

[19] 中华人民共和国专利局

[51] Int.Cl.⁴



[12] 发明专利申请公开说明书

C12P 1/06

// (C12P 1/36,
C12R 1:365)

[11] CN 87 1 05285 A

CN 87 1 05285 A

[43] 公开日 1988 年 3 月 9 日

[21] 申请号 87 1 05285

[22] 申请日 87.7.29

[30] 优先权

[32] 86.7.29 [33] GB [31] 8618445

[71] 申请人 哥罗布莱普蒂得爱斯皮艾

地址 意大利米兰

[72] 发明人 爱纳斯特 瑞伐

[74] 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 吴惠中

[54] 发明名称 新颖的抗生素及其加成盐

[57] 摘要

一种新颖的抗生素 A42867, 通过在有氧条件下, 沉没培养在可吸收的碳源、氮源、及无机盐类存在的情况下, 培养诺卡氏菌株 SPATCC5349 2 或及产生抗生素 A42867 的突变体或变异体而制备。该抗生素及其加成盐可用于治疗感染性疾病或用作生长促进剂。

881A01356 / 02-74

(BJ) 第1456号

权 利 要 求 书

1、抗生素 A42867 或其盐类，也具有不成盐的形式；有如下的特征：

抗生素 A42867 的物化特征：

A) 紫外吸收光谱，如附图1 所示，展示以下吸收峰：

	最大吸收峰 λ (nm)
a) 0.1 N H C I	282
b) 水	282
c) 磷酸缓冲液 pH7.4	282
d) 磷酸缓冲液 pH9	282
	305 肩 (shoulder)
e) 磷酸缓冲液 0.1 K O H	305
	265 肩 (shoulder)

B) 红外吸收光谱，如附图2 所示，展示了如下吸收峰(cm^{-1}):

3700-3100, 3000-2800 (nujol); 1650, 1580, 1460 (nujol)
1375 (nujol); 1300, 1235, 1210, 1160, 1130, 1060, 1025,
1000, 970, 840, 790-700, 720 (nujol)。

C) ^1H - NMR核磁共振谱，如附图3 所示，展示了如下的信号基团(ppm浓度) 在二甲基亚砷(d_6)(六氘二甲基亚砷) 中于270 MHz 下记录并应用 TMS 作为内标(0.00ppm)(δ - ppm) 0.90, d [(CH_3)₂-(CH)] , 1.02, d [CH_3 -(CH)] , 1.23, d [CH_3 -(CH)] , 1.52, s [CH_3 - $\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}$] , 1.77, m [CH (CH_3)₂], 2.38, s (N- CH_3), 3.0-6.35, s 及 m (芳香族、糖及肽的 CH's),

6.27~9.29 (芳香族 CH's, 肽 NH's 及 酚 OH's)

d=双峰

s=单峰

m=多峰

D) 当在如下条件进行反相 H P L C 分析时, 则测得的相对于盐酸万古霉素 (Vancocin, E L i Lilly, $R_t = 16.36\text{min}$) 的滞留时间 (R_t) 为 0.537。

柱: Ultrasphere O D S ($5\ \mu\text{m}$) Altex (Beckman)
4.6mm (i.d.) $\times$ 250mm

预置柱: Brownlee Labs R P 18 ($5\ \mu\text{m}$)

洗脱剂: 水: 乙腈: 2-乙醇胺: 三氟乙酸 = 9:1:0.01:0.01 (v/v)

流速: 1.6ml/min

紫外检测器: 254nm

内标物: 盐酸万古霉素 ($R_t = 16.36\text{min}$) (Vancocin, E L i Lilly)

E) 当在如下条件进行反相 H P L C 分析时, 测得的相对于盐酸万古霉素 (Vancocin, E L i Lilly $R_t = 9.96\text{min}$) 的滞留时间 (R_t) 为 0.665。

柱: Ultrasphere O D S ($5\ \mu\text{m}$) Altex (Beckman)
4.6mm (i.d.) $\times$ 250mm

前置柱: Brownlee Labs R P 18 ($5\ \mu\text{m}$)

洗脱剂 A: CH_3CN 2% } pH 调至 6.0
(2.5g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 98% }

洗脱剂 B: CH_3CN 70% }
(2.5g/l) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30% } pH 调至 6.0

洗脱过程: 自洗脱剂 A 中含洗脱剂 B 5% 至 60% 时间为 40 分钟

流速: 1.6ml/min

紫外检测器：254nm

内标物：盐酸万古霉素：(Rt=9.96min) (Vancocin, E Li Lilly)

F) 元素分析，在惰性气氛中于140 °C对

样品进行预干燥然后进行元素分析，表明下述的近似的百分组分(平均值)：碳53.3%，氢5.9%，氮7.85%，氯(总量) 4.41%，氯(离子) 2.22%。无机残留物于900 °C空气中测出为0.875%。

G) 在预先加入过量HCl水溶酸的样品中用0.05N KOH水溶液进行滴定，得出的酸碱滴定曲线显示pKa值为3.2、7.1及8.3。

H) 在下列层析系统中的Rf值为0.56：

(NaCl水溶液87.5g/l: NaH₂PO₄ 0.5g/l) 70% } pH调至6.0
CH₃CN 30% }

采用反相硅烷化二氧化硅凝胶板 (RA-18 F₂₅₄)

显现：

—紫外光线，波长为254nm

—用Pauly试剂即重氮化磺胺酸显示黄色，(J. Chromatog 20, 171 (1965), Z. Physiol. Chem. 292, 99, (1953))

—用在最低戴维斯培养基的枯草杆菌 (B. subtilis) ATCC 6633进行生物显色。

用质谱FAMS M_s测定在1560显示M+ H[⊕]峰，说明分子量约为1559

1) 分子量约为1559，从FAB-质谱测定，在1560出现M+ H[⊕]峰。

2、制备如权利要求1所述之化合物的过程，其特为，包括在有

氧条件下沉没培养，在可吸收的碳源，氮源及无机盐类存在的情况下培养诺卡氏菌株 S P . A T C C 53492或及产生抗生素 A42867 的突变体或变异体，从发酵液中提取并分离该抗生素并在需要的情况下转化成所需的盐。

3、如权利要求2 所述的过程，其特征为，其中所述菌株在20℃至40℃的温度范围内培养。

4、如权利要求2 所述的过程，其特征为，其中所述菌株在24℃至35℃温度范围内培养。

5、如权利要求2 所述的过程，其特征为，其中所述抗生素物质的提取及分离是通过将过滤后的发酵液对固定化 D- 丙氨酰- 丙氨酸固相进行亲和层析，然后采用分配、反相或离子交换层析。

6、如权利要求1 所述之用作药物的化合物。

7、将权利要求1 所述的化合物用作抗生素治疗中的药物或作为生长促进剂的用途。

8、以权利要求1 所述化合物作为活性成份的药物配方。

9、治疗感染性疾病的方法，其特征为，其中包括按需对病人施用有效数量的如权利要求1 所述的抗生素。

10、诺卡氏菌 S P . A T C C 53492或及产生抗生素 A42867 的突变体或变异体的生物学纯培养物，所述培养物能够产生在含有可吸收的碳源、氮源及无机物的水溶液营养培养基中具有可供提取数量的抗生素 A42867 。

11、诺卡氏菌 S P . A T C C 53492。

说明书

新颖的抗生素 及其加成盐

本发明针对一种称为抗生素 A42867 的新的抗生物物质及其加成盐，以及其药物配方和用作药剂，特别包括用于治疗对它敏感的微生物所感染的疾病的方法。

本发明的化合物也可以起生长促进剂的作用，对诸如家禽、猪、反刍动物等的生长起到促进的作用。

本发明的另一个目的是提供一种用于制备抗生素 A42867 的方法，包括对新菌株（*Nocardia* s p.）诺卡氏菌 A T C C 53492或抗生素 A42867 产生菌的变异体及突变体进行培养的方法。

诺卡氏菌 A T C C 53492 由土壤样品中分离而得，并于1986年5月23日按照布达佩斯条约规定保藏在美国典型培养物保藏中心（（A T C C）12301 Parklawn Drive , R O C K V I L L E , 20852 Maryland , U . S . A . ）。

该菌株的保藏号为 A T C C 53492 。

考虑到抗生素 A42867 及相应的药理上可接受的盐类之间抗微生物活性的相似性，故而，在本专利申请中，当论及抗生素 A42867 的生物学性质时，也包括相应的盐类，反之亦然，当论及抗生素 A42867 的药理上可接受的加成盐的生物学性质时，也包括了相应的“未加成的”的形式。抗生素 A42867 的生产是在需氧条件下，在含可被吸收的碳、氮源及无机盐类的水质营养培养基中对可产生抗生素 A42867 的诺卡氏菌 S P . , 即诺卡氏菌 A T C C 53492 或产生抗生素 A42867 的诺卡氏菌 A T C C 53492 的变异体或突变体进行培养而实现。在发酵技术中可以采用通常使用的许多营养培养基，但其中某

种营养培养基被优先采用。优先采用的碳源有葡萄糖、甘露糖、半乳糖、淀粉、玉米粉等等。优先采用的氮源为氨、硝酸盐、大豆粉、蛋白胨、肉类抽提物、酵母抽提物、胰蛋白胨、氨基酸等等。可加入至培养基的无机盐类有通常可溶性的钠、钾、铁、锌、钴、镁、钙、铵的、氯化物、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐等的离子化合物。

通常，产生抗生素的菌株在摇瓶中进行预培养，然后，所得培养液用于接种至发酵罐进行保温培养以产生足够量的抗生素物质。用于预培养的培养基可采用与较大规模发酵用的相同的培养基，也可采用其它的培养基。抗生素 A42867 的产生菌株可在 20℃ ~ 40℃ 的温度下生长，优先采用 24℃ 至 35℃ 的范围。

在发酵过程中，可对发酵液或菌丝体提取液样品进行诸如生物测试或薄层层析 (TLC) 或高效液相层析 (HPLC) 等抗生素活性的测定来对抗生素的生产进行监测。

对抗生素 A42867 敏感的生物体，诸如枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 及金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 可用作检定菌。生物测试法一般用琼脂板上进行的琼脂扩散法较好。抗生素活性物质的最大产量一般在发酵后的第 2 至第 5 天之间产生。

抗生素 A42867 是通过将诺卡氏菌株 ATCC53492 及其抗生素 A42867 产生菌的变异体或突变体进行培养，而在发酵液培养中得到的。

诺卡氏菌株 ATCC53492 的形态学特征

培养于土壤琼脂培养基的该菌株的形态与显示丰富的具有中度分枝的长菌丝 (hyphae) 的气生菌丝的放线菌类是相似的。该菌株的一个主要的形态特征是基部菌丝及气生菌丝断裂成杆状的小单元。基部菌丝的断裂在所有用于测试培养特征的琼脂培养基都被观察到，而在第 5 号、第 7 号、Hickey — Tresner 及卵蛋白培养基上则发现了完全的

的断裂的碎片。依靠培养的时间，诺卡氏菌株 A T C C53492 的基部菌丝(pyphae)可充分发育形成分枝并断裂成杆状的碎片单元(elements)。气生菌丝体在土壤琼脂及水琼脂中得到很好的发育。在土壤琼脂上培养的气生菌丝(hyphae)呈长直线状，有时形成小节或成束状的缠结。该菌株在形态上与诺卡氏菌属中的一种有某种相似。

对该菌株的形态特征的分析可以在用于研究其培养特性的同一块培养板来完成。为了确定在琼脂培养板上是否发生断裂作用，将培养基的表面用一塑料小刀取出并将样品置于载玻片上用光学显微镜观察。当该菌株于液体中培养时，显示出大量地断裂成杆菌状的碎片单元。

诺卡氏菌株 S P. A T C C53492 的培养特征

为了测试其培养特征，诺卡氏菌株 S P. A T C C53492 被培养在 Shirling 和 Gottlieb 建议的各种标准培养基(Shirling E. B. and Gottlieb D ,1966- Method for Characterization of Streptomyces species - Int . J. Syst. Bacteriol ,16, 313-340)中，其中还增加几种由 Waksman 推荐的培养基(Waksman , S. A. 1961- The Actinomycetes - The Williams and Wilkins Co . Baltimore , Vol .2, 328--334)。

在需要的时候，用 Maerz 及 Paul 的方法进行颜色测定。(Maerz A. and M. Rea Paul , 1950- A Dictionary of Color- 2nd Edition Mc Garaw- Hill Book Company Inc . New York)。

生物体利用各种不同碳源的能力用 Shirling 及 Gottlieb 所描述的方法进行观察。

培养特征、和生理特征以及碳源利用情况分别于表 I、II、III、IV、及 V 进行了报导。

表 I 中的数据是在 28℃ 温度保温两周后测出的。

表 I

诺卡氏菌株 S P. A T C C53492 株的培养特征

培养基	特征
第2 号培养基(酵母提取液—麦芽琼脂)	大量生长，表面褶皱，棕色 15/ H/11,可溶性色素，黄色
第3 号培养基(燕麦粉琼脂)	中度生长，表面光滑，橙色 12/ L/12,微量气生菌丝，白色
第4 号培养基(无机盐—淀粉琼脂)	大量生长，表面褶皱，暗橙色 13/ L/ 12，微量气生菌丝白色，微量可溶色素，玫瑰色
第5 号培养基 (甘油—天冬酰胺琼脂)	大量生长，表面褶皱 暗橙色13/ L/12,微量 气生菌丝，白色
第6 号培养基 (蛋白胨—酵母提取液 铁质琼脂)	中度生长，表面略皱， 杏黄色10/ F/7
第7 号培养基 (酪氨酸培养基)	大量生长，表面褶皱， 棕色 15/ H/11,微量气生 菌丝，白色

查贝氏 (Czapek)- 蔗糖琼脂	大量生长，表面光滑橙黄色 9/ G/8，微量气生菌丝
燕麦粉琼脂	大量生长，表面略皱， 橙色12/ F/10,微量气生菌丝 白色，微量可溶性色素，玫瑰色
Hickey 及 Tresner 琼脂	大量生长，表面褶皱， 金色9/ I/6
苹果酸钙琼脂	大量生长，表面光滑， 浅黄色10/ C/4，微量气生 菌丝白色
Bennett 琼脂	大量生长，表面褶皱， 棕色15/ H/11
查贝氏 (Czapek)葡萄糖琼脂	大量生长，表面褶皱， 棕色7/ E/ 12，微量气生 菌丝白色，可溶性，色素暗黄色
葡萄糖天冬酰胺琼脂	中度生长，表面略有结皮， 黄色10/ L/5
营养琼脂	大量生长，表面光滑，橙黄

	色9/ G/6/
脱脂乳琼脂	大量生长，表面光滑，桃色 9/ I/5微量气生菌丝，白色
卵白蛋白琼脂	中度生长，表面光滑，无色， 微量气生菌丝
Sabouraud琼脂	大量生长，表面褶皱，棕色 10/ L/10
土豆琼脂	大量生长，表面褶皱，黄色 10/ L/7，微量气生菌丝， 白色，可溶性色素，玫瑰色
水琼脂	极少量生长，表面光滑，无色 完好形成气生菌丝，白色
土壤琼脂	中度生长，表面光滑，无色， 大量形成气生菌丝
葡萄糖胰蛋白胨琼脂	大量生长，表面褶皱，黄色 10/ L/7

字母及数字标明 根据Maerz及 Paul(2)方法测定的颜色。

诺卡氏菌株 S P. A T C C53492 生理特征

表 II

试验	结果
淀粉水解	正
酪氨酸反应	正
酪蛋白水解	正
苹果酸钙的溶解	负
自硝酸盐至亚硝酸盐	负
纤维素分解	负
硫化氢的产生	正 (以醋酸铅纸带测试)
石蕊乳液	{ 脲化 凝固 正 负
温度耐受性	

表 III

15℃ = -
 22℃ = +
 28℃ = ++
 37℃ = ++
 42℃ = +
 50℃ = -

最适于菌落生长的温度在大约自22℃至大约42℃的范围内。

最佳温度为自28℃至37℃。

pH耐受性

表 IV

pH3 = -

pH4 = -

pH5 = ++

pH6 = ++

pH7 = ++

pH8 = ++

pH9 = ++

pH10 = -

pH11 = -

- = 不长

+ = 中度生长

++ = 大量生长

采用 Hickey 及 Tresner 琼脂糖培养基进行 pH 及温度耐受性实验以测定生理特征。

碳源的利用

表 V

碳源利用

碳源	生长
乳糖	+ +
阿拉伯糖	+ +
木糖	+ +
甘露糖	+ +
果糖	+ +
纤维二糖	+ +
半乳糖	+ +
肌醇	+ +
葡萄糖	+ +
棉子糖	-
核糖	+ +
蔗糖	-
水杨苷	+
纤维素	-
鼠李糖	-
- = 不长	
+ = 中度生长	
+ + = 大量生长	

本试验系采用第8号培养基并于28℃~30℃下保温10天之后记取结果。

化学分类研究

菌株在v6培养基中培养(牛肉浸膏0.5%, 自溶酵母0.5%, 蛋白胨0.5%, 水解的酪蛋白0.3%, 葡萄糖2%, NaCl 0.15%), 在30℃下, 置于旋转式摇瓶机(转速200 rpm)摇瓶72小时。在v6培养基中生长的菌丝通过离心作用(3000rpm × 10分钟)而收获, 并用蒸馏水洗涤两遍。菌丝再用乙醇洗涤, 然后在室温下进行层流干燥。

干的菌丝被用作整细胞制剂。

氨基酸分析:

用 Becker 等描述的方法(“通过整细胞水解产物的纸层析快速分辨诺卡氏菌及链丝菌” Appl. Microbiol. 12, 421-423 (1964))进行的氨基酸分析表明有内消旋-二氨基庚二酸的存在。

糖分析:

根据 M. P. Lechevalier 的方法(“有重要临床意义的需氧放线菌的鉴定”, J. Lab. Clin. Med. 71, 934-944 (1968)), 采用 J. L. Stanek 及 G. D. Roberts 描述的薄层层析片(“用薄层层析法识别需氧放线菌丝的简化方法”, 28, 226-231 (1974))进行的糖含量分析, 表明了阿拉伯糖及半乳糖的存在。

诺卡氏菌 S P. A T C C 53492 的识别

由于内消旋二氨基庚二酸及有特征的糖, 诸如半乳糖及阿拉伯糖的存在, 按照 Lechevalier M. P. 及 H. Lechevalier 的分类法(“在需氧的放线菌属的分类中, 以化学组成物作为一个鉴别指标”, Int. Journ. Syst. Bacterial. 20, 435-443 (1970))。该菌种属于细胞壁形态 IV 的放线菌属, 如其它微生物一样, 将 A42867 产生菌菌株的特征进行诱变, 例如, 可通过各种已知的诱变剂, 诸如, 紫外线、x-射线、高频波 放射性射线, 及化学药品, 如亚硝酸、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍等等, 获得该菌株的人工变异体或突变体。所有属于诺卡氏菌属中的各诺卡氏菌种, 凡能产生抗生素

A42867 的,则被视为诺卡氏菌 S P. A T C C53492 株的等同物,并且位于本发明的保护范围之内。

从发酵液中提取抗生素 A42867,可根据已知的技术来实现,这些技术包括:溶剂抽提,可以用对该品不溶解的溶剂或变化溶液 pH 值而发生的沉淀作用,分配层析,反相分配层析,离子交换层析,亲和层析等等。

一种优先采用的方法,包括在固定化的 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸上进行的亲和层析及继而进行的反相柱层析。适用于目前的提取过程的固定化 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸基质由欧洲专利申请第83112555号所揭示。优先采用的基质为有控制孔隙的交联聚右旋糖酐和 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸偶合的基质。

然后,将经过滤的发酵液在固定化 D 丙氨酰- D 丙氨酸上进行亲和层析,在柱中进行或分批间断操作。

抗生素 A42867 与亲和基质的结合系优先采用在 pH 大约为 7.0 ~ 8.0 下进行,洗脱时采用水溶性的碱,使 pH 值处于更为偏碱性的范围(优先采用 9.0 至 11.5 的范围)。这些水溶性的碱,可以为氨水、挥发性胺、碱或碱金属氢氧化物或在极性有机溶剂存在下用任选的碱性的缓冲液,如下述的可与水混合的极性溶剂。

用随意选择的含有盐类、脲素及/或可与水溶性溶剂的 pH 为 4—8 的含水缓冲液洗去柱中的杂质之后,用上述的混合洗脱剂将抗生素 A42867 洗脱下来。加入可与水形成最低沸点的共沸混合液的有机溶剂于所收集的含抗生素组份中,共沸蒸馏之后加入对该品不溶性的溶剂使需要的产物沉淀,由此将组份中含的水份完全去除,从而得到抗生素物质的粗产物。

可以与水形成最低温共沸混合液的有机溶液的典型例子有:正丁醇、苯、甲苯、丁基醚、四氯化碳、氯仿、环己烷、2,5-二甲基呋喃,

己烷及间二甲苯，优先采用的溶剂为正丁醇。

不溶解该品的溶剂的例子有：石油醚、低级烷醚，如乙基醚、丙基醚及丁基醚、及低级烷基酮类，如丙酮。

或者，首先将收集的含抗生素的组份的液体浓缩至小体积，优先采用加入以上确定的有机溶剂而进行的共沸蒸馏，然后将获得的水溶液进行冷冻干燥。

如果洗脱液中用的水溶性碱是不挥发性的，那么在浓缩液进行沉淀或冷冻干燥之前必须进行中和及去盐。

一个适宜的去盐方法包括以下步骤：将含抗生素的水溶液在硅烷化的二氧化硅凝胶柱上上柱，用蒸馏水洗涤然后用极性的与水混合的溶剂与水的混合液进行洗脱。

代表性的极性与水混合的溶剂有：水溶性醇，(诸如甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇) 丙酮，乙腈，低级链烷酸酯(诸如乙酸乙酯)，四氢呋喃，二噁烷及二甲基甲酰胺，及它们的混合液；其中优先采用乙腈

或者，去盐步骤可以如此进行：将含抗生素的溶液在上述的亲和柱上上柱，用蒸馏水洗涤后，用上述的用于洗脱亲和层析柱的挥发性碱的水溶液进行洗脱。

由此而获得的产物为抗生素 A42867。获得纯净的抗生素 A42867 的适宜的方法，可用亲和层析柱进行进一步的提纯。一般采用如上相同的固定相(固定化的 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸)，所需的抗生素物质在上述的在固定的 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸进行的亲和层析步骤之后，被洗脱下来。

优先采用的固定化 D- 丙氨酰- D- 丙氨酸为琼脂糖- ϵ - 氨基己酰基- D- 丙氨酰- D- 丙氨酸，较好的平衡混合液为含 0.16%

(w/v) 氨水的 2 M NaCl 溶液 pH 调至 7 ~ 8, 较好的洗涤液为含 0.16% (w/v) 氨水的，p. H 调至 7 ~ 8 的 2 M NaCl 溶液，较好的洗

脱混合液为0.16%(w/v)氨水。

或者，本发明的抗生素物质可用强或弱阴离子树脂，用包括带有功能基团的聚苯乙烯、丙烯酸或聚右旋糖酐基质，从发酵液中分离出来，或进行再一步的纯化。市售的弱阴离子交换树脂的商品名为：

DowexMW A-1或WGR(Dow Chemical), Amberlite

IRA-73(Rohm 及 Haas), DEAE- 葡聚糖凝胶(Pharmacia)。

根据本发明，可采用的强碱性阴离子交换树脂的商品名为：DowexM

SA-1, SBR, SBR- P(Dow Chemical), Amberlite

IR-904 (Rohm 及 Haas)及QAE- Sephadex(Pharmacia)。

用电解质水溶液的线性梯度洗脱混合剂，诸如，氢氯化钠或钾的水溶液或水与可与水相混的有机溶剂(诸如低级醇(例如，(c₁-c₄) 烷醇) 或低级烷酮(例如，丙酮，甲基乙基酮，等))的混合物的溶液。

抗生素 A42867 的物化特征：

A) 紫外吸收光谱，如附图1 所示，展示了以下的吸收峰：

	$\lambda_{\max}$ (nm)
a)0.1 NHCl	282
b)水	282
c)磷酸缓冲液 pH7.4	282
d)磷酸缓冲液 pH9	282
	305(肩)
e)磷酸缓冲液 0.1 KOH	305
	265(肩)

B) 红外吸收光谱，示于附图2,展示了以下的吸收峰(cm^{-1})：

3700-3100,3000-2800(nujol),1650,1580,

1460(nujol)1375(nujol),1300,1235,1210,1160,

1130, 1060, 1025, 1000, 970, 840, 790-700, 720 (nujol)

C) $^1\text{H-NMR}$ 谱, 示于附图3, 展示了以下的信号功能团 (in ppm) 于二甲基亚砜- d_6 (六氘二甲基亚砜) 并在 270 MHz 记录, 采用 TMS 为内标 (0.00 ppm), (δ = ppm):

0.90, d [$(\text{CH}_3)_2 - (\text{CH})$]; 1.02, d [$\text{CH}_3 - (\text{CH})$],

1.23, d [$\text{CH}_3 - (\text{CH})$]; 1.52, s [$\text{CH}_3 - \overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}$],

1.77, m [$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]; 2.38, s (N- CH_3); 3.0-6.35, s

及 m (芳香族, 糖及肽的 CH's); 6.27-9.29 (芳香族 CH's, 肽 NH's 及 酚 OH's)

d = 双峰

s = 单峰

m = 多峰

D) 当在以下的条件进行反相 HPLC 分析时, 相对于盐酸万古霉素 (Vancocin, Eli Lilly, R_t = 16.36 min 的滞留时间 (R_t) 为 0.537。

柱: Ultrasphere ODS (5 μm) Altex (Beckman)

4.6 mm (i.d.) $\times$ 250 mm

前置柱: Brownlee Labs RP 18 (5 μm)

洗脱剂: 水: 乙腈: 2-乙醇胺: 三氟乙酸

= 9:1:0.01:0.01 (v/v)

流速: 1.6 ml/min

紫外检测: 254 nm

内标物: 盐酸万古霉素 (R_t = 16.36 min)

(Vancocin , Eli Lilly)

E) 当在以下的条件进行反相高效液相层析(H P L C) 分析时, 相对于盐酸万古霉素(Vancocin , Eli Lilly, Rt 9.96min)的 滞留时间(Rt)为0.665 。

柱: Ultrasphere O D S (5 μ m) Altex (Beckman)

4.6mm(i.d.) $\times$ 250mm

前置柱: Brownlee Labs R P 18 (5 μ m)

洗脱剂 A: CH ₃ CN	2%	} pH调至
(2.5g/l) Na H ₂ P O ₄ . H ₂ O	98%	

6.0

洗脱剂 B: CH ₃ CN	70%	} pH调至
(2.5g/l) Na H ₂ P O ₄ . H ₂ O	30%	

6.0

洗脱方式: 洗脱剂 A中含洗脱剂 B的含量自5%至60% 的线性梯度, 时间为40分钟。

流速 :1.6ml/min

紫外检测:254nm

内标物: 盐酸万古霉素(Rt=9.96 min)

(Vancocin , Eli Lilly)

F) 元素分析, 将样品在140 $^{\circ}$ C 温度下的惰性气氛下干燥, 百分组成的近似值如下所列(平均): 碳53.3%, 氢5.9%, 氮7.85%, 氯(总量) 4.41%, 氯(离子) 2.22%。无机残留物0.875%(900 $^{\circ}$ C 空气中)

G) 酸碱滴定曲线, 对预先加入过量的 H C l 水溶液的样品用0.05 N K O H 水溶液滴定, 显示 p K_a 为3.2, 7.1 及8.3 。

H) 在下述层析系统中的 Rf 值为0.56。

氯化钠水溶液87.5g/l: Na H ₂ P O ₄ 0.5g/l	70%	} pH值调 至6
CH ₃ CN	30%	

采用反相硅烷化二氧化硅凝胶板(R A-18 F₂₅₄)

显现:

—紫外线, 波长254nm

—用 Pauly试剂, 即重氮化的对氨基苯磺酸

(J. Chromatog .20, 171 (1965),

Z. Physiol. Chem. 292,99 (1953))

试验为黄色。

—生物自记图表, 采用枯草杆菌(B. Subtilis) A T C C6633
在最低 Davis 培养基上培养。

I) 分子量约为1559, 从 F A B- 质谱测定, 在1560出现M⁺ H⁺
峰。

抗生素 A42867 拥有的酸性及碱性功能团除在合适的 pH条件下
可形成内盐外, 按照惯用的方法还可使之与无机或有机的反离子形成
盐类。

通过酸碱的标准反应, 形成具有典型性且合适的本发明的化合物的
酸加成盐的无机或有机的酸类有: 盐酸、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、双羧苯酸(pamoic acid)、粘酸、谷氨
酸、樟脑酸、戊二酸、乙醇酸(glycolic acid)、苯二甲酸、酒石酸、
月桂烯酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯
甲酸、肉桂酸及其它类似的酸类。

这些有代表性的碱的例子有：碱金属或碱土金属的氢氧化物，如氢氧化钠、钾、钙、镁、钡；氮及脂肪族、脂环或芳香族有机胺，如甲胺、二甲胺、三甲胺，及甲基吡啶。

本发明的“不成盐形式”的化合物向其相应加成盐形式的转化，及反之，即本发明的加成盐形式的化合物向“不成盐”形式的转化，属于普通技术技能，因而包含于本发明之中。

例如，抗生素 A42867 向相应的酸加成盐的转化，可以通过将不成盐形式的抗生素溶于含水溶剂中，再加入摩尔数稍稍过量的选定的酸或碱。然后，将产生的溶液或悬浮液冷冻干燥便可得到所需的盐。

如果最终形成的盐在一种溶剂中是不溶的而不成盐的形式是溶解的，则可在溶有不成盐形式抗生素的有机溶液中加入经化学计算而相当的或稍稍过量的选定的酸或碱后再进行过滤而获得。

不成盐形式的抗生素可通过对溶解在相应的酸性或碱性盐于含水溶剂中进行中和使之游离出其不成盐形式的抗生素。

中和之后如需对过量的酸或碱进行消除，可采用普通的去盐过程。

例如，以硅烷化二氧化硅凝胶、无功能基团的聚苯乙烯、聚丙烯酸及控制孔径的聚右旋糖酐树脂（如葡聚糖 LH20）或活性炭为固相的柱层析可方便地采用。当用水溶液将不需要的盐洗脱之后，通过水及极性或非极性有机溶剂的混合液的线性或阶梯型梯度洗脱所需的产品，如采用的洗脱液为乙腈/水自 50:50 至大约 100% 乙腈。

由现有技术可知，抗生素无论与药物上可接受的酸类（或碱类）或与非药物上可接受的酸类（或碱类）形成盐的过程可用作方便的纯化技术。在成盐及分离之后，抗生素 A42867 的盐形式可转化成相应的不成盐的形式或转化成药物可接受的盐形式。

在某些例子中，抗生素 A42867 的碱加成盐形式更易溶于水及亲水溶剂。

本发明化合物的抗细菌活性可以通过对各种不同的微生物培养物上进行标准稀释法试验 (standard dilution tests)而在体外进行演示。

用于M I C (最低抑制浓度)测定的培养基及生长条件如下所示: 对于葡萄球菌(staphylococci)、粪链球菌(strep · faecalis)及格兰氏阴性细菌(大肠杆菌),采用等灵敏度试验用(Isosensitest)肉汁(Oxoid)培养24小时。对于其它的链球菌(streptococcal)菌种采用Todd-Hewitt肉汁(Difco)培养24小时。对于淋病奈瑟氏球菌(Neisseria gonorrhoeae)采用GC基肉汁(Difco)+1%.

(Isovitalex)多价蛋白质(BBL)及CO₂富含的气氛,培养48小时。对于流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)采用脑心肉汁(BrainHeart broth)(Difco)+1%补充培养基C(Supplement C)(Difco)培养48小时。对于产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)采用AC肉汁(Difco)及厌氧气氛培养24小时。对于其它的厌氧微生物疮疱丙酸杆菌、艰难梭菌,脆弱杆菌采用Wilkins-Chalgren琼脂(参见: T. D. Wilkins & S. Chalgren, 1976, Antimicrob. Ag. Chemother. 10, 926)及厌氧的气氛培养48小时。对于鸡败血枝原体(Mycoplasma gallisepticum)采用P P L O肉汁(Difco)+10%马血清+1%葡萄糖,培养48小时。对于(U. urealyticum)采用P P L O肉汁及如R. T. Evans及D. Taylor — Robinson所述的各补充培养基(J. Antimicrob. Chemother. 4, 57)培养24小时。培养温度采用37℃。接种量如下所列: 对于鸡败血枝原体(M. gallisepticum)1%(v/v)48小时肉汁培养液。对于(U. urealyticum), 大约10⁴颜色变化单位/毫升。对于其它肉汁稀释法的最低浓度测定采用大约10⁴—10⁵菌落形成单位/毫升。对于琼脂稀释M I Cs 艰难梭菌(C. difficile)疮疱丙酸杆

菌 (*P. acnes*) 脆弱杆菌 (*B. fragilis*) 采用大约 10^4 — 10^5 细菌 / 点 (用多点接种器进行接种) 。

某些微生物的最低抑制浓度 (M I C , $\mu\text{g} / \text{ml}$) 如以下的表 I 所示。

		M. I. C. $\mu\text{g} / \text{ml}$
菌 株		抗生素 A42867
金黄色葡萄球菌	L165 (10^4 cfu/ml)	0.25
表皮葡萄球菌	L147 A T C C 12228 (凝固酶阴性)	1
酿脓链球菌	L49 C203	0.13
肺炎链球菌	L44 U C41	0.13
粪链球菌	L149 A T C C 7080	1
缓症链球菌	L796 (临床分离)	0.25
产气荚膜梭菌	L290 I S S 30543	0.13
艰难梭菌	L1363 A T C C 9689	2
疮疱丙酸杆菌	L1014 A T C C 6919	0.5
淋病奈瑟氏球菌	L997 I S M68/126	>128
流感嗜血杆菌 b 型	L970 A T C C 19418	>128
普通变形菌	A T C C 881 L79	>128
大肠杆菌	L47 S K F 12140	>128
绿脓杆菌	A T C C 10145 L 4	>128
白念球菌	S K F 2270 L 145	>128
鸡败血枝原体	L431 S6 Weybridge	>128

抗生素 A42867 经发现具有抗凝固酶阴性的葡萄球菌 (*staphylococci*) 活力。对于表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 及溶血性链球菌 (*S. haemolyticus*) 的一系列临床分离物的最低抑菌浓度 M. I. C ($\mu\text{g} / \text{ml}$) 报导如下:

表 VII

抗生素 A42867 M. I. C

($\mu\text{g} / \text{ml}$)

菌株

表皮葡萄球菌	<i>S. epidermidis</i>	L 393	1
表皮葡萄球菌	<i>S. epidermidis</i>	L 408	1
表皮葡萄球菌	<i>S. epidermidis</i>	L 410	0.5
溶血性链球菌	<i>S. haemolyticus</i>	L 381	4
溶血性链球菌	<i>S. haemolyticus</i>	L 382	8
溶血性链球菌	<i>S. haemolyticus</i>	L 383	1

本发明化合物的抗生素活性也通过鼠败血症实验得到确证。

对照及治疗组的鼠包括10只 CD-1鼠 (Charles River), 重量在18~22g。采用无菌加蛋白胨的盐水稀释过液的酿脓链球菌 (*S. pyogenes* C 203 (L49))培养物而得到的细菌悬浮液, 通过鼠腹膜注射0.5ml 进行感染。将细菌接种量调节至使未治疗动物于48小时死于败血症的剂量。对该化合物的试验是在感染之后立即通过皮下注射而施用。以mg/kg 表示的 ED_{50} , 在第7 天用 Spearman 及 Kärber (D. J. Finney 生物测定的统计方法 “Statistical Methods in Biological Assay”, Griffin, page 524, 1952) 的方法, 通过对每一剂量的存活动物百分数来计算。

在这些条件之下, 抗生素 A42867 的 ED_{50} 值为1.54mg/kg。

一般地, 用于抗细菌治疗的抗生素 A42867 及其非毒性药物上可接受的盐或其混合物, 可通过多种不同途径施用, 如局部施用或非肠胃给药施用。一般地说非肠胃道施用是优先采用的途径。

用于注射的复合物可采用在油性或水载体中为悬浮液、溶液、或乳浊液等形式, 也可含有诸如悬浮、稳定及/ 或扩散剂等佐剂。

另一方面，活性组份也可为粉状，便于施用，加入合适的载体，如灭菌水而重新配制。

按照不同的施用途径，这些化合物可被配成各种不同剂量的形式。

在某些情况下，可以把本发明的化合物配成包有肠溶衣的剂量形式以用于口服，制备方法为现有技术已知的（例如，参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”，fifteenth edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, U S A, Page 1614）的例子。

这种情况发生在，当抗生素物质特别需要在肠道中的吸收的情况下，而同时又能在胃中通过时并不发生变化。

活性成份的施用数量取决于接受治疗者的大小及条件，以及施用途径及频率，及致病原因等。

本发明的抗生素物质及其生理上可接受的盐类，在每天剂量为病人每公斤体重施用大约0.5mg 至50mg时是有效的，每天可随意地分1至4次施用。

特别希望获得复合物的剂量单位每单位含大约100 至5,000mg。

适于注射的载体的典型例子有：注射用灭菌水、Ringer 氏溶液、0.9%盐水及5%葡萄糖（dextrose）。对于静脉输注，抗生素在载体中的合适浓度在大约5%至10%。其它合适的配方形式有密闭小瓶、塑料囊、消毒橡皮塞封口小瓶及其它形式。

此外，本发明的抗生素物质可制成局部施用的制剂，诸如溶液、药膏、及洗液。这些制剂通常含0.1 至15%(w/v)的活性成份。

另外，本发明的抗生素物质可用于抑制造成肠道中假膜性结肠炎的艰难梭菌（*Clostridium difficile*）的生长。这些抗生素可用于治疗肠道中假膜性结肠炎，通过口服有效剂量的抗生素或制成药物上可接受剂量形式的药物上可接受盐来施用。对于这种用法抗生素可以

制成明胶胶囊药丸或液体悬浮液形式进行施用。

抗生素 A42867 或及可接受的盐，除具药物活性外，还可用作动物生长促进剂。

对于此种目的，本发明的化合物被混于合适的食料中口服施用。采用的合适的浓度为当通常需要消耗的食料数量中含有促进生长有效数量的活性药剂。

在动物饲料中加入本发明的活性化合物的方法最好采用这样的办法：制备含有有效数量的活性化合物的合适的预混合饲料，然后再将之拌入完全的饲料中。

制备及施用这类预混合饲料及完全饲料的方法在如下的参考书中被描述，(诸如“应用的动物营养物”(W. H. Freedman and C O. S. Francisco U S A 1969 或“家畜饲料及送料”(O and B books, Corvallis, Oregon U S A 1977)并在此用作参考。

以下的例子对本发明进行进一步描述，而不对之产生任何限制。

例1: 抗生素 A42867 的生产

将产生抗生素的生物体(诺卡氏菌 S P. A T C C 53492)的原培养物在燕麦粉琼脂斜面上划线接种，并于28℃温度下培养2周。

将一个菌环生长的菌株接种在500ml 三角烧瓶中，瓶中含有的种子培养基的组成为葡萄糖2.0%、大豆粉0.8%、酵母浸汁0.2%、Na NaCl 0.1%及 CaC O₃ 0.4%，培养基在灭菌前 pH被调至7.3。该瓶在28℃下在一个旋转式摇瓶机上保温培养72小时。然后将100ml 的培养液接种到含有4 升相同种子培养基的发酵罐中，培养物在28℃下培养48小时并以大约900rpm的速度搅动，并在每分钟，每体积滴入1 标准立升的空气。将4 立升种子培养液接种至含有200 立升组成成份与种子培养基相同的发酵培养基的发酵罐中，在大约250rpm的速度进行搅拌的情况下，进行96小时的发酵，并通入1 标准立升的空气·每体积

每分钟。

用培养于最低戴维思 (Davis) 培养基上的枯草杆菌 (*B. subtilis*) 对抗生素的活性进行测定。

例2: 抗生素 A42867 的提取

如例1 所述的得到的全部发酵液(400升) 利用助滤剂 (Hyflo-Floma[®]) 在滚筒过滤器进行过滤。滤液用2 N的氢氯酸调节 pH值至7.5 后, 加入至1000ml经过预膨胀的 D- 丙氨酸- D- 丙氨酸- 氨基己酰基- 葡聚糖4 B改进的基质 (如欧洲专利申请第83112555.4描述的方法来制备), 在轻微搅拌的情况下放置过夜。

树脂通过过滤而回收, 当培养液弃去后, 用(10 升) 含5%(w/v) Na Cl 的 pH 为7.5 的0.5%(w/v) 盐酸- 三羟甲基甲胺 (Tris) 缓冲液进行洗涤, 然后用水(4×5 升) 洗涤。

与树脂发生选择性结合的产物用1.5%(w/v) 的氨水(4×5l) 进行洗脱, 并在减压的情况下, 加入正丁醇进行共沸蒸馏, 从而浓缩至较小的体积 (大约1,800ml)。

将浓缩的水溶液冷冻干燥而得到抗生素 A42867 的粗产品(75.6 克)。

例3: 粗产品抗生素 A42867 的纯化

将通过例2 的步骤而获得的抗生素 A42867 的粗产品(75 克) 溶于2 升含有2 M Na Cl, 用0.1 N Na OH溶液调 pH至7.5 的水溶液中, 然后过滤。

滤液以500ml/小时的速度在一个1000ml的预先用含有2 M NaCl及0.6ml三角×100(辛基氧基聚乙氧基乙醇) ((Triton) X100) (Baker grade) 的0.04M硼酸盐缓冲液p H7.5 平衡的, 经预涨的 D- 丙氨酸- D- 丙氨酸-6- 氨基己酰基- 葡聚糖-4 B·改进的基质的柱 (按欧洲专利申请第83112555.4号描述的方法制备的)(0.1 ×

0.1m) 上进行上柱。

用8 升8 M脲素(pH7.5)以500ml/h 的速度对柱进行洗涤, 继而用70升Na OH水溶液(pH10) 洗脱并按1000ml收集每组份。

各组份用琼脂圆碟测定法在枯草杆菌 (*B. subtilis*)培养物上进行测定, 将无活性的组份弃去,将活性组份 (在此例中为63~70组份) 合并, 在减压的情况下, 加入正丁醇, 通过共沸蒸馏浓缩成小体积(500ml), 然后冷冻干燥得到抗生素 A42867 (4克)。

例4: 抗生素 A42867 的纯化与去盐

将由例3 得到的抗生素 A42867 3.5 克溶于70ml的含磷酸二氢钠一水合物(2.5g/l)及乙腈 (91:9) 的溶液中并过滤。

10ml滤液在填充有40克10 μ m R P18 (Lichrosorb)反相硅烷化凝胶 (Merck) 的不锈钢柱(2 $\times$ 50cm) 上进行上柱。该柱为 Chromatospac Modulprep Unit 的一个部件 (Jobin Yvon, 16- 18 Rue de Canal 91169 Long Jumeau, France)。

用与溶解样品时采用的溶液相同的溶液, 以8ml/min 速度对该柱进行洗脱, 按每50ml收集组份。

每一组份通过HPLC及纸圆片生物测定法用敏感微生物, 诸如枯草杆菌 (*B. Subtilis*)进行监测。

将对于枯草杆菌 (*B. Subtilis*)有活性的七个流出组份合并, 在减压的情况下蒸馏去除乙腈, 剩留物用一定数量的水稀释至与原溶液相当的体积。

溶液 pH值被调至7.5, 然后以100ml/h 的流速在5 $\times$ 15cm规格的预先用0.04M硼酸盐缓冲液(pH7.5)平衡的预涨的D- 丙氨酸- D- 丙氨酸-6- 氨基己酰基- 葡聚糖-4 B改进的基质 (按欧洲专利申请第83112555.4号所描述的方法制备) 的柱上进行上柱。

用8 升水 (用0.5ml/l 1 N盐酸酸化) 洗涤柱。

然后用1.5%(w/v) 的氨水洗脱并按每100ml 体积收集组份。

收集那些对枯草杆菌 (B. Subtilis)有活性的组份，减压浓缩并冷冻干燥得到具有前述理化特征的去盐的抗生素 A42867 产品 1.2 克。

说明书附图

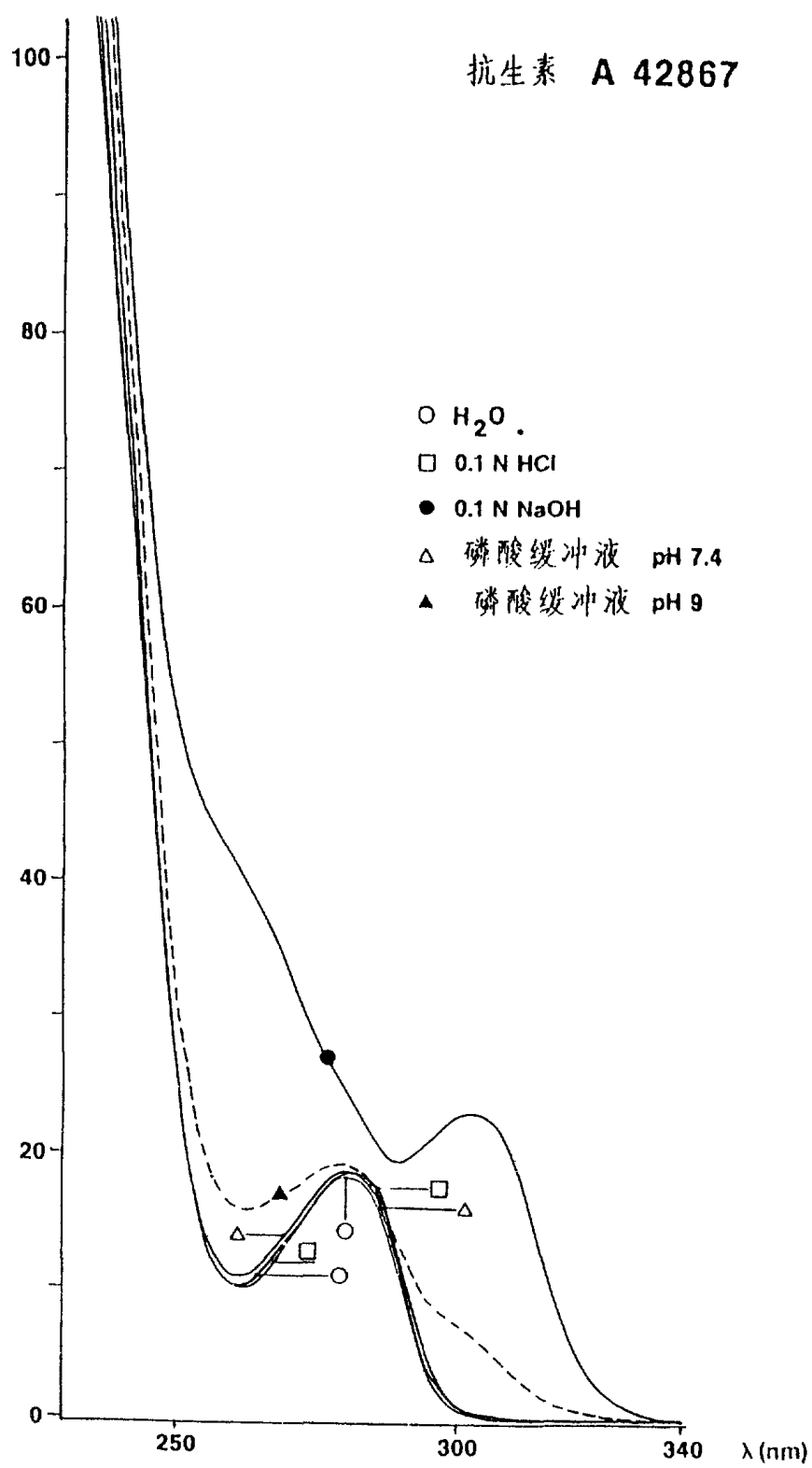


图 1

抗生素 A 42867

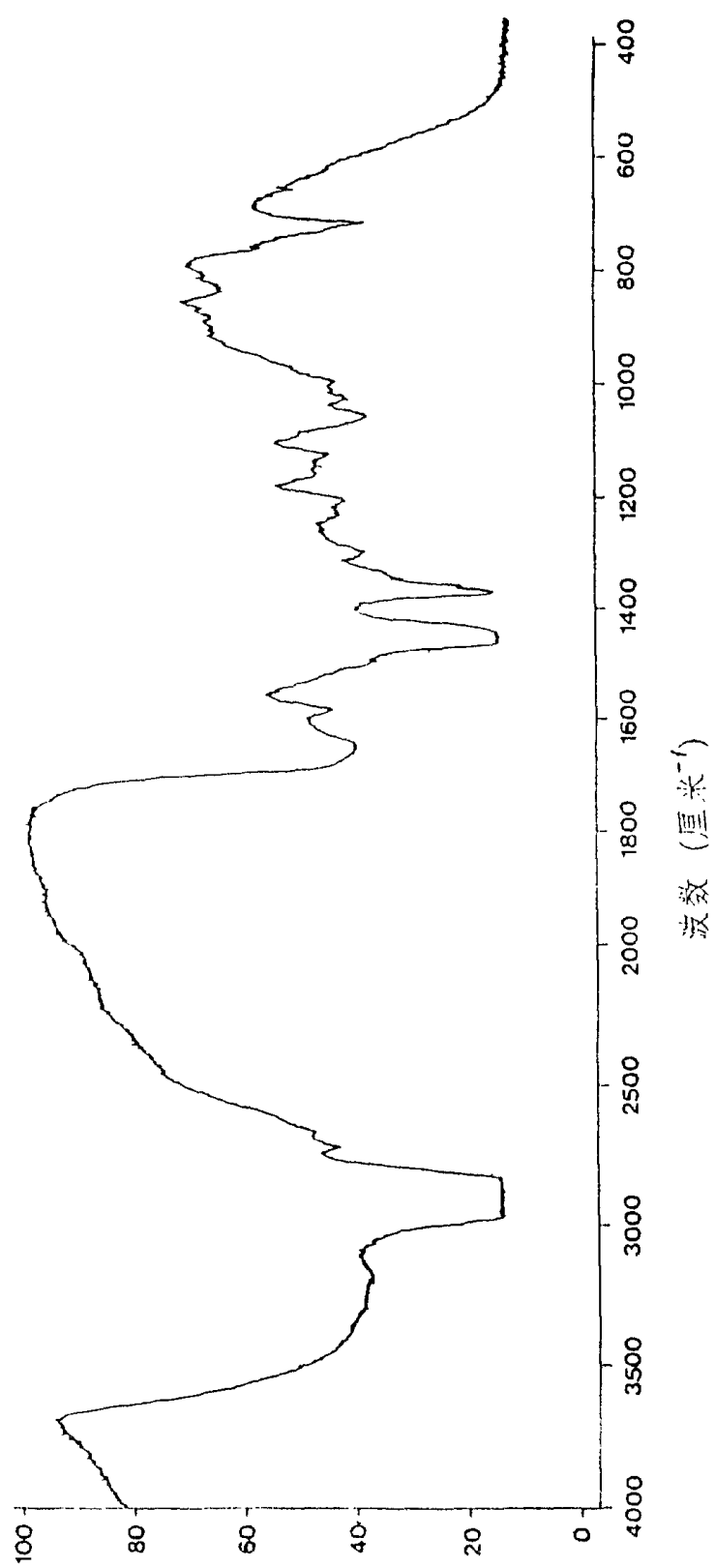


图 2

抗生素 A 42867

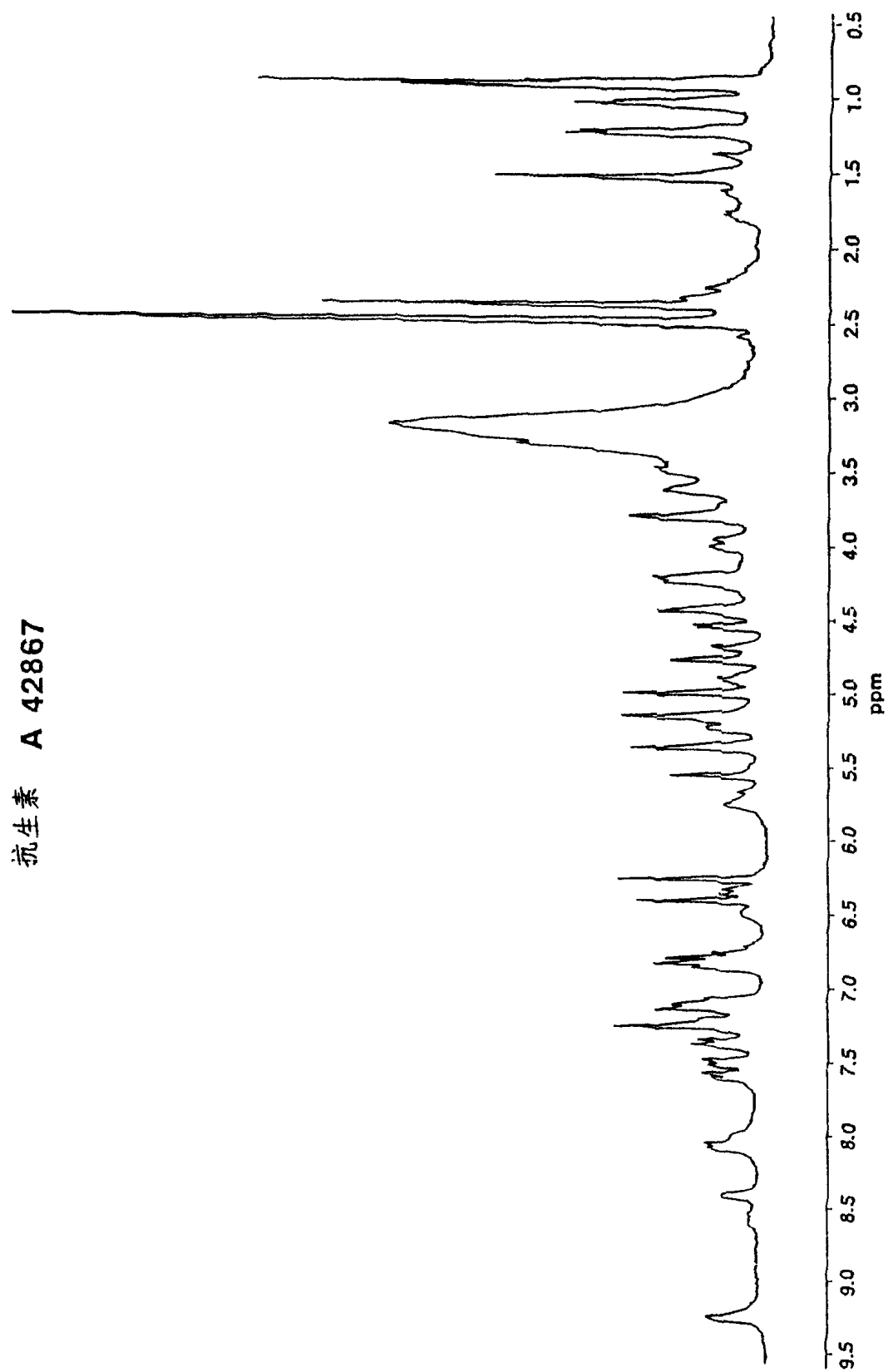


图 3