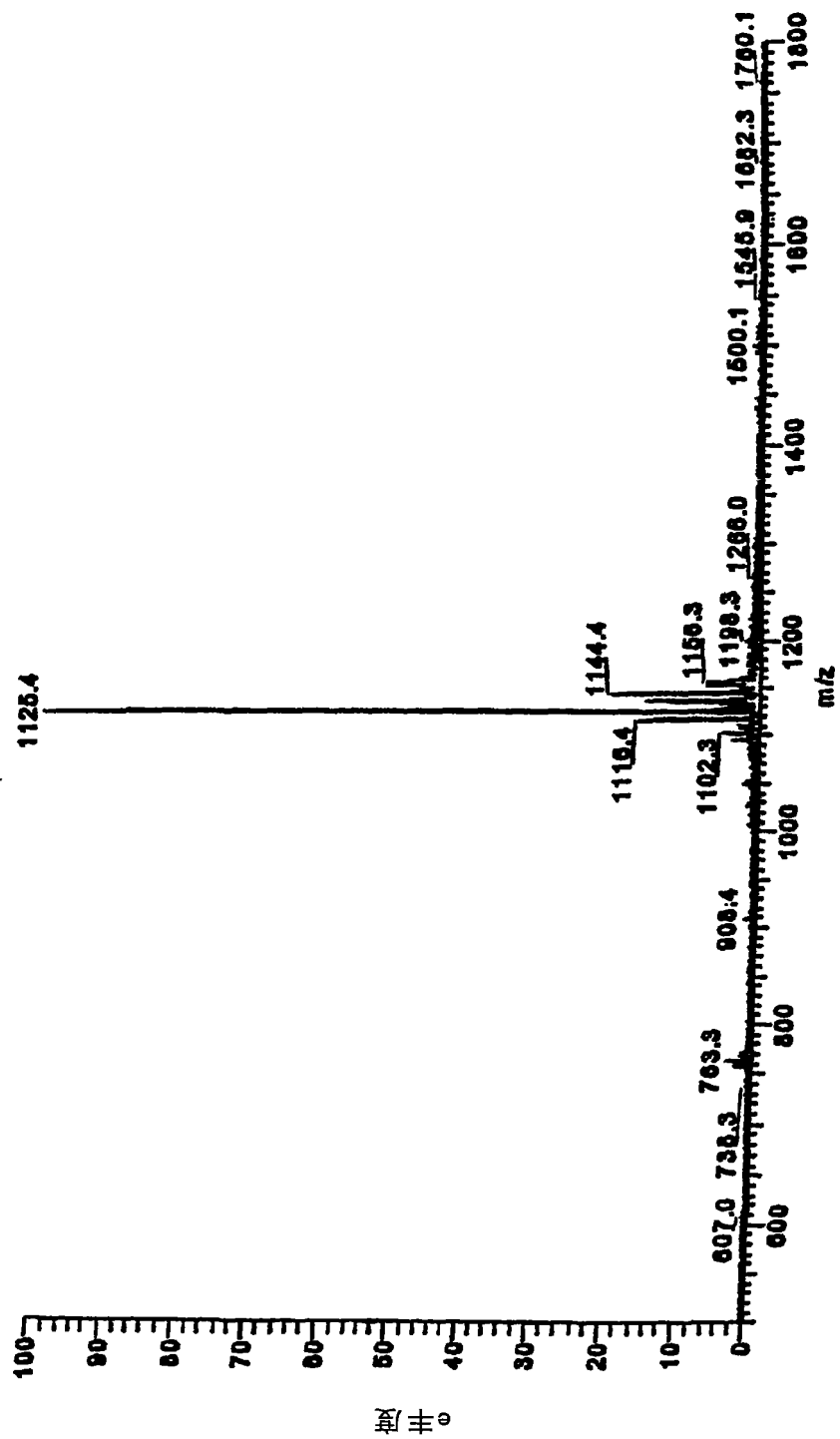


图6A

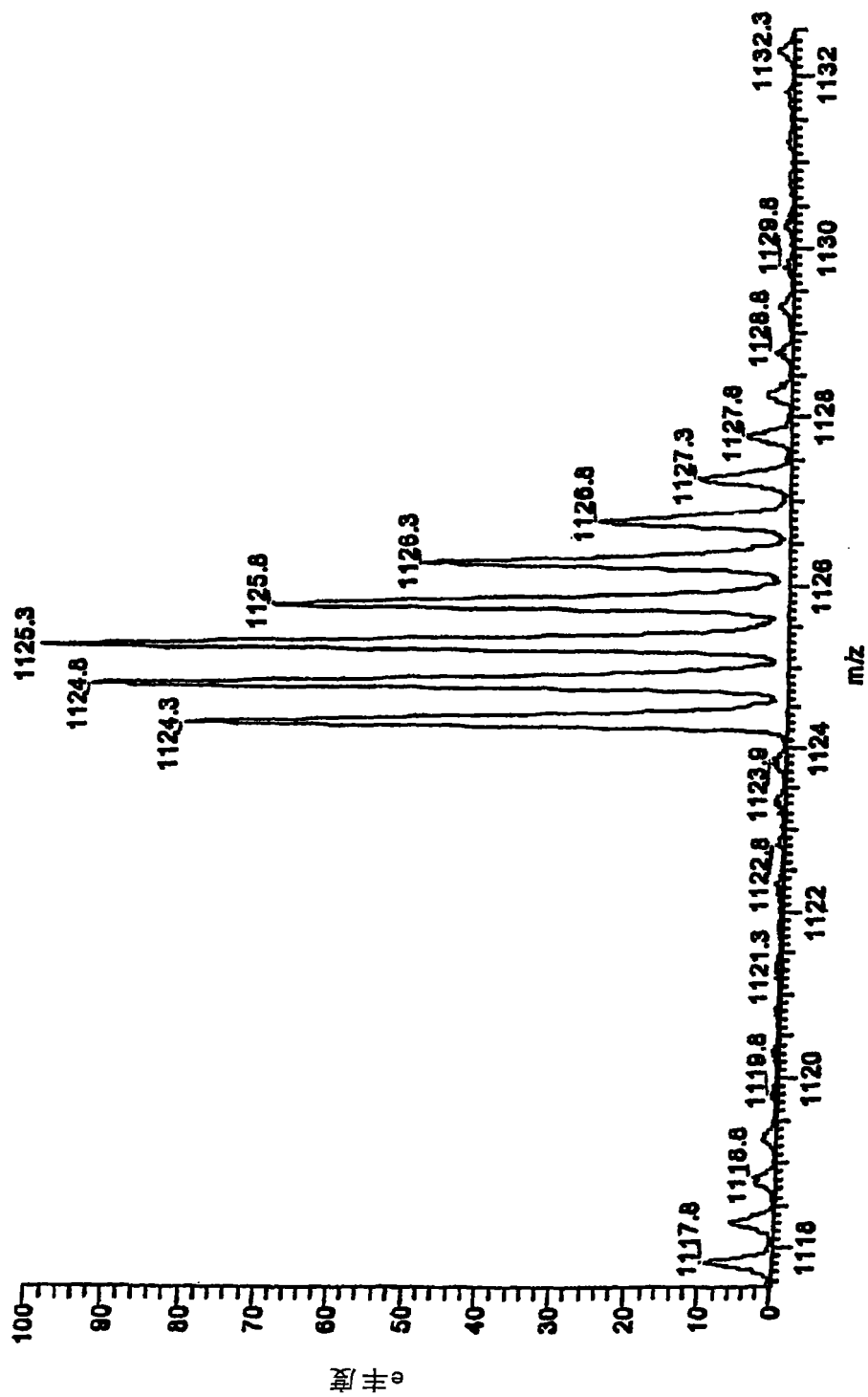


图6B



图7A

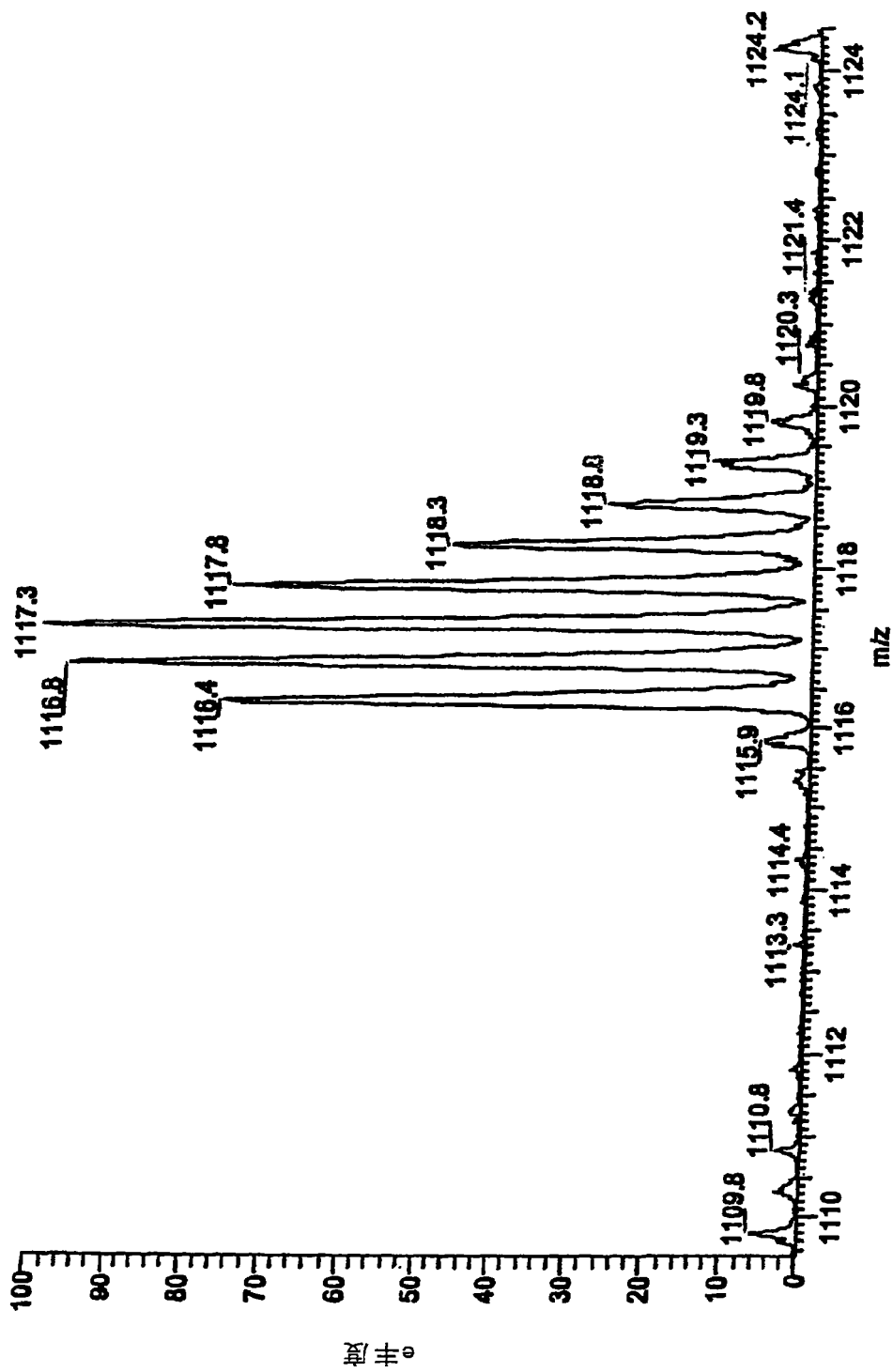


图7B

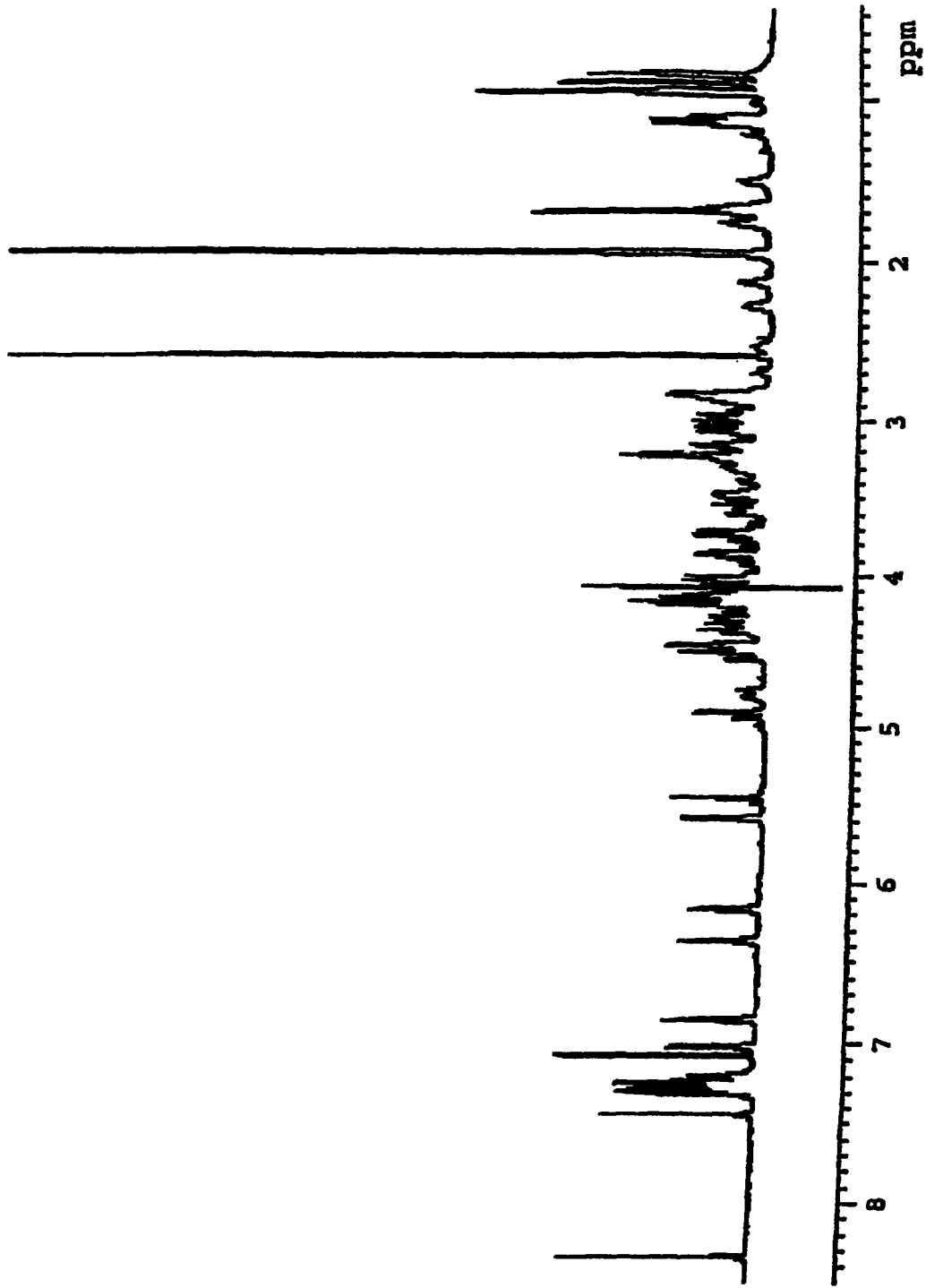


图 8

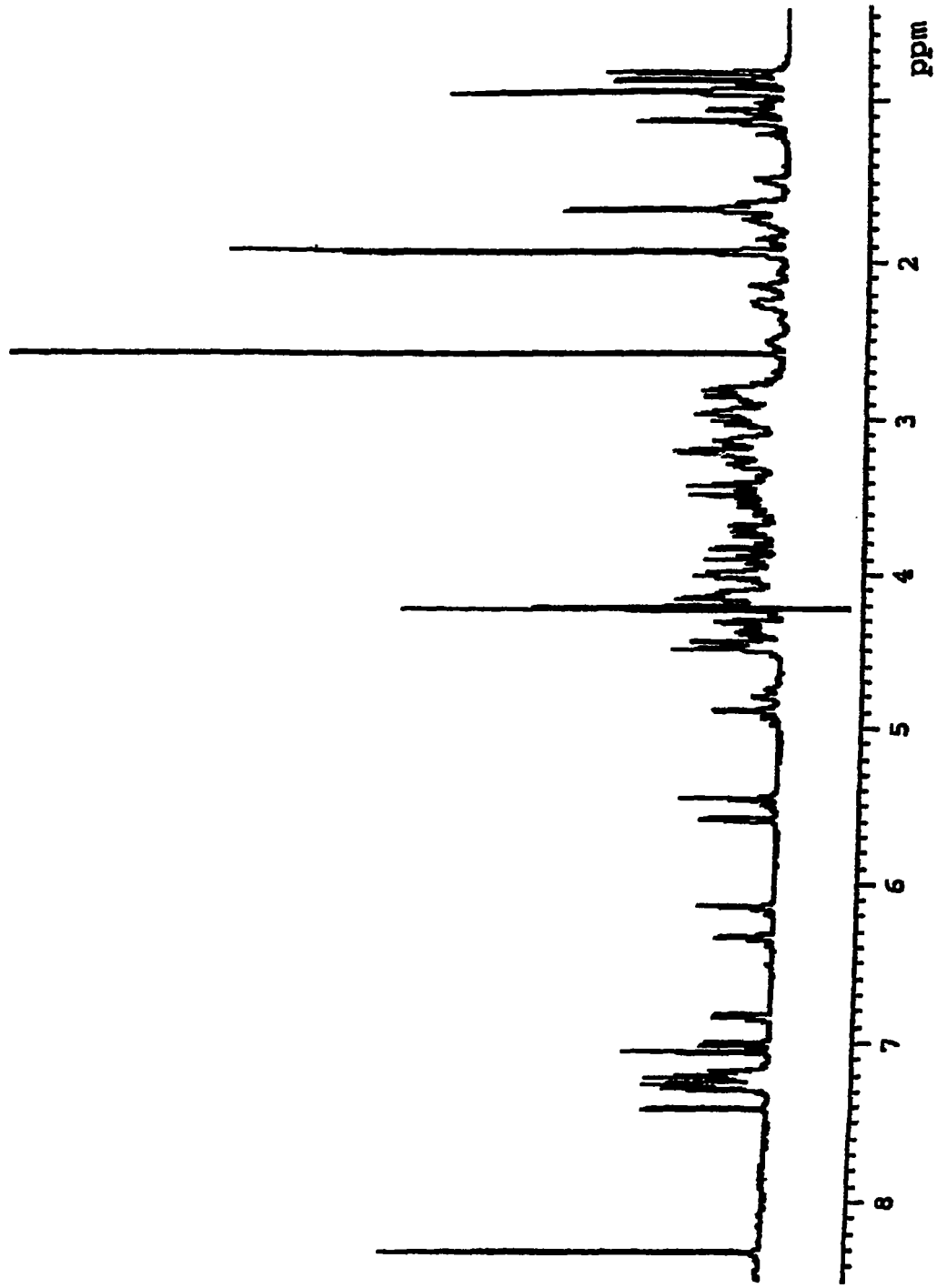


图9

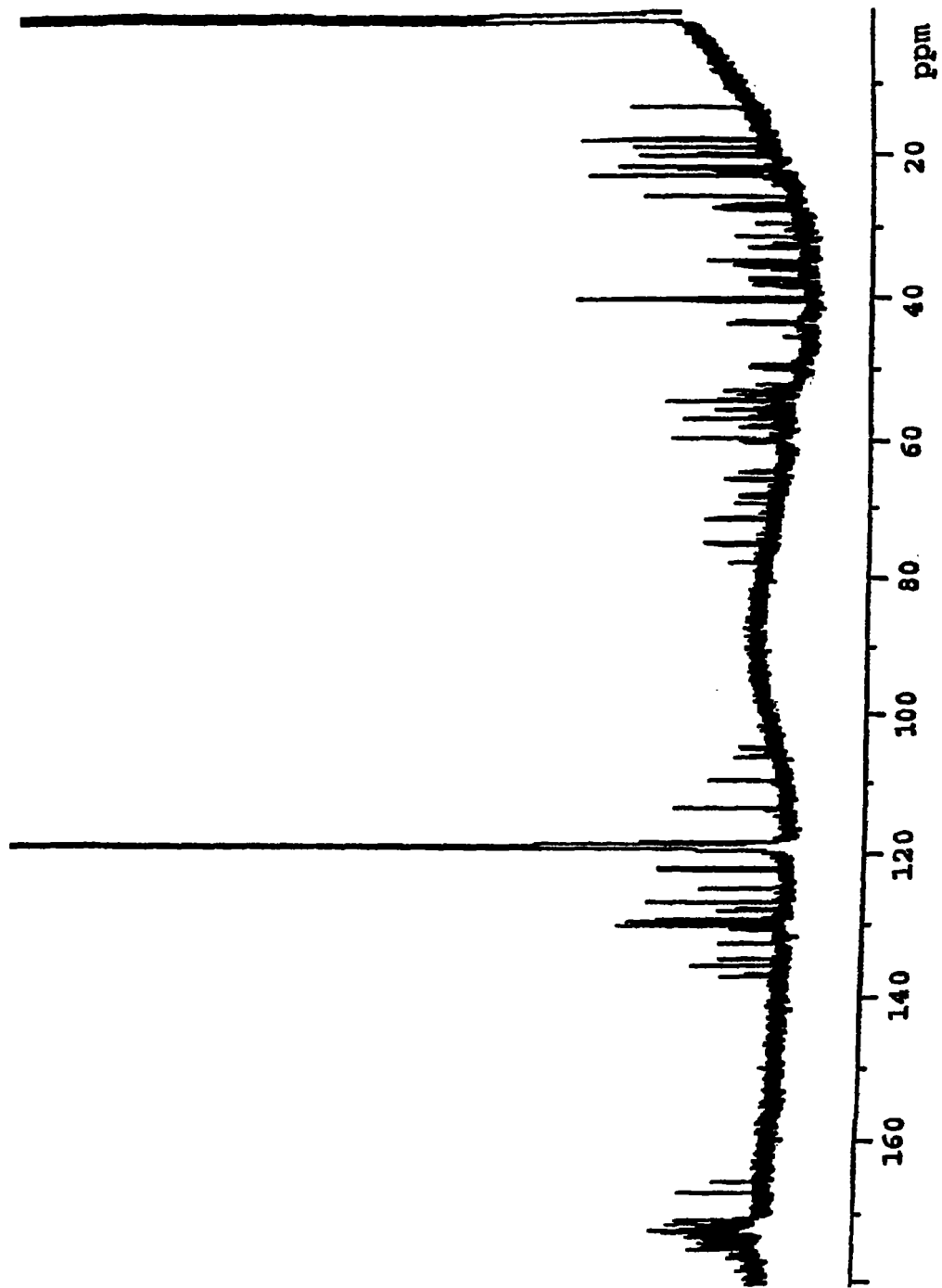


图10

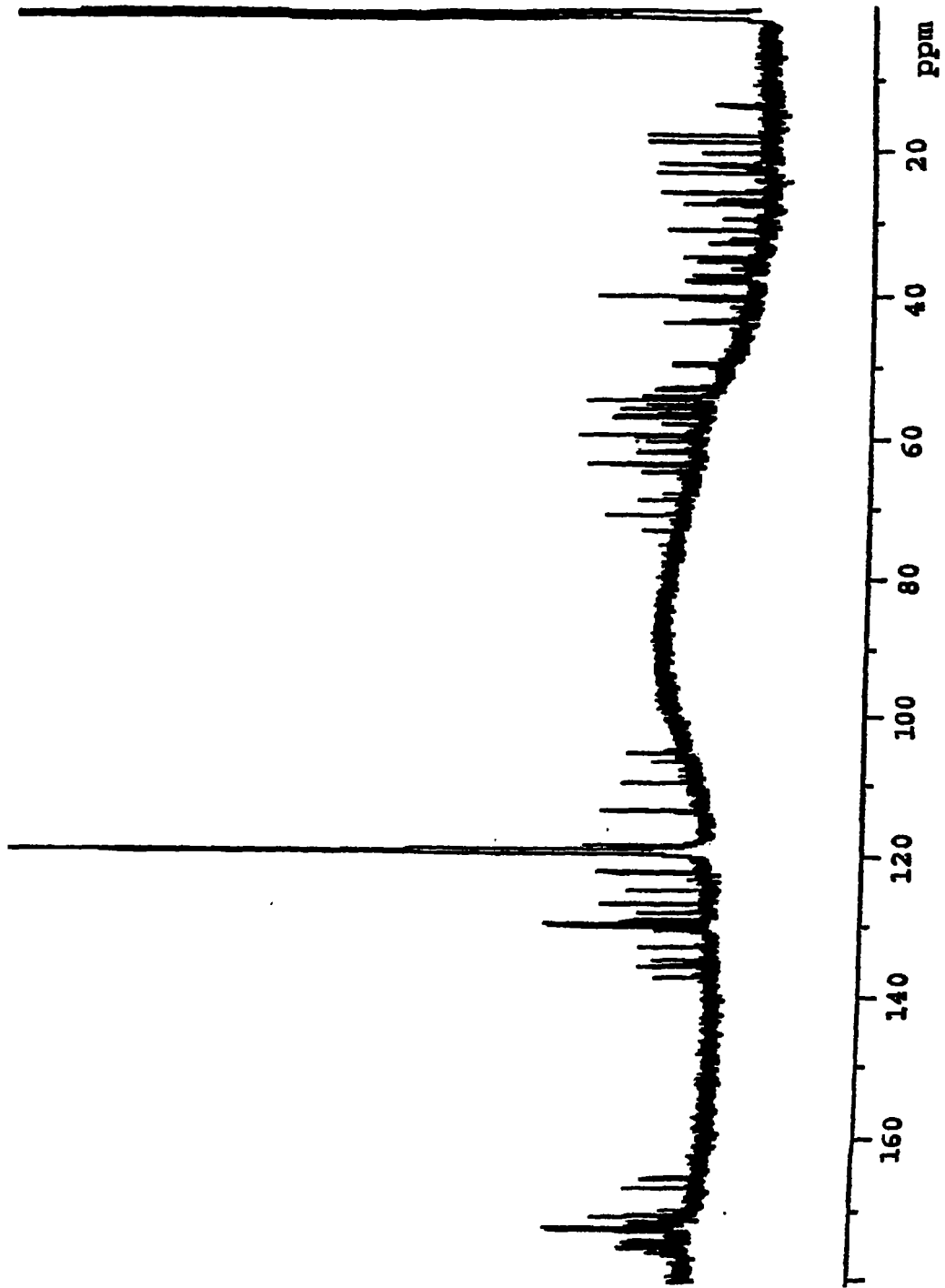


图11

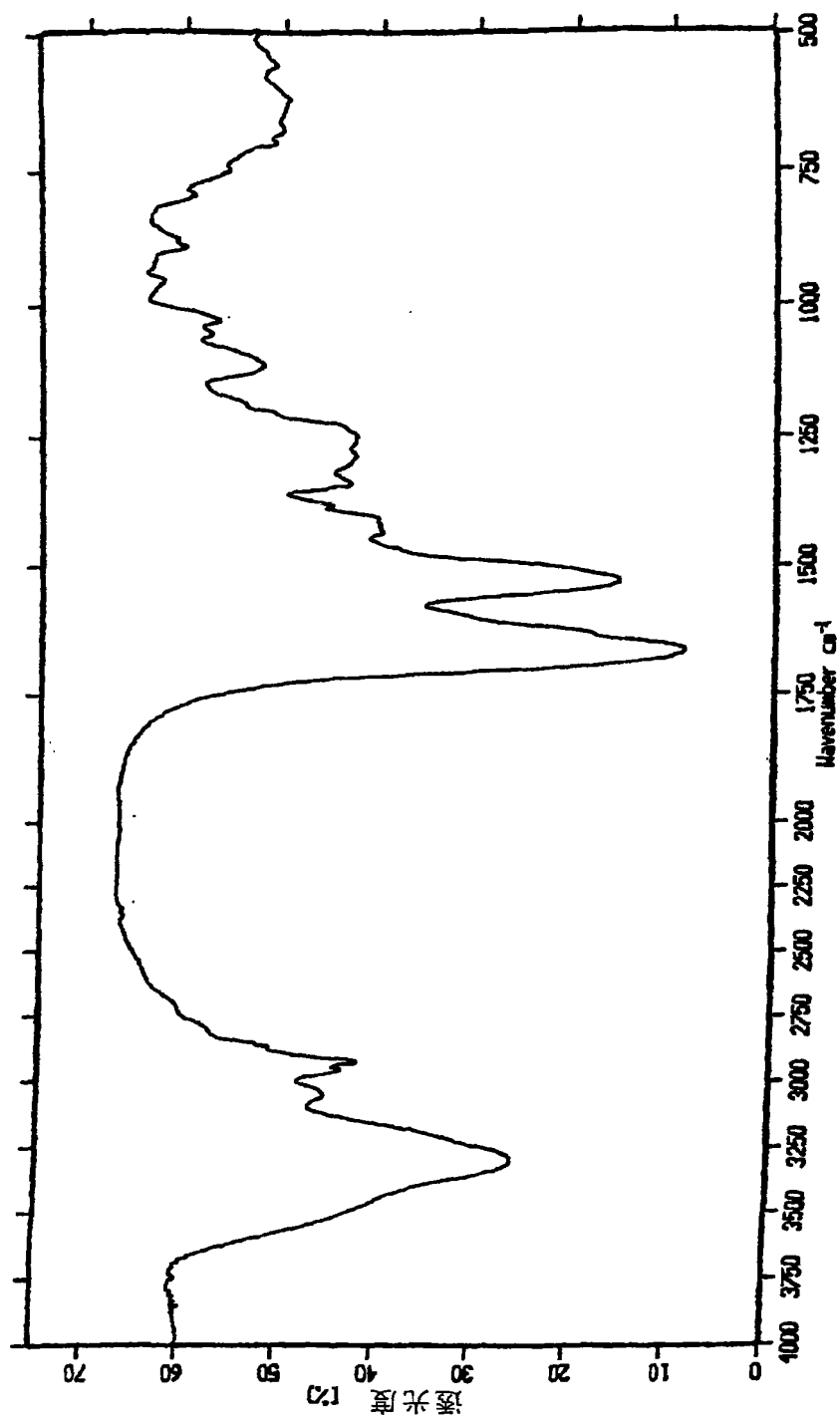


图12

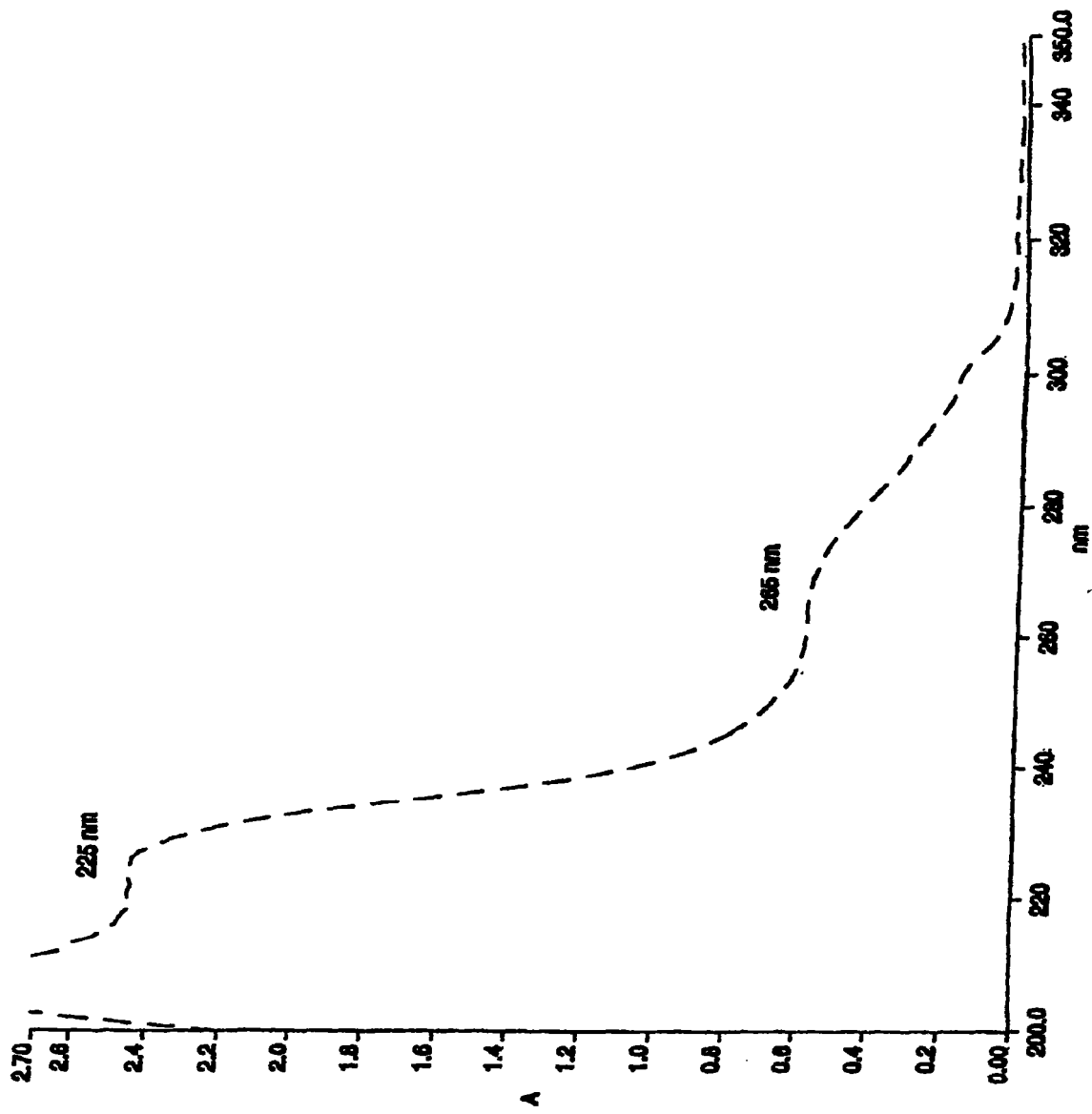


图13

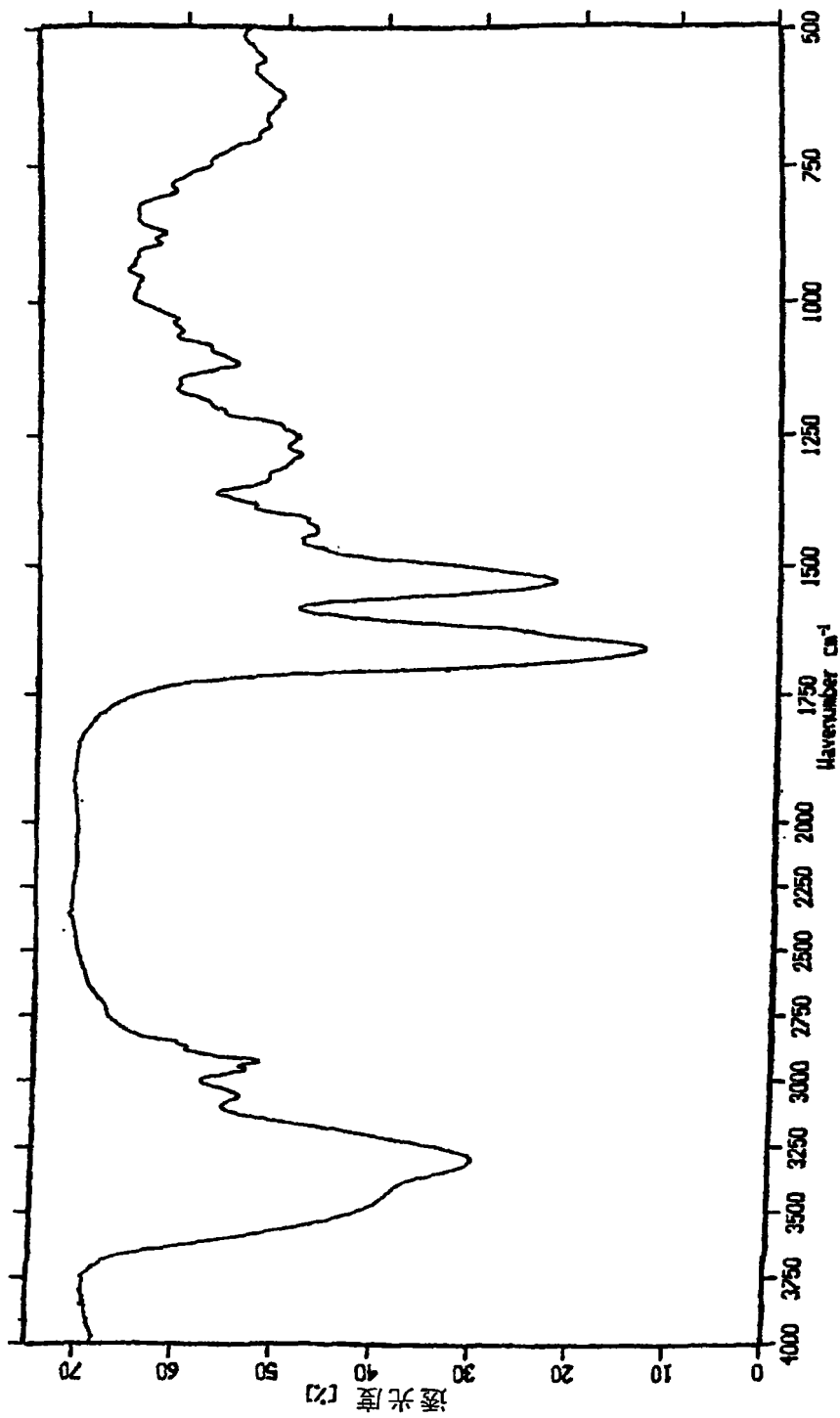


图14

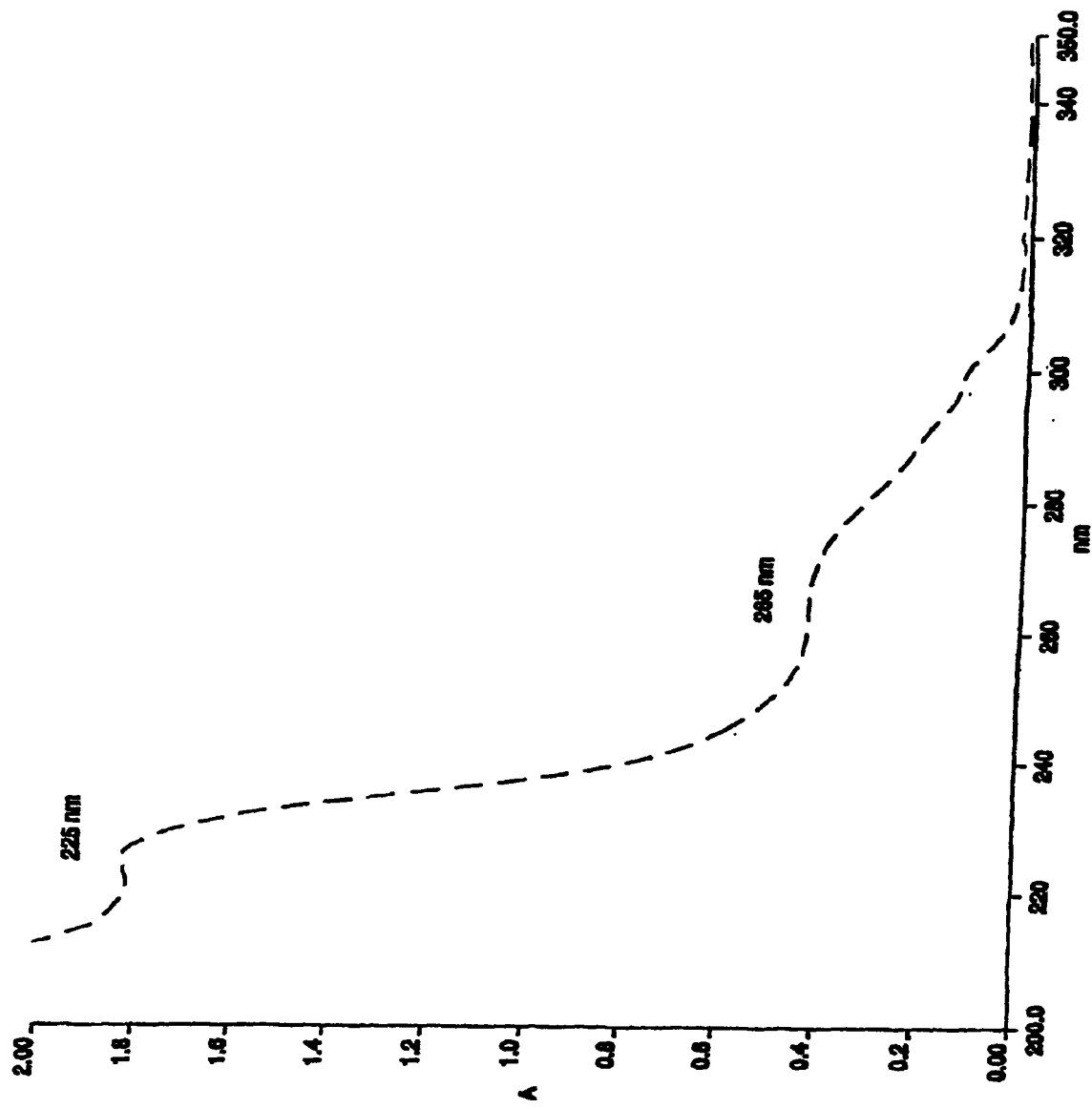


图15