[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046871.6

[51] Int. Cl.
C12P 17/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
C12P 17/14 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
C12P 17/16 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 9 日

[11] 公开号 CN 101103120A

[22] 申请日 2005.12.12
[21] 申请号 200580046871.6
[30] 优先权
[32] 2005. 1.19 [33] US [31] 11/037,104
[86] 国际申请 PCT/US2005/044783 2005.12.12
[87] 国际公布 WO2006/078368 英 2006.7.27
[85] 进入国家阶段日期 2007.7.19
[71] 申请人 免疫基因公司
地址 美国麻省剑桥悉尼街 128 号
[72] 发明人 辛西亚·郭 格雷厄姆·S·宾
韦恩·C·威德森
[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所
代理人 傅强国

权利要求书 7 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用于制备安丝菌素的方法

[57] 摘要

一种大规模发酵高产安丝菌素的菌株的工艺。一种用于分离粗安丝菌素的方法。 一种用于纯化安丝菌素的方法。

1. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物； 2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过 a)和 b)中的任何一个纯化安丝菌素：

a）析晶，和

b）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

2. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素；

3）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

4）浓缩萃取的安丝菌素；以及

5）通过 a)和 b)中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）析晶，和

b）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

3. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）过滤以除去固体，从而允许有机相分离；

4）从有机相中浓缩安丝菌素；以及

5）通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

4. 如权利要求 3 所述的工艺，其特征在于，还包括在过滤期间使用助滤剂。

5. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）采用离心技术，用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

6. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）在有水溶性有机溶剂存在的情况下，离心培养基以除去固体；

3）添加不相溶于水的非芳香族溶剂，将安丝菌素萃取至有机层中；

4）浓缩萃取的安丝菌素；以及

5）通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

7. 如权利要求 6 所述的工艺，其特征在于，在萃取期间将盐添加到所述有机相中。

8. 一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）通过固相萃取，将安丝菌素从培养基中萃取到树脂上；

3）使用有机溶剂或混有水的有机溶剂，从树脂中等度洗脱或梯度洗脱安丝菌素；

4）浓缩经洗脱的安丝菌素；以及

5）任选通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

9. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述产安丝菌素的微生物是束丝放线菌 Actinosynnema spp。

10. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述产安丝菌素的微生物是珍贵橙色束丝放线菌 *Actinosynnema pretiosum*。

11. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述产安丝菌素的微生物是珍贵橙色束丝放线菌 ATCC 31565 或其衍生菌株。

12. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述产安丝菌素的微生物是珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4（ATCC PTA-3921）或其衍生菌株。

13. 如权利要求 2 所述的工艺，其特征在于，所述处理包括通过加热发酵培养液或通过向发酵培养液添加氯仿来使微生物失活。

14. 如权利要求 2 所述的工艺，其特征在于，所述处理包括加热、调节 pH、酶催化处理或化学处理。

15. 如权利要求 14 所述的工艺，其特征在于，所述化学处理包括添加聚硫酸铁、脱乳化剂、气相法二氧化硅或助溶剂。

16. 如权利要求 14 所述的工艺，其特征在于，通过将所述培养液加热到约 50～55°C，使所述微生物失活。

17. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述萃取在 pH 约为 6～7 处进行。

18. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述萃取在温度约为 30～45°C 处进行。

19. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂选自于由烷基乙酸酯、二烃基酮、以及卤化溶剂所构成的组，所述烷基乙酸酯中的烷基链是线性的或分支的并具有 1～5 个碳原子。

20. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂选自于由乙酸正丁酯、乙酸乙酯、以及乙酸甲酯所构成的组。

21. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是甲基异丁基酮。

22. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是二氯甲烷。

23. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是乙酸正丁酯。

24. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述萃取在温度约为 30～45°C 处进行，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是乙酸正丁酯。

25. 如权利要求 1～7 中任一项所述的工艺，其特征在于，所述培养基与所述不相溶于水的非芳香族溶剂的体积比为 1:1。

26. 如权利要求 19 所述的工艺，其特征在于，所述培养基与所述不相溶于水的非芳香族溶剂的体积比是 1:1。

27. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，在生产用培养基中进行的所述培养在 pH 约为 6.5～8 处进行。

28. 如权利要求 27 所述的工艺，其特征在于，pH 约为 7～7.4。

29. 如权利要求 28 所述的工艺，其特征在于，pH 约为 7.2。

30. 如权利要求 27 所述的工艺，其特征在于，温度约为 15～35°C。

31. 如权利要求 27 所述的工艺，其特征在于，温度约为 25～30°C。

32. 如权利要求 27 所述的工艺，其特征在于，温度约为 28°C。

33. 如权利要求 32 所述的工艺，其特征在于，温度约为 28°C，pH 约为 7.2。

34. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，在所述培养期间，至少添加一种额外的营养物。

35. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述额外的营养物是碳源。

36. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述额外的营养物开始是碳源，后来是碳源和蛋白质营养物。

37. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，在所述培养期间，额外地添加醇类或醛类以促进安丝菌素的 C-3 酯侧链的形成。

38. 如权利要求 35 所述的工艺，其特征在于，在所述培养期间，额外地添加醇类或醛类以促进安丝菌素的 C-3 酯侧链的形成。

39. 如权利要求 36 所述的工艺，其特征在于，在所述培养期间，额外地添加醇类或醛类以促进安丝菌素的 C-3 酯侧链的形成。

40. 如权利要求 35 所述的工艺，其特征在于，所述碳源是葡萄糖。

41. 如权利要求 36 所述的工艺，其特征在于，所述碳源是葡萄糖。

42. 如权利要求 36 所述的工艺，其特征在于，所述蛋白质营养物是棉籽粉或大豆粉。

43. 如权利要求 38 所述的工艺，其特征在于，所述醛类或醇类选自于由异丁醇、异丁醛、正丁醇、正丁醛、正丙醇、正丙醛、异丙醇、异丙醛、戊醇、戊醛、异戊醇、以及异戊醛所构成的组。

44. 如权利要求 39 所述的工艺，其特征在于，所述醛类或醇类选自于由异丁醇、异丁醛、正丁醇、正丁醛、正丙醇、正丙醛、异丙醇、异丙醛、戊醇、戊醛、异戊醇、以及异戊醛所构成的组。

45. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在 pH 约为 6.5～8 处进行。

46. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在 pH 约为 7～7.4 处进行。

47. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在 pH 约为 7.2 处进行。

48. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在温度约为 15～35°C 处进行。

49. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在温度约为 25～30°C 处进行。

50. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在温度约为 28°C 处进行。

51. 如权利要求 34 所述的工艺，其特征在于，所述培养在温度约为 28°C、pH 约为 7.2 处进行。

52. 如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺，其特征在于，还包括如下一个或多个步骤：

(i) 通过化学灭活或热灭活使所述培养基中的所述微生物失活；

(ii) 在步骤 2 之前，处理所述培养基以促进溶剂萃取安丝菌素；以及

(iii) 在能够在纯化过程中进行的沉淀之前或之后洗涤，其中用水、盐的水溶液、酸的水

溶液或碱的水溶液以任何顺序组合方式洗涤有机溶剂中的粗安丝菌素溶液。

53. 一种细胞结合剂美登木素生物碱复合体，所述复合体通过将如权利要求 1～8 中任一项所述的工艺制备的安丝菌素衍生的美登木素生物碱与细胞结合剂连接而制得。

54. 如权利要求 53 所述的细胞结合剂美登木素生物碱复合体，其特征在于，所述细胞结合剂是一种抗体。

55. 一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：

1）使发酵培养液中产安丝菌素的微生物失活；以及

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从发酵培养液中萃取安丝菌素。

56. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述失活通过加热发酵培养液或通过向发酵培养液添加氯仿来实现。

57. 如权利要求55所述的工艺，其特征在于，所述失活通过将发酵培养液加热到约50～55°C来实现。

58. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述萃取在 pH 约为 6～7 处进行。

59. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述萃取在温度约为 30～45°C 处进行。

60. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂选自于由烷基乙酸酯、二烃基酮、以及卤化溶剂所构成的组，所述烷基乙酸酯中的烷基链是线性的或分支的并具有 1-5 个碳原子。

61. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂选自于由乙酸正丁酯、乙酸乙酯、以及乙酸甲酯所构成的组。

62. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是甲基异丁基酮。

63. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是二氯甲烷。

64. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是乙酸正丁酯。

65. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述萃取在温度约为 30～45°C 处进行，所述不相溶于水的非芳香族溶剂是乙酸正丁酯。

66. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，所述发酵培养液与所述不相溶于水的非芳香族溶剂的体积比为 1:1。

67. 如权利要求 55 所述的工艺，其特征在于，还包括在步骤 2 之前处理所述发酵培养液以促进溶剂萃取安丝菌素。

68. 一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：

1）用不相溶于水的非芳香族溶剂从发酵培养液中萃取安丝菌素；以及

2）过滤以除去固体，从而允许有机相分离。

69. 如权利要求 68 所述的工艺，其特征在于，还包括如下一个或两个步骤：

(i) 通过化学方法或加热方法使所述发酵培养液中的所述微生物失活；以及

(ii) 在步骤 1 之前，处理所述发酵培养液以促进溶剂萃取安丝菌素。

70. 一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：通过离心，用不相溶于水的非芳香族溶剂从发酵培养液中萃取安丝菌素，

71. 如权利要求 70 所述的工艺，其特征在于，所述萃取工艺还包括如下一个或两个步骤：

(i) 通过化学方法或加热方法使所述发酵培养液中的所述微生物失活；以及

(ii) 在离心之前或在离心期间，处理所述发酵培养液以促进溶剂萃取安丝菌素。

72. 一种用于从发酵培养液中除去固体残余物的工艺，所述工艺包括：

在有水溶性有机溶剂存在的情况下，离心发酵培养液以除去固体，同时在溶液中保留安丝菌素。

73. 如权利要求 72 所述的工艺，其特征在于，所述用于从发酵培养液中除去固体残余物的工艺还包括如下一个或两个步骤：

(i) 通过化学方法或加热方法使所述发酵培养液中的所述微生物失活；以及

(ii) 在离心之前或在离心期间，处理所述发酵培养液以促进溶剂萃取安丝菌素。

用于制备安丝菌素的方法

技术领域

[01]

本发明涉及用于制备安丝菌素的工艺。安丝菌素是指具有不同的 C-3 酯侧链的安丝菌素的混合物。安丝菌素能转变成 C-3 美登木醇（maytansinol）。

背景技术

[02]

安丝菌素是微生物比如珍贵橙色束丝放线菌（Actinosynnema pretiosum）发酵产生的高细胞毒性的化合物。安丝菌素已被化学转变成含硫醇的美登木素生物碱（maytansinoids），该生物碱以细胞结合剂-美登木素生物碱偶联物的形式体现出的医疗用途已经被报道（美国专利 Nos.5,208,020、5,416,064、6,333,410、以及 6,441,163）。

[03]

用束丝放线菌（Actinosynnema spp）菌株如珍贵橙色束丝放线菌的发酵工艺制备多个在 C- 3 处具有不同的酯取代基的安丝菌素品种（图 1）。制备的各种 C-3 酯包括 P-3（异丁酰）、P-3'（正丁酰）、P-2（丙酰）、P-4（异戊酰）、P-4'（正戊酰）。所有这些酯均可以被还原分解成 C-3 美登木醇（P-0），该醇是用于合成含硫醇美登木素生物碱的前体。此外，还生成了少量的不希望有的安丝菌素，该安丝菌素在其他位置例如 N-脱甲基、20-O-脱甲基以及 19-脱氯处被修饰。在还原性脱酰作用下，这些安丝菌素不生成美登木醇。

[04]

通过发酵束丝放线菌制备安丝菌素的工艺已经被报道（美国专利 Nos.4,162,940、4,450,234、4,228,239、4,331,598 以及 4,356,265）。安丝菌素的产量一般在 12 mg/L～100 mg/L 范围内随滴度而变化。典型地，通过多步骤工艺来回收并提纯安丝菌素，该工艺包括向整个发酵培养液中添加助滤剂和有机溶剂，接着用石油醚浓缩有机层和沉淀物。用硅层析和析晶进一步提纯沉淀物，接着通过重结晶或层析进一步纯化。

[05]

因此，该工艺是繁琐的，并且包括多个其中剧毒材料必须被处理的步骤。于是，采用这种工艺进行大规模生产非常困难。此外，在各个工艺步骤中还必须确保操作人员的安全。

[06]

最近的申请（US 2002/0015984 A1）要求保护用于安丝菌素制备工艺中的改进技术。据报道，在发酵培养液中的安丝菌素的滴度是 65～86 mg/L。要求保护的改进技术包括使培养液在 75°C 下热灭活、萃取到芳香烃溶剂比如甲苯中、通过开口硅柱层析、以及析晶。为降低制备安丝菌素的成本，已经培养了新的束丝放线菌菌株，其比先前描述的那些菌株具有显著提高的滴度（在发酵器中高达 400 mg/L）。先前描述的用于制备安丝菌素的工艺有几个缺点，从而不适用于新开发的高产菌株。例如，培养液在 75°C 下热灭活导致安丝菌素发生部分降解，从而损失 10%～20%的产量。用芳香烃萃取包含较高含量安丝菌素的发酵培养液效率低且不完全，这是因为安丝菌素在这种溶剂中的溶解度不高。在开口的自填充硅柱（self-packed silica column）上纯化安丝菌素有两个缺点：1）在纯化和回收中的批次变化，以及 2）较高的人员暴露风险所产生的安全问题。因此，目前需要高产量地制备安丝菌素，并提供一种用于高效率分离和纯化安丝菌素的工艺，同时最小化工人暴露于高毒性药物的几率。

发明内容

[07]

本发明的目的之一是提供一种用于大规模发酵产安丝菌素的微生物的工艺，该工艺尤其适用于新的能高产安丝菌素的菌株。

[08]

本发明的另一目的是提供一种用于分离粗安丝菌素和用于制备精制安丝菌素的方法，包括如下步骤：

1）任选的使培养液失活，例如将培养液加热到约 50～55°C 或添加 1%体积的氯仿，2）用非芳香族有机溶剂萃取，3）浓缩萃取物，4）在硅柱或氧化铝柱上，优选在预填充硅筒柱柱（pre-packed silica cartridge column）上纯化浓缩物，以及 5）产物的析晶。

[09]

本发明的其他目的包括如下内容：

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[10]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过a）、b）、c）和d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[11]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶来纯化安丝菌素。

[12]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）过滤以除去固体，从而允许有机相分离；

4）从有机相中浓缩安丝菌素；以及

5）通过a）、b）、c）和d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[13]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）采用各种离心技术，用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素；

3）浓缩萃取的安丝菌素；以及

4）通过a）、b）、c）和d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[14]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中产制备安丝菌素的微生物；

2）在有一种或多种水溶性有机溶剂存在的情况下，将培养液离心以除去固体，同时在溶液中保留安丝菌素。

3）添加不相溶于水的非芳香族溶剂，从而允许将安丝菌素萃取至有机层中。在萃取过程中，还可以视需要任选地向有机相中添加各种盐或其他组分。

4）浓缩萃取的安丝菌素；以及

5）通过a）、b）、c）和d）中的任何一个来纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[15]

一种用于制备精制安丝菌素的工艺，其包括如下步骤：

1）在液体培养基中培养产安丝菌素的微生物；

2）任选地处理培养基以促进安丝菌素的萃取；

3）从培养基中将安丝菌素固相萃取到树脂上；

4）使用一种或多种有机溶剂，或者使用一种或多种含水的有机溶剂，从树脂中等度洗脱或梯度洗脱安丝菌素；

5）浓缩萃取的安丝菌素；以及

6）任选地通过 a）、b）、c）和 d）中的任何一个来进一步纯化安丝菌素：

a）在硅胶或氧化铝上吸附层析，

b）析晶，

c）先在硅胶或氧化铝上吸附层析，然后析晶，以及

d）先析晶，然后在硅胶或氧化铝上吸附层析。

[16]

在这些实施方式中，本发明可以任选地包括如下步骤：

(i) 化学灭活或热灭活发酵培养液中的微生物；

(ii) 在步骤 2 之前，处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素；或者

(iii) 在沉淀前或沉淀后，进行洗涤步骤，其中用水、盐的水溶液、酸水溶液或碱水溶液以任何顺序组合方式洗涤有机溶剂中的粗安丝菌素溶液。该步骤可以在各个纯化阶段中进行。

[17]

一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：

1）任选地使发酵培养液中产安丝菌素的微生物失活；以及

2）用不相溶于水的非芳香族溶剂从发酵培养液中萃取安丝菌素。

[18]

上述工艺还可以包括，在步骤 2 之前处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素。

[19]

一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：

1）用不相溶于水的非芳香族溶剂从发酵培养液中萃取安丝菌素，以及

2）过滤以除去固体，允许有机相分离。

上述工艺可以任选地包括：

(i) 化学灭活或热灭活发酵培养液中的微生物；和/或

(ii) 在步骤 2 之前，处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素。

[20]

一种用于从发酵培养液中萃取安丝菌素的工艺，所述工艺包括：通过各种离心技术，用不相溶于水的非芳香族溶剂从培养基中萃取安丝菌素。

[21]

上述工艺可以任选地包括：

(i) 化学灭活或热灭活发酵培养液中的微生物；和/或

(ii)在离心之前或在离心期间，处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素。

[22]

一种用于从发酵培养液中除去固体残余物的工艺，所述工艺包括：

1）在有水溶性有机溶剂存在的情况下，离心发酵培养液以除去固体，同时在溶液中保留安丝菌素。

[23]

上述工艺可以任选地包括：

(i) 化学灭活或热灭活发酵培养液中的微生物；和/或

(ii) 在离心之前或在离心期间，处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素。

[24]

在上述方法中，优选产安丝菌素的微生物是束丝放线菌，进一步优选是珍贵橙色束丝放线菌。产安丝菌素的微生物还可以是珍贵橙色束丝放线菌 ATCC 31565 或其衍生菌株，或者是珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4（ATCC PTA-3921）或其衍生菌株。如美国专利 No.4,450,234 所述，珍贵橙色束丝放线菌 ATCC 31565 被保藏在如下单位：(i) 发酵研究所，Osalca，17-85，Juso-honmachi 2-chome，Yodogawa-ku，大阪 532-8686，日本，1979 年 8 月 20 日，保藏编号 IFO 13963；(ii) 日本国家生命科学和人类技术研究所（先前的发酵研究所），Agency of Industrial Science and Technology，国际贸易与工业部，1-3，higashi 1-chome，Tsukuba- shi，Ibaraki-ken 305，日本，1979 年 8 月 29 日，保藏编号 FERM-P NO. 5185；以及(iii) 美国典型培养物保藏中心，10801 University Blvd.，Manassas，弗吉尼亚 20110-2209，美国，1979 年 9 月 11 日，保藏编号 ATCC 31565。此外，珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4 按布达佩斯条约被保藏在下述单位：美国典型培养物保藏中心，10801 University Blvd., Manassas，弗吉尼亚 20110-2209,美国, 2001 年 12 月 11 日，保藏编号 No.ATCC PTA-3921。

附图说明

[25]

图 1 所示为通过发酵制备的各种安丝菌素 C-3 酯、以及 C-3 醇、美登木醇(P-0)的结构。

具体实施方式

[26]

本发明提供用于在大容量发酵器中用液体培养基培养高产安丝菌素的微生物的方法。还提供用于将安丝菌素从培养液和微生物中萃取到不相溶于水的非芳香族有机溶剂中的方法，其中安丝菌素可高度溶解于该有机溶剂；以及视需要使安丝菌素通过硅柱或氧化铝柱，优选这些柱是预填充筒柱，然后析晶产物来纯化安丝菌素的方法。必要时，在萃取步骤之前，可以通过热处理或用氯仿处理使微生物失活。

[27]

可以用还原剂处理包含多种 C-3 酯混合物的精制安丝菌素，其中 C-3 酯比如是安丝菌素 P-3、P-3'、P-4、P-4'、P-2 和 P-1（图 1），以获得预期的 C-3 羟基化合物、美登木醇（P-0）。精制安丝菌素典型地仅包含少量的不希望有的安丝菌素，该安丝菌素不在 C-3 位置修饰而在分子的其他位置修饰。优选产安丝菌素的菌株是束丝放线菌。进一步优选微生物是珍贵橙色束丝放线菌。微生物还可以是珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4（ATCC PTA-3921）和其衍生物、以及珍贵橙色束丝放线菌 ATCC 31565 和其衍生物。通过本技术领域技术人员所熟知的发酵培养技术，用此处描述的特定培养基或用本领域中描述的任何其他的培养基可以培养上述微生物（美国专利 Nos.4,162,940、4,450,234、4,228,239、4,331,598、以及 4,356,265）。

[28]

本发明方法的一个实施方式是在液体培养基中培养微生物。菌株 PF4-4 的生长在控制条件下进行，可以采用多种培养基和生长条件。例如，PF4-4 可以如同美国专利 Nos. 4,137,230、4,162,940、4,331,598、4,356,265、和 4,450,234 描述的 ATCC 31565 或 ATCC 31281 那样、以及如同 Hatano 等在 Agric. Biol. Chem. 48, 1721-1729, 1984 中的描述，在相似的条件下用类似的培养基培养。因此，菌株 PF4-4 容许采用多种碳源，这也有助于发酵制备安丝菌素。生长用培养基的例子如表 1 和 2 所示。表 1 所示为有助于用产安丝菌素的微生物例如珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4 来生产安丝菌素的培养基，表 2 所示为适于珍贵橙色束丝放线菌 PF4-4、以及其他产安丝菌素微生物的繁殖和/或生长的培养基。

表 1 生产培养基配方（全部为% w/v）

	FM 27-44	FM 112-37	FM 4-4	FM 4-6	FM 4-7
糊精 (Lodex-5)	6	6	5	5	5
麦芽糖 (Difco)	4	4	2	2	2
Proflo (Traders)			2.0	2.5	2.75
大豆粉 (ADM)	1.5	2.0			
药用培养基 (Traders)	0.5				
CSP (Roguette)	0.5	0.5	0.5	0.15	0.15
P. 干酵母 (Difco)	0.25				
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Wako)	0.05				
$CaCO_3$ (Hayashi)			0.5	0.5	0.6
$(NH_4)_2SO_4$ (Wako)		0.05			
KH_2PO_4 (Wako)	0.05	0.04			
K_2HPO_4 (Wako)		0.05	0.06	0.06	0.06
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Wako)	0.5	0.5			
$NaHCO_3$ (Wako)		0.2			
沸石	0.1				
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Wako)	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0002				
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Baker)	0.001			0.0005	0.0005
尼克酸	0.0002				
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0002				
异丁醇 (Tedoa)	0.1	0.5	0.5	0.3	0.3
SAG471 (Witco)		0	0.06	0.04	0.04
pH	6.8	6.8	6.8	7.2	7.35

在 121°C 下灭菌 20 分钟。最后添加。

表 2 相关培养基

斜面培养基和平板培养基，CM4-1 琼脂

(%, w/v)

酵母提取物(Difco)	0.3
麦芽提取物 (Difco)	0.3
Soytone (Difco)	0.5
甘油(Difco)	1.0
Bacto 琼脂 (Difco)	2.0

在灭菌前将 pH 调节到 6.5；灭菌：121 °C, 20 分钟

种子培养基，VM4-1'

(%, w/v)

可溶性淀粉 (BDH)	2.0
葡萄糖 (Shuling)	1.0
大豆粉 (ADM)	1.0
玉米浆 (Solulys)	0.5
Soytone (Difco)	0.5
NaCl (Wako)	0.3
$CaCO_3$ (Hayashi)	0.5

pH 6.8；灭菌：121°C, 20 分钟

通过菌株 PF4-4 发酵制备安丝菌素的优选方法进一步如下面的实施例 1 和 2 所述。

发酵

[29]

培养可以在如下培养条件下进行，比如静置、振荡、通气浸没或任何其他的培养条件。为在大容量槽发酵器中较好地培养安丝菌素并实现高产量，优选通气浸没培养。通过在发酵期间补加营养物，可以进一步提高安丝菌素的产量。例如，当在 FM4-6 培养基中培养微生物时，在发酵持续期间额外地补加葡萄糖或大约在发酵初始的 24～72 小时内，优选大约在初始的 48 小时内额外地补加葡萄糖，接着补加葡萄糖和蛋白质营养物比如棉籽粉（例如来自 Trader's Protein，Memphis，TN 的 Proflo 或药用培养基）或大豆粉、以及额外地添加醇类或醛类，比如异丁醇、异丁醛、正丁醇、正丁醛、正丙醇、正丙醛、异丙醇、异丙醛、戊醇、

戊醛、异戊醇、异戊醛，以促进形成 C-3 酯侧链，直至发酵结束，可以使安丝菌素的产量翻倍。因为培养条件取决于采用的培养基和生产规模，故通常优选在 pH 为 5～9 的范围内进行发酵，优选初始 pH 约为 6.5～8.0。进一步优选 pH 约为 7～8，更进一步优选 pH 约为 7～7.4，最优选 pH 约为 7.2。温度范围约为 15～35°C，优选范围约为 25～30°C。进一步优选温度约为 28°C。发酵持续进行，直到累积的安丝菌素达到最大值。培养时间可以改变，并取决于如下几个因素：培养方法、培养基配方、以及温度。典型地，发酵时间范围为 96～336 h。

安丝菌素的分析：

[30]

在美国专利 Nos.4,331,598 和 4,450,234 中，作为产生如下两种类型安丝菌素的亲代菌株 ATCC 31565 被公开，这两类安丝菌素的特殊之处在于在 C-14 处存在甲基基团或羟甲基基团（见图 1）。在这两类安丝菌素中，多种不同的安丝菌素被制备，它们的区别在于这些安丝菌素以各自的酰基侧链与 C-3 氧原子结合，并且在于是否在 C-14 处携带有甲基基团或羟甲基基团（或随后研究中的 N-脱甲基）。此处用于被取代的化合物的名称参照图 1 进行定义。

[31]

安丝菌素 P-3 是 PF4-4 和亲代菌株 ATCC 31565 在一定生长条件下的主要产物。如果细菌在有缬氨酸或异丁酸（见美国专利 No.4,228,239）或异丁醇或异丁醛（见美国专利 No.4,356,265）存在的条件下生长，那么仅存在少量的其他安丝菌素化合物。当 PF4-4 菌株在不同的都含有异丁醇的发酵培养基（如表 1 中所示的 FM）中生长时，安丝菌素 P-3 是主要的安丝菌素产物。在一种测定安丝菌素的量的方法中，先用乙醇或乙腈稀释发酵培养液的试样，接着强烈摇动，最后离心。然后测定上层清夜以确定安丝菌素 P-3 的含量。

[32]

优选用反相高效液相色谱法（HPLC）使安丝菌素各组分分开并分析各安丝菌素，但可以使用任何合适的技术，比如 MALDI-TOF 或薄层层析。在一种方法中，用有机溶剂比如乙酸乙酯、二氯甲烷或氯仿萃取发酵培养液，通过 HPLC，用反相 C18 或 C8 柱确定有机溶剂中 P-3 的含量。

安丝菌素的萃取

[33]

通过常用于回收次级代谢产物的方法可以从发酵培养液中萃取安丝菌素。由于安丝菌素较容易溶于非芳香族溶剂，故很容易通过混合搅拌不相溶于水的非芳香族溶剂，比如烷基乙

酸酯、二烃基酮以及卤化溶剂来萃取，烷基乙酸酯内烷基链是线性的或分支的，并具有 1～5 个碳原子。合适的烷基乙酸酯的例子包括乙酸正丁酯、乙酸乙酯、以及乙酸甲酯。合适的二烃基酮的例子是甲基异丁基酮。合适的卤化溶剂的例子是二氯甲烷。优选用乙酸正丁酯萃取。优选发酵培养液与不相溶于水的非芳香族溶剂的体积比是 1:1。

[34]

还可以将发酵培养液中的安丝菌素吸附在如下各种树脂上，比如购自罗门哈斯公司的 Amberlite XAD-4、XAD-16、购自 Mitsubishi 化学品工业有限公司的 Diaion HP20、HP21、Sepabeads SP825、SP850、SP70、SP700。这些例子不是对所用树脂范围的限制，本技术领域技术人员所熟知的其他树脂也可以用于上述目的。树脂也可以用作二级结构比如磁性材料或高密度材料上的涂层，从而使聚合物因磁性或通过依赖于吸附剂密度的方法比如膨胀床层析而从培养液中回收。一旦安丝菌素被吸附在树脂上，就可以用一种或多种有机溶剂等度洗脱或梯度洗脱。在一个实施方式中，树脂可以被直接添加到培养液中以萃取安丝菌素。

[35]

可以用多种方法从树脂中回收安丝菌素。在一个实施方式中，可以通过过滤回收树脂。在第二个实施方式中，可以通过离心回收树脂，接着用一种或多种有机溶剂或一种或多种含水的有机溶剂洗脱固体颗粒。在第三个实施方式中，可以通过膨胀床层析从树脂中除去水相和固体残余物。接着可以在膨胀床柱中压缩树脂，然后用一种或多种有机溶剂或一种或多种含水的有机溶剂等度洗脱或梯度洗脱树脂。在第四个实施方式中，当通过半透膜使树脂与发酵培养液分离时，安丝菌素可以被萃取到树脂中。例如，可以将用树脂填充的透析膜与发酵培养液、水混合一起搅拌，使低分子组分透过该膜，从而使安丝菌素粘结到树脂上。然后从培养液中除去透析袋，从而可以按如上所述洗脱回收的树脂。

[36]

在萃取之前，视需要可以通过在约 50～55°C 下使发酵培养液在空气中缓慢受热 30 分钟～2 小时，或者通过添加 1%（v/v）的氯仿（Torn Hasegawa 等，Int. J. Syst. Bacteriol.，33:314-320，1983），使发酵培养液中的微生物失活。

[37]

在萃取之前或在萃取期间，该工艺还可以包括处理培养基以促进溶剂萃取安丝菌素。该处理可以包括但不限于加热、调节 pH、或酶催化处理或化学处理，比如添加聚硫酸铁、脱乳化剂、气相法二氧化硅、助溶剂比如丙酮或醇类比如甲醇。

[38]

就有机相萃取而言，萃取在 pH2.0～13.0 之间进行，优选 pH 约为 6.0～7.0，进一步优选 pH 约为 6.5～7.0，并且优选用乙酸正丁酯萃取。为提高萃取效率，在萃取过程中，培养液的温度可以保持在 5～80°C 之间，优选在 30～45°C 之间。

[39]

萃取时间取决于如下几个因素：培养液组分、培养液和萃取溶剂的温度、混合培养液和溶剂的方法以及用于萃取的溶剂。萃取时间为 1～120 小时，具体取决于萃取方法。例如，当选择快速萃取和过滤法时，萃取时间可以在 1～12 小时之间。

[40]

在过滤期间可以使用助滤剂。这种助滤剂包括但不限于 Celpure P1000、Celatom FW-80、Hyflo Super Cel 和硅藻土。在过滤期间，视需要可以将助滤剂直接添加到培养液中。视需要还可以用助滤剂预涂覆滤膜。能用于该工艺中的过滤方法包括但不限于切面流超滤（tangential flow filtration）、助滤剂涂层刮鼓过滤（filter aid coated scraping drum filtration）或分批过滤。

[41]

如果在 pH 靠近两端情况下如 pH 1～pH 5 或 pH 8～pH 13，或者在较高温度比如 60°C～90°C 下进行萃取，那么萃取应在安丝菌素不发生过度分解的速率下进行。必要时，还可以通过连续离心，非常快速地进行萃取。在此情况下，发酵培养液的 pH 或温度可以调节成与培养液进入离心机时的相同，从而避免其长时间暴露在苛刻条件下。已经用于发酵工艺并且可用于萃取安丝菌素的离心设备的例子包括但不限于离心式分离机和堆叠式盘状离心机（stacked disc centrifuge）。然后减压浓缩保留的有机溶剂萃取物以获得含有安丝菌素的残留物。此外，可以将水溶性溶剂与发酵培养液混合并对其进行离心以除去固体，从而获得单相、不含固体的溶液。然后可以按如下步骤处理溶液，例如，添加不相溶于水的溶剂使有机物与水相分离，接着浓缩有机相。

水洗溶液中的安丝菌素。

[42]

在不相溶于水的有机溶剂的溶液中的安丝菌素可以用水、酸水溶液、碱水溶液、部分饱和或完全饱和的盐水或任何描述的洗涤剂水溶液的组合洗涤。酸水溶液的例子包括但不限于 pH 在 1～6.9 之间的盐酸、硫酸、乙酸、甲酸、以及磷酸的水溶液。在本发明中，酸水溶液还包括酸性缓冲水溶液体系。酸性缓冲液体系的例子包括但不限于磷酸钠、磷酸钾、乙酸铵、以及甲酸铵，各个溶液的 pH 值均调节到适于各自的酸性缓冲液范围。碱水溶液的例子包括

但不限于 pH 在 7.1～13 之间的碳酸氢钠、碳酸氢钾、碳酸钠、氢氧化钠、氢氧化铵、以及磷酸钠的水溶液。在本发明中，碱水溶液还包括碱性缓冲水溶液体系。碱性缓冲液体系的例子包括但不限于磷酸钠、磷酸钾、硼酸钠、以及碳酸铵，各个溶液的 pH 值均调节到适于各自的碱性缓冲液范围。

[43]

酸性洗涤或碱性洗涤必须在不明显改变安丝菌素分解程度的 pH 内进行。必要时，可以通过离心技术进行非常快速地萃取。部分饱和或完全饱和的盐水的例子包括但不限于不同饱和度的氯化钠水溶液、不同饱和度的硫酸钠水溶液、以及不同饱和度的氯化钾水溶液。还可以用完全饱和或部分饱和的盐水溶液的混合物与碱水溶液或酸水溶液组合进行水洗。

在萃取之前进行过滤：

[44]

在萃取之前，还可以通过过滤或离心分离出含有发酵培养液的安丝菌素中的固体。通过用溶剂比如乙醇、含水的乙醇、或其他的有机溶剂，比如乙酸乙酯、乙酸丁酯、二氯甲烷或丙酮洗涤可以回收固体细胞团块中的安丝菌素，该方法是本技术领域为人所熟知的常用方法之一。如另一申请所描述的那样，通过用已知的芳香族有机溶剂萃取可以回收滤液中的安丝菌素。

安丝菌素的纯化：

[45]

可以对粗产物进行纯化处理，比如在硅胶或氧化铝上吸附层析，接着视需要进行重结晶。优选在预填充柱比如 Biotage 层析系统的 Biotage 硅胶筒柱上进行层析。通过溶剂的浓度梯度可以从柱中洗脱预期的安丝菌素，该溶剂初始为乙酸乙酯和正己烷的混合物，通过不断增加甲醇的量来形成浓度梯度。接着合并并浓缩含有预期安丝菌素的洗脱组分。视需要可以通过析晶进一步纯化安丝菌素，该方法中先用溶剂比如乙酸乙酯溶解产物，接着添加非极性溶剂比如庚烷或正己烷以结晶析出纯的产物。此处使用的术语“析晶”也包含术语“沉淀”，这是因为从溶液中形成的固体可以是无定形的，也可以有确定结构。

细胞结合试剂/美登木素生物碱复合体：

[46]

本发明的工艺可以用于制备用作激活肿瘤前体药物的细胞结合试剂/美登木素生物碱复

合体。用本发明的工艺制备的安丝菌素可以被还原分裂成美登木醇，该美登木醇可以如美国专利 Nos. 5,203,020、5,416,064、6,333,410 和 6,441,163 中所描述的那样用于生成包含美登木素生物碱衍生物的 N-甲基-L-丙氨酸。这些衍生物接着经各种连接体比如含有二硫化物的连接体偶联于细胞结合试剂，优选偶联于抗体。

实施例

[47]

现在结合非限制性实施例对本发明进行说明。

实施例 1：安丝菌素的制备：

[48]

初级接种：包含 2%可溶性淀粉、1%葡萄糖、1%大豆粉、0.5%玉米浆、(Roquette 公司) 0.5% Soytone、0.3%氯化钠、和 0.5%碳酸钙的种子培养基 VM4-1'（400 ml/烧瓶容积）被分别注入到 11 个 2L 容积的锥形烧瓶中。在灭菌后，各个烧瓶用 PF4-4（ATCC PTA-3921）培养物接种。烧瓶在定轨摇床上以 230 rpm 的转速在 28℃下培养 48 h。

[49]

二级接种：然后合并初级接种烧瓶中的物质。在 300 L 的发酵罐中加入 100 L 的 VM4-1' 种子培养基。在灭菌后，发酵罐用 4 L 经合并的初级种子培养物接种。发酵罐保持 28℃，以 80 rpm 的转速搅拌。视需要通过鼓气及增强搅拌来使溶解氧的饱和度保持在 30%以上。在培养 24 h 后，二级种子培养物可被转接到生产容器中。

[50]

生产：两个 300 L 生产用的发酵罐各自加入 250 L 生产用培养基 FM4-6（见表 1）。在灭菌后，发酵罐各自用 15 L 的二级种子培养物接种。发酵罐保持 28℃，以 107±5 rpm 的转速搅拌，鼓气速率为 0.4 vvm。两天后，通过将搅拌速度增加到 170±5 rpm 的极大值，并将鼓气速率增加到 1vvm 的极大值，使溶解氧的含量保持在 30%以上。通过从发酵培养液中取样并用乙醇稀释，接着通过 HPLC 定量分析对安丝菌素的滴度进行每日测定。发酵持续进行，直到第 10 天，安丝菌素的生长量在该点达到稳定为止。两个发酵罐中的安丝菌素在第 10 天的滴度分别是 251 mg/L 和 244 mg/L。通过添加磷酸，将发酵培养液的 pH 调节到 6.5。发酵罐加热到 55°C，并在该温度下保持 1 h 以使微生物失活。然后将发酵罐冷却到室温以促进用有机溶剂萃取。

实施例 2：采用分批补料工艺生产安丝菌素

[51]

1500 L 生产用的发酵罐中加入 900 L 生产用的培养基 FM4-6（见表 1）。在灭菌后，发酵罐用 54 L 如上所述制备的二级种子培养物接种。发酵罐保持 28°C，搅拌速度为 107±5 rpm，鼓气速率为 0.4 vvm。在初始的 0～48 小时内，以 0.39 mL/L/h 的速率注入 28.5%的葡萄糖水溶液。从 48 h 到 288 h 的发酵期间，改成以 0.51 mL/L/h 的速率注入包含 21.5%葡萄糖、7.1% Proflo 和 7.1%异丁醇的储备液。两天后，通过将搅拌速度增加到 170±5 rpm 的极大值，并将鼓气速率增加到 1 vvm 的极大值，使溶解氧的含量保持在 20%以上。通过从发酵培养液中取样并用乙醇稀释，接着通过 HPLC 定量分析对安丝菌素的滴度进行每日测定。发酵持续进行，直到第 13 天，安丝菌素的生长量在该点达到稳定为止。发酵罐中的安丝菌素在第 13 天的滴度为 304 mg/L。通过添加磷酸，将发酵培养液的 pH 调节到 6.5。

[52]

热灭活。发酵罐加热到 55°C，并在该温度下保持 1h 以使微生物失活。然后将发酵罐冷却到 30～40°C 之间以促进用有机溶剂萃取。

实施例 3：安丝菌素的萃取和层析纯化

[53]

将实施例 2 中的发酵培养液与等体积的乙酸正丁酯混合。混合物保持在 30～40 °C 到 45 °C 之间，缓慢搅拌混合物使得这两个相的混合正好发生在溶剂界面处。萃取持续进行 5 天以上，直到有机层的 HPLC 分析显示高于 80%的安丝菌素已经被萃取。接着用降膜蒸发器分离并蒸发有机层，使溶液的最终体积在 20～50 L 之间。经浓缩的萃取物被转移到装有 2.2 kg 硅胶的烧瓶中。通过减压操作旋转蒸发器，蒸去溶剂，将粗安丝菌素涂覆在硅胶上。然后将涂层硅胶转移到 Biotage 有限公司、Charlotesville、VA 的进样组件（SIM）中。用环己烷与正己烷（2:1 v/v）的混合物清洗 SIM，接着将 SIM 连接到配有硅胶筒体的 Biotage 150M 系统中。用乙酸乙酯:正己烷:甲醇的混合物（29.4:68.6:2.0，v/v/v）从柱中洗脱预期产物。合并含有安丝菌素的洗脱组分，接着减压蒸发溶剂。在高真空下，进一步将产物干燥 24 h。

实施例 4：安丝菌素的重结晶

[54]

将上述步骤中获得的干燥产物溶解在热的乙酸乙酯（23 mL/g 的残留物）中。混合物保持在 60～75 °C 之间，直到安丝菌素完全溶解。当混合料的温度保持在 60～75 °C 之间时，缓

慢地添加庚烷（80 mL/g 的残留物）。在添加完所有的庚烷后，将混合料冷却到室温。通过过滤回收晶体，接着在高真空下干燥以获得 221 克纯的安丝菌素。

实施例 5：通过过滤萃取发酵培养液

[55]

将如实施例 2 所述制备的发酵培养液（200 ml）与 200 mL 的乙酸正丁酯强力混合搅拌 5 分钟，获得乳化液。接着添加 Cellatom FW-80 助滤剂（20 g），然后用预先涂有 Cellatom FW-80 助滤剂的布氏漏斗真空过滤混合物。用 40 mL 的乙酸正丁酯洗涤滤饼。将不含固体夹杂物、仅含澄清的有机物层和水层的滤液转移到分液漏斗中。排出水相。保留含有安丝菌素的有机相。

实施例 6：通过离心用不相溶于水的溶剂萃取发酵培养液

[56]

将 1 部分如实施例 2 所述制备的发酵培养液的与 1 部分乙酸正丁酯强力混合搅拌 2 分钟。将获得的乳化液离心 1 分钟，接着分离出含有安丝菌素但不含固体夹杂物的有机层。

实施例 7：通过离心用水溶性溶剂萃取发酵培养液

[57]

将 1 部分如实施例 2 所述制备的发酵培养液的与 1 部分丙酮强力混合搅拌。将混合物离心 1 分钟以粒化固体。分离出上层清夜，并将其与 1/2 部分的正己烷混合。分离水层后，留下澄清的含有安丝菌素的有机相。

实施例 8：用 XAD-16 疏水微球固相萃取安丝菌素

[58]

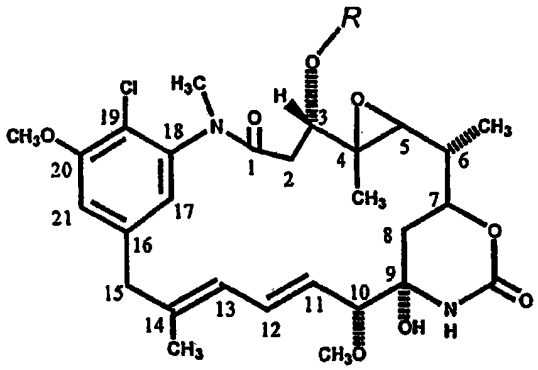
将如实施例 2 所述制备的 1 L 发酵培养液与 10 克 XAD-16 微球混合搅拌 6 小时。然后离心混合物，接着除去上层清液。将固体颗粒转移到小柱中，先用去离子水洗脱，再用 90:10 的去离子水:乙腈洗脱。将含有安丝菌素的洗脱组分合并，接着蒸发溶剂，获得 112 mg 的浓缩萃取物。HPLC 分析表明萃取物含有 50 mg 的安丝菌素。

虽然本发明已用具体的实施方式进行了详细的描述，但对本技术领域的熟练人员来说，可在不脱离本发明宗旨和范围的前提下做各种改进和变动。

[60]

此处提及的所有公开文件均可参照文献。

安丝菌素的结构



	R
P-0	H
P-1	$COCH_3$
P-2	$COCH_2CH_3$
P-3	$COCH(CH_3)_2$
P-3'	$COCH_2CH_2CH_3$
P-4	$COCH_2CH(CH_3)_2$
P-4'	$COCH_2CH_2CH_2CH_3$

图 1