



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 92113885.7

[51] Int.Cl⁵

C12P 17/10

[43] 公开日 1993年8月4日

[22] 申请日 92.12.15

[30] 优先权

[32] 92.1.6 [33] US [31] 07/817,235

[71] 申请人 弗埃塞股份有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 沃尔特·P·卡论 马克·T·杰斐逊
迈克尔·P·莫耶

[74] 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 吴惠中

C12N 1/20 A61K 31/395
/(C12P17/10 C12R1:55)

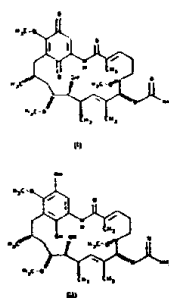
说明书页数: 11 附图页数:

[54] 发明名称 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌的制备和用途

[57] 摘要

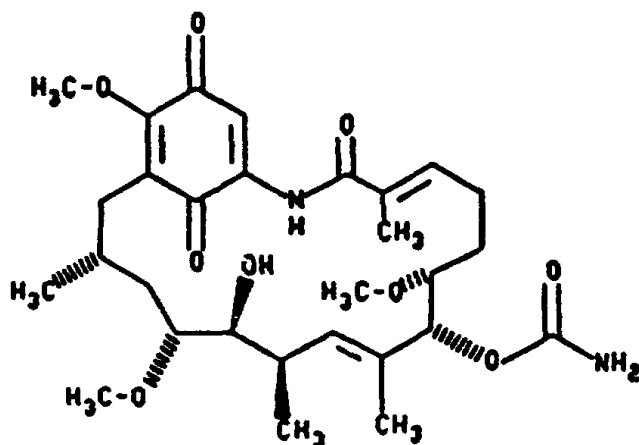
本发明公开了一种发酵和分离化合物(I)和(II)的方法,这二种化合物都属于袪霉素苯醌抗菌素类,如结构式(I)和(II)。同时也公开了由化合物(I)化学合成化合物(II)的方法。

本发明的化合物能用于对抗增殖性疾病,包括但不限于哺乳动物尤其是人体的癌症。本发明的化合物也被期望用于抗某些微生物,并可作为免疫抑制对抗自身免疫性疾病。



>02<

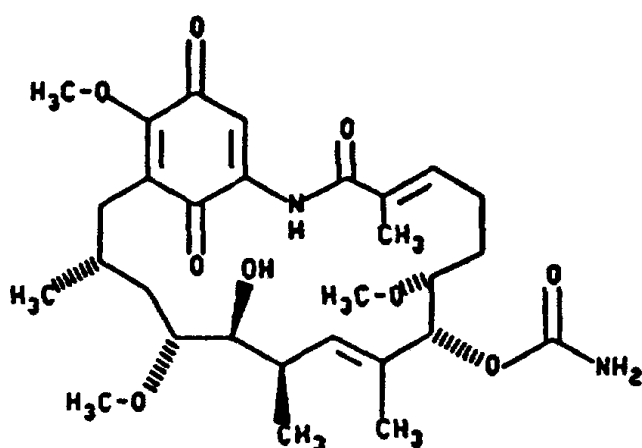
1. 一种制备结构式(I)化合物的方法



(I)

其特征在于包括步骤(a)在水溶性营养培养基中,在淹没通气条件下,繁殖微生物Streptomyces hygrosopicus, ATCC 55256,其中营养培养基包括碳水化合物来源,有机氮来源,生长物质和含有微量元素的无机盐;(b)分离结构式(I)化合物。

2. 结构式(I)化合物的使用

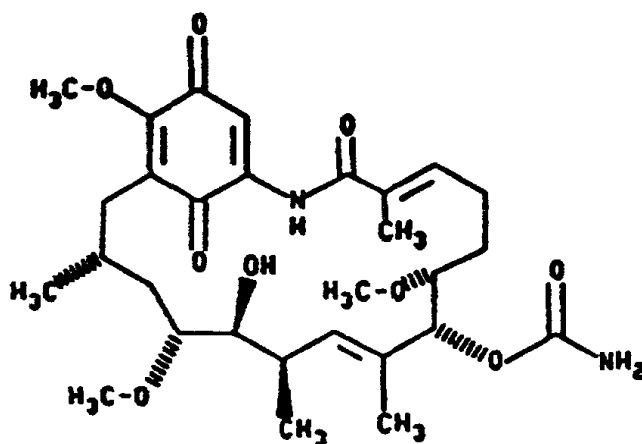


(I)

其特征在于可用于制备治疗哺乳动物增殖性疾病的药学组合物。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于增殖性疾病为人体乳腺癌，卵巢癌或胃癌。

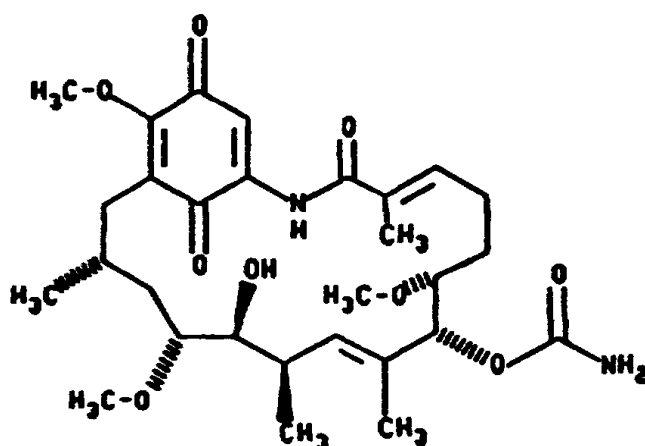
4. 结构式 I 化合物的用途



(I)

其特征在于可用于制备治疗哺乳动物自身免疫性疾病的药学组合物。

5. 结构式 (I) 化合物的用途

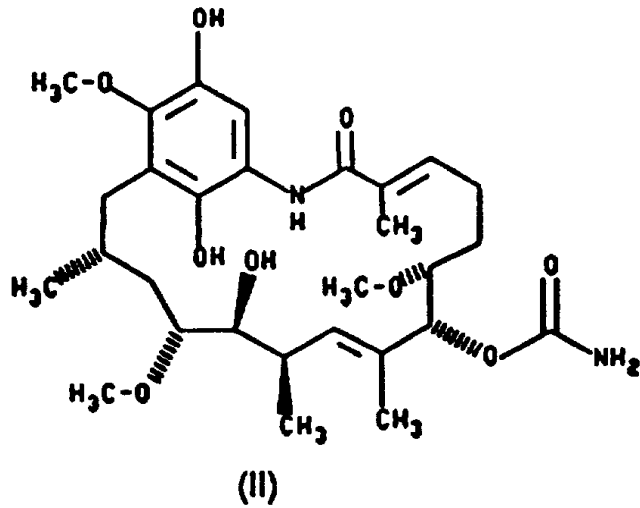


(I)

其特征在于可用于制备治疗哺乳动物的细菌，病毒，真菌或原

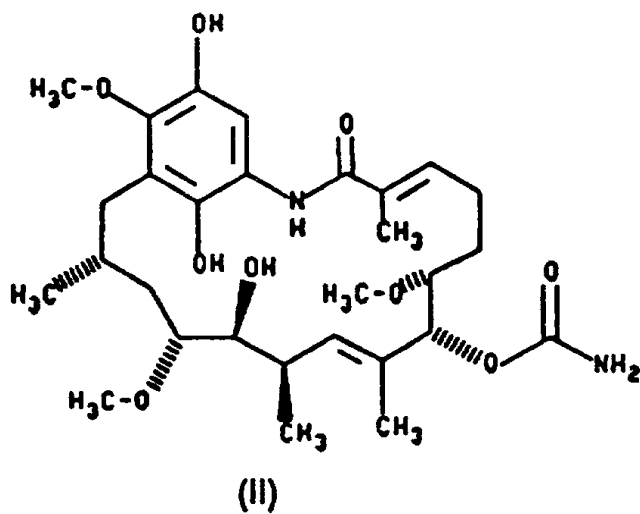
虫感染的药学组合物。

6. 一种制备结构式(I)化合物的方法



包括步骤(a)在水溶性营养培养基中,在淹没通气条件下,繁殖微生物 *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, 其特征在于营养培养基包括碳水化合物来源,有机氮来源,生长物质和含有微量元素的无机盐;(b)分离结构式(I)化合物。

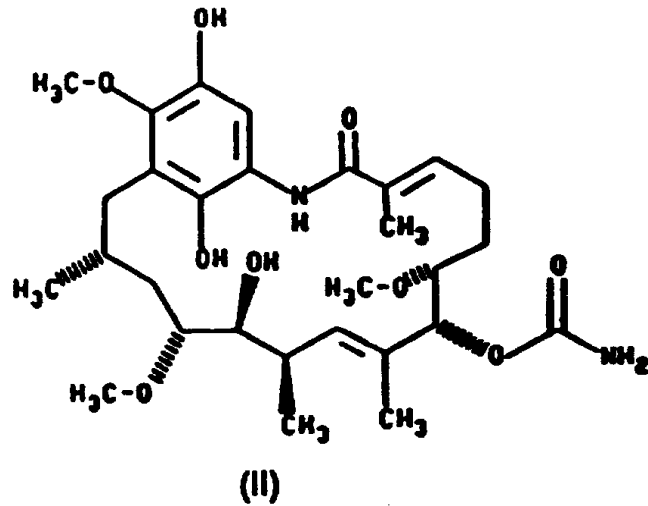
7. 结构式(I)化合物的使用



其特征在于可用于制备治疗哺乳动物增殖性疾病的药学组合物。

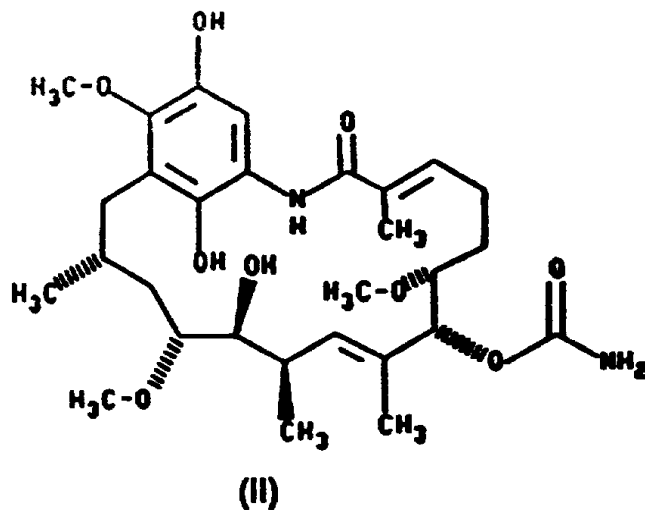
8. 如权利要求 7 所述的用途, 其特征在于增殖性疾病为人体乳腺癌, 卵巢癌或胃癌。

9. 结构式(Ⅰ)化合物的用途



其特征在于可用于制备治疗哺乳动物自身免疫性疾病的药学组合物。

10. 结构式(Ⅰ)化合物的用途



其特征在于可用于制备治疗哺乳动物的细菌, 病毒, 真菌或原虫感染的药学组合物。

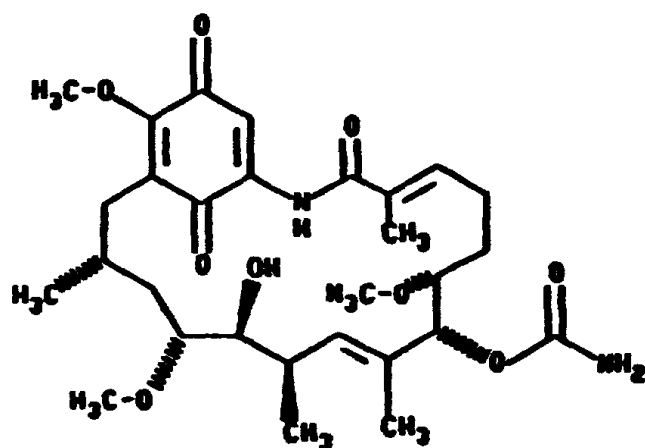
4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌的制备和用途

本发明涉及一种制备 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌的新方法,即使用标准发酵方法及条件发酵微生物 Streptomyces hygroscopicus, 其 Pfizer 培养收集号为 FD29068, 是一种由 NRRL 3602 经传代培养得到的衍生物, 现作为 ATCC 55256 被保藏, 然后使用标准分离方法分离本发明的化合物。该氢醌也可以由 4,5-二氢格尔德霉素化学合成。

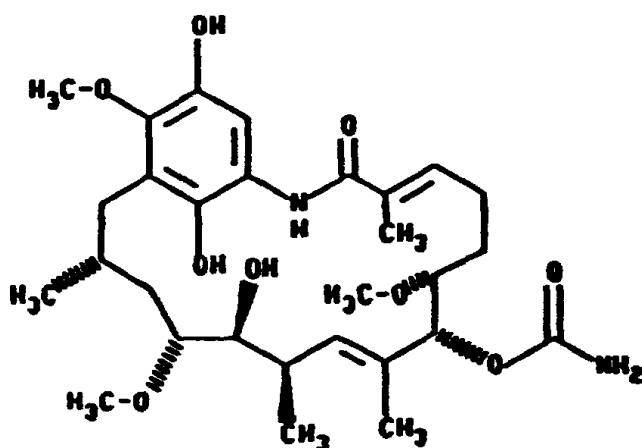
4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌均属于抗菌素的袪霉素苯醌类化学化合物。现在认为, 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌是袪霉素苯醌类中熟知的一员, 即格尔德霉素的衍生物。格尔德霉素本身是通过发酵微生物 Streptomyces hygroscopicus, NRRL 3602, 并从发酵肉汤中分离得到。现已知, 格尔德霉素能有效对抗某些微生物, 主要是酵母菌和真菌。格尔德霉素的制备和用途已在美国专利 3,595,955 公开。4,5-二氢格尔德霉素以前是由格尔德霉素催化氢化而合成的。4,5-二氢格尔德霉素的半合成可以参考《有机天然产物的化学处理》, 《袪霉素抗菌素化学》, 33, 1976, P. 278。时至今日, 现有技术中一直没有公开过 4,5-二氢格尔德霉素的用途。

在德温特文摘 82-98300E, 81-70796D, 80-72388C 和 80-62760C 中曾记载了格尔德霉素的半合成衍生物及其作为抗肿瘤药的使用。

本发明提供了一种制备具有化学结构式 I 的 4,5-二氢格尔德霉素和具有化学结构式 II 的 4,5-二氢格尔德霉素的氢醌的方法, 结构式如下。



(I)



(II)

本方法包括在微生物 Streptomyces hygroscopicus, ATCC 55256, 的水溶性营养培养基中淹没需氧性繁殖, 随后分离结构式 I 和 II 化合物。发明人发现可通过发酵 Streptomyces hygroscopicus, ATCC 55256, 获得 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌, 而以前并不知道此微生物能制造本发明的化合物。4,5-二氢格尔德霉素在治疗增殖性疾病方面, 特别是哺乳动物的癌症, 更特别的是人体的癌症, 显示出有价值的用途。4,5-二氢格尔德霉素被期望能有效地治疗某些 G^+ 和 G^- 菌感染; 可作为有效的杀病毒剂和除草剂并且具有抗真菌和抗原虫的特性。由于此化合物还具有免疫抑制的特性, 因此它可望用于治疗一系列自身免疫性疾病, 包括但不局限于类风湿性关节炎和移植物排斥宿主疾病。

4,5-二氢格尔德霉素的氢醌是一种新化合物，可从自然来源分离获得或由化学合成而获得。4,5-二氢格尔德霉素的氢醌可采用与分离格尔德霉素和4,5-二氢格尔德霉素本质上相同的方法从Streptomyces hygroscopicus 的发酵肉汤中分离获得。该氢醌还可以利用一种化学还原剂还原4,5-二氢格尔德霉素而化学合成。4,5-二氢格尔德霉素的氢醌被认为可有效地对抗列于上述的适用于4,5-二氢格尔德霉素的所有相同疾病。本发明提供了一种从自然来源，名为Streptomyces hygroscopicus，ATCC 55256，制备4,5-二氢格尔德霉素和4,5-二氢格尔德霉素氢醌的新方法，以及提供了本发明中该化合物的新的用途。而且，还提供了从4,5-二氢格尔德霉素化学合成氢醌的方法。

Streptomyces hygroscopicus，NRRL 3602，也就是Pfizer培养收集号FD 29068，已根据布达佩斯公约保藏于一个公认的保藏单位：美国典型培养收集中心，洛克维尔，马里兰州(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)。该处能提供长期保藏，并准备在本申请获得专利后向公众提供。该微生物被命名为Streptomyces hygroscopicus，ATCC 55256。在本申请待决时，可根据37CFR1.14和35USC122将藏品提供给由美国专利和商标局委员会指定的人员，并使之在提出同样申请或后续申请的国家符合该外国专利法。所有对于保藏微生物的公开的限制在1993.6.2或在授予专利权后，无论那一个在前，都将不能改变地被取消。

化合物(I)和(II)都是从Streptomyces hygroscopicus，ATCC 55256，发酵肉汤中分离得到的天然产物。繁殖Streptomyces hygroscopicus，ATCC 55256以获得4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌的方法与繁殖该微生物以获得格尔德霉素的方法相同。繁殖方法在现有技术中是标化的，记载于美国专利3,595,955，此处将其所提示的结合起来作为参考。Streptomyces hygroscopicus，ATCC 55256，培养

物可于 24°—36℃，在淹没状态并伴随搅拌和通气下于培养基中生长，该培养基含有碳水化合物来源如糖，淀粉，甘油；有机氮来源如大豆粉，酪蛋白氨基酸，酵母菌浸出液，生长物质如谷类溶解物，鱼粉，棉籽粉；含有微量元素如铁，钴，铜，锌的无机盐等。通过将接种过 ATCC 55256 培养物的琼脂斜面上刮下生长细胞制备接种物。在琼脂斜面上开始生长的合适固体培养基是 ATCC No. 172，其组成如下。

<u>ATCC*172</u>	<u>克/升</u>
葡萄糖	10
可溶性淀粉	20
酵母菌浸出液	5
+NZ 胺 A	5
碳酸钙	1
琼脂	20

*加蒸馏水至 1000ml 并用 KOH 调节 pH 至 7.0。

+NZ 胺 A 是 Kraft, Inc., Product of Quest International (Sheffield Products) 的注册商标。

培养 Streptomyces hygroscopicus, ATCC 55256, 和分离结构式 I 和 II 化合物均采用与以前发酵生产格尔德霉素相同的方法进行。例如，参照美国专利号 3,595,955。较佳的是在温度 24°—36℃ 和伴有搅拌的淹没通气条件下，在水溶性营养培养基中进行培养。对培养有用的营养培养基包括可吸收的碳来源如糖，淀粉和甘油；有机氮来源如大豆粉，酪蛋白氨基酸和酵母菌浸出液。生长物质来源如谷类溶解物，鱼粉和棉籽粉以及无机盐如氯化钠和微量元素如铁，钴，铜和锌。同样还需使用缓冲剂如碳酸钙和磷酸钙。如果在发酵过程中起泡过多，可向发酵培养基中加入消泡剂如植物油和硅。

为了淹没生长而对槽中培养基的通气是由喷洒器打入发酵肉汤中，其较佳的维持通气速率是每发酵肉汤体积每分钟 $1/2$ —2 体积净化流通空气。搅拌采用与现有发酵技术中常用的搅拌器来维持。搅拌速率取决于所使用的搅拌器的型号。通常，震荡器烧瓶的转动速率是 150—200 转/分钟，而发酵罐的转动速率通常是 300—1700 转/分钟。当然，在细菌的转移及其整个生长过程中必须保持无菌条件。

通过使接种有培养物的培养琼脂斜面或接种 Roux 瓶的生长，可得到根据本发明制备抗菌素的接种物。适合细菌在琼脂斜面上和 Roux 瓶中开始生长的固体培养基是 ATCC 培养基 no. 172。生长的接种物用于接种震荡器烧瓶或接种槽或者接种槽由震荡器烧瓶接种。在震荡器烧瓶中生长一般于 4—5 天达到最大值，然而接种物在淹没的接种槽中生长通常最佳时期为 2—3 天。

在发酵肉汤中，同时产生的尼日利亚菌素和黑孢菌素，都能有效地对抗 G^+ 和 G^- 菌，都是 4,5-二氢格尔德霉素产生相关的良好生长指示剂。因此，利用金黄色葡萄球菌 ATCC65389 或枯草芽胞杆菌 ATCC 6633 的敏感株对肉汤进行生物试验就能检验发酵肉汤的生物活性。用标准平皿检测技术，在该法中，围绕饱浸有肉汤的滤纸圆片周围的抑制圈可作为抗菌效能的度量值。而且，当检测在发酵培养基中产生的抗菌素以及分析从发酵肉汤中提取的粗产物和纯化物的组成时，利用硅胶的薄层层析也是一种有效的工具。薄层层析用乙酸乙酯展开，用喷洒香草醛试剂和在 80°C 加热 TLC 板显示抗菌素化合物。在展开过的平板上也可铺上接种过金黄色葡萄球菌或枯草芽胞杆菌的琼脂，在 37°C 孵育 16 小时以显示抗菌素。

由 *Streptomyces hygroscopicus*, ATCC 55256, 发酵制得的结构式 I 和 I 化合物，可通过常规方法分离或回收，例如，用有机溶剂如氯仿，乙酸乙酯，甲基异丁基酮或丁醇在其自然的 pH 下提取全部，不能滤过的发酵肉汤。或者，在生长完成后分离菌丝体，并用

有机溶剂提取菌丝体。提取液随后浓缩成薄糖浆，再用层析法得到纯抗菌素。

以下为一种分离和回收结构式 I 和 II 化合物的典型方法。将全部 Streptomyces hygroscopicus, ATCC 55256 发酵肉汤用甲基异丁基酮提取。蒸去溶剂得到一薄糖浆。该糖浆溶于二氯甲烷，装硅胶柱，并从纯二氯甲烷到纯乙酸乙酯的浓度梯度洗脱。洗脱液用薄层层析检查。含有结构式 I 的馏分合并后蒸发得到干品。含有结构式 II 的馏分合并后蒸发得到干品。如果需要的话，产品可以经结晶化或柱色谱法进一步纯化。

结构式 I 和 II 化合物被认为可用于对抗某些种类的真菌植物病原体，G⁺和 G⁻菌和某些寄生性微生物。利用美国专利 3,595,955 中公开的方法可测定 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌对抗上述微生物的用途。

结构式 I 化合物还能抑制某些人体癌细胞的生长。根据在 M. C. Alley et al. 《癌症研究》48,589—601 Feb,1,1988 上的方法，使用 SKBR₃和 MCF7 细胞系列，可以测定 4,5-二氢格尔德霉素的体外活性。因此，4,5-二氢格尔德霉素在治疗癌症，尤其是人的乳腺癌，卵巢癌和胃癌上特别有价值。结构式 II 化合物也认为适用于上述目的。

4,5-二氢格尔德霉素还具有很强的免疫抑制作用，并可用已知的现有技术测定。通过对白细胞介素-2 和大戟二萜醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(PMA) 刺激引起的 T-细胞增殖的抑制作用的评估，可以非药物治疗作对照用氘标记的胸苷的摄取减少来测定，从而方便地测定其活性。化合物 II 也被认为具有免疫抑制作用。

当结构式 I 和 II 化合物用作抗增殖剂，如抗癌剂，它们可直接用于哺乳类，单用或根据标准药理学实践与药理学上可接受的载体或稀释剂形成药理学组合物使用。化合物可通过口服或非肠道给药。非肠

道给药包括静脉内，肌肉内，腹膜内，皮下和表面给药。

对于本发明结构式 I 和 II 化合物的口服使用，化合物可以采用如片剂或胶囊剂，或水溶液及混悬液的形式给药。在采用片剂形式口服使用时，通常需要载体包括乳糖和玉米淀粉，还常加入润滑剂，如硬脂酸镁。在采用胶囊形式口服使用时，有用的稀释剂是乳糖和干玉米淀粉。当需要用水性混悬液口服使用时，活性成分需与乳化剂和混悬剂合用。如果需要，可以加入某些甜味剂和/或矫味剂。当肌肉内，腹膜内，皮下和静脉内使用时，通常需要制备活性成分的灭菌溶液，溶液的 pH 值适当地调节和缓冲。当血管内使用时，需控制溶剂的总浓度，从而保证制剂的等渗性。

在含有结构式 I 和 II 化合物的药学组合物中，载体与活性成分的重量比正常是在 1:10—10:1 范围。然而，在某些特定情况下，所选择的比率必须取决于活性成分的溶解度，预期的剂量以及给药的精确途径等因素。

当结构式 I 和 II 化合物用于人体，通常由处方医生决定每天的剂量。而且，剂量将会根据年龄，体重和病人个体的反应性，以及病人症状的严重程度和所用特殊化合物的效能而变化。但是，在大多数情况下所需的有效剂量为 0.01—0.5g(如，每 4 小时至 6 小时)。对于长期给药，大多数情况下，有效剂量为每天 0.01—1.0g，较佳的为每天 20—250mg，一次或分次给药。另一方面，在某些情况下，可能必须使用超出这些范围的剂量。

为了进一步阐述本发明，特提供下列实施例。

实施例 1

1. 接种物的制备

适合在琼脂斜面上和 Roux 瓶中开始生长的固体培养基为 ATCC 培养基 No. 172。在 300ml 震荡器烧瓶中，分布 100ml 培养基，然后震荡器烧瓶在 120 °C 和 15p. s. i 灭菌 30 分钟。冷却后，培

培养基接种取自 Streptomyces, hygroscopicus, ATCC 55256, 的生长细胞混悬液, 于 ATCC No. 172 培养基琼脂上培养生长。烧瓶在振荡器上 28℃ 振荡 3—5 天, 该振荡器的移位为 1.5—2.5 英寸, 转速为 150—200 转/分(CPM)。

用下列培养基之一制备振荡器烧瓶:

<u>JDYTT</u>	<u>克/升</u>
结晶葡萄糖	10
玉米淀粉	5
玉米浸渍液	5
NZ 胺 YTT	5
氯化钴	0.002
碳酸钙	3
	pH6.9—7.1

<u>C'</u>	<u>克/升</u>
结晶葡萄糖	10
大豆粉	10
玉米发酵物	5
玉米淀粉	10
氯化钠	5
氯化钴	0.002
碳酸钙	1
	pH7.0—7.2

2. 4,5-二氢格尔德霉素的发酵和分离

使用一个振荡器烧瓶以接种含有 3 升下列之一培养基的体积为 5 升的发酵容器,

<u>HERB-F</u>	<u>克/升</u>
---------------	------------

结晶葡萄糖	25
硫酸铵	5
大豆粉	10
酵母菌浸出液	2.5
氯化钾	4
肉浸出液	1
氯化钴	0.002
碳酸钙	3
	pH7.1—7.3

HERB-F2 克/升

结晶葡萄糖	10
玉米淀粉	40
棉籽粉	4
氯化钴	0.002
碳酸钙	6
酿酒酵母菌	2
氯化钠	2
硫酸镁·7H ₂ O	0.5
硝酸铵	2
	pH6.9—7.2

MACB-M 克/升

甘油	10
酵母菌浸出液	10
硝酸钠	2
氯化钴	0.002
硫酸镁·7H ₂ O	0.50
磷酸氢二钾	1

氯化钾	0.5
硫酸亚铁	0.01
	pH6.9—7.2

向每个容器中加入 1ml P2000(硅) 作为消泡剂, 容器封口, 120℃和 15p. s. i 灭菌 1 小时。随后, 发酵罐用一(大约 3%接种物) 烧瓶接种, 于 28℃发酵 72—120 小时, 搅拌速率为 1700 转/分, 空气比率为每液体体积每分钟 1 体积空气。

随后利用枯草芽胞杆菌 ATCC 6633 或金黄色葡萄球菌 ATCC 6538P 的敏感株可以测定肉汤及其之后的回收液的生物活性。肉汤和回收液中的成分可通过使用硅胶板在下述体系: 纯乙酸乙酯中显示。向显示过的平板喷洒香草醛试剂(3g 香草醛溶于 75ml 乙醇, 并以 85% 磷酸稀释至 100ml), 加热至 80℃。抗菌剂显示深蓝/紫色。显示过的薄层层析板也可通过具有 254 μ m 光源的黑盒显示。发酵完成后使发酵剂停止工作。在肉汤 pH 下, 用 1/3 体积量的甲基异丁基酮提取全部肉汤, Delaval 分离器分离, 溶液相在真空下浓缩成油状物。利用己烷/乙腈 10:1 对油状物进行 3 管对流。分离含有 4,5-二氢格尔德霉素及其氢醌下层(CH₃CN), 合并, 真空下浓缩。剩余物再溶于二氯甲烷, Darco G60(活性炭) 处理, 过滤, 浓缩。将浓缩物加入浸泡于二氯甲烷中的 Waters Prep500 硅胶柱, 用从纯二氯甲烷到纯乙酸乙酯的浓度梯度洗脱。将富含 4,5-二氢格尔德霉素在 9:1CHCl₃/丙酮中 R_f=2.5—3 的馏分合并, 并重复层析方法直到分离得到纯 4,5-二氢格尔德霉素。将 4,5-二氢格尔德霉素在热异丙基醚中结晶, 真空烘箱中 50℃干燥过夜。m. p. 221—222℃。

富含结构式 I 的氢醌, 在 9:1CHCl₃/丙酮中 R_f=1—1.5 的馏分合并后, 重复层析方法直到分离得到纯氢醌。

实施例 2

4,5-二氢格尔德霉素氢醌的化学合成

将 10g 亚硫酸氢钠溶于 100ml 水，再用 100ml 乙酸乙酯混合使反应开始，然后，将 200mg 4,5-二氢格尔德霉素加入到上述溶液中。利用 Analtech 硅胶柱和纯乙酸乙酯体系的薄层层析法进行反应。在紫外灯(254 μm)下，经香草醛显影后观察反应。20 分钟后该反应几乎完成。

水层用乙酸乙酯提取二次。随后，溶剂层再用 pH7.0 磷酸盐缓冲液回提取。溶剂用无水 Na_2SO_4 干燥，并浓缩成胶状物。

剩余物在异丙基醚(IPE)中被吸收，加热至沸，随后搅拌 3 小时。过滤异丙基醚溶液，过滤器上干燥固体。干燥后的 4,5-二氢格尔德霉素于 50 $^{\circ}\text{C}$ 真空下保存。