[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12P 1/04
A61P 31/04
//(C12P1/04,C12R1:465)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02823720.X

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1596312A

[22] 申请日 2002.10.4 [21] 申请号 02823720.X
[30] 优先权
[32] 2001.11.28 [33] EP [31] 01128204.3
[86] 国际申请 PCT/EP2002/011113 2002.10.4
[87] 国际公布 WO2003/046192 英 2003.6.5
[85] 进入国家阶段日期 2004.5.28
[71] 申请人 维库罗恩医药品公司
地址 美国宾夕法尼亚
[72] 发明人 E·塞尔瓦 F·马里内利
D·洛西 L·卡瓦莱蒂
A·拉扎里尼 A·马拉齐
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 6 页 说明书 23 页 附图 11 页

[54] 发明名称 抗生素 GE81112 因子 A、B、B1、药物可接受的盐和组合物、及其用途

[57] 摘要

本发明涉及链霉菌属(Streptomyces sp.)DSMZ 14386 发酵产生的随意命名为抗生素 GE 81112 因子 A、因子 B1 和因子 B 的微生物来源的抗生素物质、其药物可接受的盐和组合物及其作为具有对抗敏感微生物的抑制活性的抗菌剂的用途。

ISSN1008-4274

1. 具有下列特征的抗生素 GE 81112 因子 A:

A) 在Thermofinnigan LCQ deca仪器的下列电喷雾条件下: 喷雾电压: 4.7 kV; 毛细管温度: 250°C; 毛细管电压: 9V; 注入模式 5μl/分钟, 处于50:50 乙腈:水中的0.01 mg/ml溶液记录的质谱在644 m/z产生单质子化离子,

B) IFS-48傅立叶变换分光光度计以石蜡糊记录的红外光谱(图2)显示下列主带(cm^{-1}):

3356; 2956; 2855; 2256; 2128; 1663; 1596; 1455; 1378; 1345; 1123; 1050; 1026; 1002; 825; 764,

C) 在DMSO-d_6和三氟乙酸(滴剂)中于600 MHz、25°C 记录的 ^{1}H-NMR光谱(图3)显示下列^{1}H信号:

化学位移(ppm)	多重性	化学位移(ppm)	多重性
1.52	br d	4.70	m
1.57-1.67	m	5.06	d
1.81	br d	6.46	br
1.88	m	6.94	s
2.87	dd	7.29	s
2.90	m	7.99	d
3.12	dd	8.17	d
3.15	m	8.30	m
3.65	m	8.57	br d
3.83	m	8.95	d
3.94	br d	9.06	br d
4.40	br s	14.09	br
4.46	m	14.27	br
4.50	dd	--	--

D) 在DMSO-d_6和三氟乙酸(滴剂)中于150 MHz、5°C记录的

^{13}C-NMR光谱(图4)显示下列^{13}C信号

化学位移(ppm)	多重性	化学位移(ppm)	多重性
15.9	t	67.76	t
27.19	t	116.83	d
28.41	t	118.49	d
35.31	t	128.41	s
42.86	t	129.03	s
50.13	d	133.65	d
51.30	d	139.66	s
56.86	d	156.73	s
59.71	d	167.39	s
64.07	d	170.16	s
65.11	d	171.29	s
66.88	d	171.65	s

E) 使用配有"Altima" RP18、5 μm、250x4.6 mm 内径柱的分析型 HPLC Shimadzu LC10-AS; 利用 40 mM 甲酸铵缓冲液，加入甲酸到 pH 4.5，以 1 ml/分钟的流速进行无梯度洗脱; 230 nm 处紫外检测测定保留时间为 14.1 分钟。

2. 具有下列特征的抗生素 GE 81112 因子 B:

A) 在Thermofinnigan LCQ deca仪器的下列电喷雾条件下: 喷雾电压: 4.7 kV; 毛细管温度: 250°C; 毛细管电压: 9V; 注入模式 5μl/分钟，处于50:50 乙腈:水中的0.01 mg/ml溶液记录的质谱在659 m/z产生单质子化离子，

B) IFS-48傅立叶变换分光光度计以KBr记录的红外光谱(图6)显示下列主带(cm^{-1}):

3359; 2958; 2852; 2258; 2129; 1681; 1591: 1450; 1385; 1347; 1122; 1072; 1025; 998; 765，

C) 在DMSO-d_6和三氟乙酸(滴剂)中于600 MHz、25°C记录的^{1}H-NMR光谱(图7)显示下列^{1}H信号:

化学位移(ppm)	多重性	化学位移(ppm)	多重性
1.52	br d	4.60	m
1.57-1.72	m	5.05	d
1.83	br d	6.46	br
1.90	m	6.48	s
2.63	dd	6.93	s
2.88	dd	7.40	br s
2.92	m	7.84	d
3.13	br d	8.05	d
3.64	m	8.33	m
3.83	m	8.54	d
3.95	br d	9.00	br d
4.35	br s	11.72	br s
4.46	m	11.75	br s
4.50	dd	--	--

D) 在 DMSO-d_6和三氟乙酸(滴剂)中于 150 MHz、25°C 记录的 ^{13}C-NMR 光谱(图 8)显示下列 ^{13}C 信号

^{13}C 化学位移(ppm)	多重性	^{13}C 化学位移(ppm)	多重性
15.9	t	67.77	t
27.36	t	110.3	d
28.40	t	117.85	d
35.47	t	122.5	s
42.87	t	128.4	s
50.1	d	139.66	s
51.20	d	146.7	s
56.78	d	156.7	s
59.73	d	167.4	s
64.09	d	170.5	s
65.14	d	171.3	s
66.90	d	171.38	s

E) 使用配有"Altima" RP18、5 μm、250x4.6 mm 内径柱的分析型 HPLC Shimadzu LC10-AS; 利用 40 mM 甲酸铵缓冲液，加入甲酸到 pH 4.5，以 1 ml/分钟的流速进行无梯度洗脱; 230 nm 处紫外检测测定保留时间为 21.6 分钟。

3. 具有下列特征的抗生素 GE 81112 因子 B1:

A) 在Thermofinnigan LCQ deca仪器的下列电喷雾条件下: 喷雾电压: 47 kV; 毛细管温度: 250°C; 毛细管电压: 9V; 注入模式 5 l/分钟，处于50:50 乙腈:水中的0.01 mg/ml溶液记录的质谱在658 m/z产生单质子化离子，

B) 在DMSO-d_6中于600 MHz、25°C 记录的H-NMR光谱(图10)显示下列^{1}H信号:

化学位移(ppm)	多重性	化学位移(ppm)	多重性
1.38	br d	4.40	br m
1.56-1.64	m	4.46	m
1.76	m	5.05	d
2.70	m	5.60	br s
2.82	br s	6.21	br
2.92	m	6.52	br
3.01-3.06	m	6.78	br s
3.49	br m	7.13	br
3.57	br s	7.80	br d
4.20	br dd	7.90	br d
4.26	br	8.44	br

C) 在DMSO-d_6中于150 MHz、25° 记录的^{13}C-NMR光谱(图11)显示下列^{13}C信号:

化学位移(ppm)	多重性	化学位移(ppm)	多重性
17.95	t	66.88	d
27.97	t	111.07	d
29.8	t	118.97	d
36.54	t	122.47	s
43.75	t	127.88	s
45.65	d	148.08	s
50.52	d	159.18	s
51.9	d	169.44	s
57.75	d	171.53	s
61.0	d	171.81	s
64.03	d	173.08	s
66.7	d	--	--

D) 使用配有"Altima" RP18、5 μm、250x4.6 mm内径柱的分析型HPLC Shimadzu LC10-AS；利用40 mM甲酸铵缓冲液，加入甲酸到pH 4.5，以1 ml/分钟的流速进行无梯度洗脱；230 nm处紫外检测测定保留时间为18.4分钟。

4. 产生权利要求 1-3 中任一项的 GE 81112 抗生素的方法，其包含:

-在包含可同化的碳、氮源及无机盐的液体营养培养基中，于需氧条件下培养链霉菌属DSMZ 14386或其保持产生GE 81112抗生素遗传能力的变体或突变体;

-从发酵液中回收得到的抗生素混合物;

-纯化所回收的抗生素混合物，并分离三种抗生素GE 81112因子A、B和 B1。

5. 两种或多种权利要求1-3 的抗生素GE 81112因子任意比例混合物及其药物可接受的盐。

6. 权利要求5的任意比例抗生素GE 81112因子的混合物，所述抗生素GE 81112因子的混合物分离自链霉菌属DSMZ 14386或其保持

产生所述GE 81112抗生素遗传能力、可产生GE 81112抗生素的变体或突变体的发酵液。

7. 产生权利要求6中抗生素GE 81112混合物的方法，其包含:

–培养链霉菌属DSMZ 14386或其保持产生所述GE 81112抗生素遗传能力的变体或突变体;

–从培养液中回收得到的抗生素GE 81112因子混合物；以及

–纯化所述抗生素GE 81112因子。

8. 权利要求4和7中任一项的方法，其中预先培养链霉菌属DSMZ 14386或其保持产生GE 81112抗生素遗传能力的变体或突变体。

9. 权利要求4和7中任一项的方法，其中利用离子交换树脂回收，利用吸附基质纯化，优选聚苯乙烯或混合的聚苯乙烯-二乙烯苯树脂。

10. 权利要求4的方法，其中利用层析技术分离抗生素GE 81112因子A、B和B1。

11. 权利要求10的方法，其中层析技术是制备型HPLC技术。

12. 包含权利要求1-3和5中任一项的抗生素的药物组合物。

13. 包含药物可接受载体的权利要求12的药物组合物。

14. 权利要求1-3和5中任一项的抗生素在制备供治疗细菌性感染的药物中的用途。

抗生素 GE 81112 因子 A、B、B1、药物可接受的盐和组合物、及其用途

本发明涉及随意命名为抗生素GE 81112因子A、GE 81112因子B和GE 81112因子B1的微生物来源的抗生素物质、所述因子任意比例的混合物、其药物可接受的盐和组合物及其作为抗菌剂的用途。

本发明另一目的在于制备GE 81112因子A、GE 81112因子B和GE 81112因子B1、所述因子任意比例的混合物(此处称为GE 81112化合物或GE 81112抗生素)的方法。

菌株及发酵

链霉菌属(Streptomyces. sp.)DSMZ 14386最初命名为内部编号GE 81112，分离自土壤样品，于07/16/2001按布达佩斯条约规定保藏于 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany)。该菌株登录号为DSMZ 14386。

通过培养能够产生GE 81112化合物的链霉菌属菌株，即链霉菌属DSMZ 14386、或保持产生所述GE 81112化合物遗传能力的其变体或突变体；从培养液中分离得到的抗生素；纯化所分离的抗生素；并利用层析方法分离抗生素三因子A、B和B1或其混合物，可产生GE 81112化合物。在任何情况下，优选在包含可同化的碳源、氮源和无机盐的液体营养培养基中、于需氧条件下产生化合物GE 81112，利用层析技术纯化所得化合物。可以使用通常用于发酵领域的多种营养培养基，但优选某些培养基。

优选的碳源为葡萄糖、木糖、淀粉、果糖、甘油等。优选的氮源为大豆粉、蛋白胨、肉膏、酵母提取物、胰蛋白胨、氨基酸、水解酪蛋白等。可以掺入培养基中的无机盐有能够产生钠、钾、铁、锌、钴、镁、钙、铵、氯、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐等离子的常用可

溶性盐。

优选将产生GE 81112化合物的菌株在发酵管或摇瓶中预培养，然后使用该培养物接种发酵罐，用于产生大量物质。用于预培养的培养基可以与较大量发酵所用培养基相同，但也可使用其它培养基。产生GE 81112化合物的菌株可以在20 - 40°C、优选22 - 37°C生长。温度高于44 °C未见生长。

发酵期间可以通过敏感微生物的生物分析和/或HPLC分析监控GE 81112因子。一般发酵约20 - 80小时产生最多GE 81112化合物。

通过培养链霉菌属DSMZ 14386、或产生化合物GE 81112的其变体或突变体，产生并在培养液中发现化合物GE 81112。

链霉菌属 DSMZ 14386 的形态学特征

链霉菌属 DSMZ 14386 在很多标准固体培养基中生长良好。使用生长于十分之一强度腐殖酸培养基的培养物测定显微镜检及细胞大小(H. Nonomura, 1984 - Design of a new medium for isolation of soil actinomycetes. The Actinomycetes 18, 206-209)。

液体培养(V6培养基，组成见实施例1)中28°C生长2天后未见菌丝体断裂。

HV/2琼脂28°C培养15天后，显微镜检未显示断裂及大量分枝的营养菌丝体。气生菌丝体也未大量分枝。产生的气生菌丝串联10以上(多数>20)孢子；它们排列简单，而非3 – 5个环的紧密螺旋形。孢子形状由圆形 (平均直径约0.9 μm)到卵园形或圆柱形(0.8 - 0.9及1.1 - 1.3 μm)变化。

链霉菌属DSMZ 14386的培养特征

链霉菌属DSMZ 14386在V6液体培养基 中(培养基组成见实施例1)生长2天。离心收获菌丝体，利用无菌盐溶液洗涤3次，然后稀释，以提供合适的接种物。以交叉划线方式将等份悬浮液划线于Shirling和Gottlieb推荐的各种培养基(E.B. Shirling和D. Gottlieb, 1966 - Method for Characterization of Streptomyces species -, Int. J. Syst. Bacteriol., 16, 313-340)以及Waksman推荐的几种培养基(Waksman

S.A., 1961 - The Actinomycetes - The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol 2, pp 328-334)。

在包含1% (w/v)终浓度碳源的ISP8培养基(Shirling和Gottlieb, 同前)中测定使用各种糖类作为碳源和能源的能力。在ISP2培养基中测定NaCl耐受以及在不同温度生长的能力。所有培养基在28°C培养21天; 除非特别说明, 描述是指14天。使用Maerz和Paul的Colour Atlas(A. Maerz 和 M.R. Paul, 1950 - A Dictionary of Colour, 第二版. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York)在自然日光下评价色彩。使用Bacto-Nitrite测试条(Difco), 按厂家建议方法, 在硝酸盐肉汤(ISP8培养基)中于需氧条件下28°C培养过夜, 评价还原硝酸盐为亚硝酸盐的能力。

表I记录了菌株链霉菌属DSMZ 14386的生长、菌落外观、底物和气生菌丝体颜色以及色素生成。除唯一具有无机氮源的G1琼脂外, 在所有培养基存在生长。所用任何培养基均未显示特征性成色。菌株的生理学特征如表II所示。链霉菌属DSMZ 14386显示在高达7% (w/v) NaCl中生长的能力; 该菌株在1% (w/v)及较高NaCl浓度中未分化气生菌丝体。生长7天后, 可较弱检测到明胶液化及乳脉化作用。利用各种糖类生长的能力如表III所示。在不加任何碳源的基本培养基中, 观察到营养及气生菌丝体生长不足。除葡萄糖外, 在使用的所有碳源中均产生白色气生菌丝体。

表I: 链霉菌属DSMZ 14386的生长特征

培养基	生长&形态	反向颜色代码
ISP 2 酵母提取物-麦芽提取物琼脂	丰富生长、盘旋、划线末端几乎变硬; 橙/棕色; 生长缘变色。白色气生菌丝体丛。无可溶性色素生成。浓臭味。	12 L 9
ISP 3 燕麦琼脂	丰富生长、表面光滑; 奶油色-微黄色。仅在近生长缘有白色气生菌丝体薄层。无可溶性色素生成。	11 H 3
ISP 4	丰富生长、盘旋、划线末端几乎变硬; 微黄	10 F 3

无机盐–淀粉琼脂	色。存在白色气生菌丝体、毛状。无可溶性色素生成。浓臭味。	
ISP 5 甘油-天冬酰胺琼脂	离散至良好生长；无色至浅黄色；毛状变色缘。存在薄的白色气生菌丝体，随老化变微粉色(10A2)。无可溶性色素生成。	10 G 2
ISP 6 蛋白胨-酵母提取物-铁琼脂	离散生长、划线接近末端变皱；菌落直径小；划线区扩散小；粘性；浅棕色。不产生气生菌丝体。培养基轻微变黑。	11 J 3
ISP 7 酪氨酸琼脂	丰富生长、盘旋、划线几乎末端变硬；棕色；毛状变色缘。充分产生白色气生菌丝体、粉状。生成棕色可溶性色素。淡臭味。	14 L 9
SYE 淀粉-酵母提取物琼脂	丰富生长、盘旋、划线几乎末端变硬；黄/棕色；宽、毛状变色缘。生成不足的白色、稀疏气生菌丝体。无可溶性色素生成。淡臭味。	10 L 7
CZ-GLU Czapeck-葡萄糖琼脂	离散至良好生长、划线末端几乎变硬；菌落直径小；奶油色-浅棕色；毛状缘。生成不足的白色、稀疏气生菌丝体。无可溶性色素生成。淡臭味。	12 H 6
GAUZE 1 琼脂	无生长。	-
GAUZE 2 琼脂	生长良好、划线几乎末端稀疏微皱、变硬，划线交叉处平坦；微黄色/棕色。平坦区域存在不足的稀疏、白色气生菌丝体。培养基轻微变黑。	11 L 6
NA 营养物琼脂	离散至良好生长、光滑；奶油色/微黄色。不产生气生菌丝体。无可溶性色素生成。	11 L 2
SE 土壤提取物琼脂	几乎不可见营养菌丝体；无色；划线区扩散小。不产生气生菌丝体。无可溶性色素生成。	ND
HV/2 腐殖酸-维生素琼脂	营养菌丝体生长良好、深入琼脂中；深棕色；毛状缘。存在白色气生菌丝体、粉状。	ND

表 II: 链霉菌属 DSMZ 14386 的生理学特征

测试	反应
淀粉水解	阳性
酪蛋白水解	阴性
苹果酸钙消化	阳性
石蕊乳胨化	阳性(弱)
石蕊乳凝聚	阴性
明胶液化	阳性(弱)
酪氨酸反应	阳性
H2S 生成(4 天): 在 ISP6 中 +醋酸铅条	阴性 弱阳性
硝酸盐还原	阴性
NaCl 耐受	≤7 %

表 III: 链霉菌属 DSMZ 14386 的碳源利用

碳源	营养菌丝体生长	气生菌丝体生长
阿拉伯糖	+	+/-
果糖	++	++
肌醇	+	+/-
甘露醇	++	+
棉子糖	++	++
鼠李糖	++	++
蔗糖	-	+/-
木糖	++	++
葡萄糖	++	-

++ 良好生长; + 适度生长; - 不足/无生长;

链霉菌属 DSMZ 14386 的化学分类学特征

链霉菌属 DSMZ 14386 在 Sauton's 培养基中生长 4 周，然后收集培养基，用无菌去离子水洗涤 3 次，然后冷冻干燥。按照 Staneck 和

Roberts 方法(J.L. Staneck 和 G.D. Roberts, Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography, Appl. Microbiol. 28, 226-231, 1974)测定二氨基庚二酸(DAP)的立体异构形式。

为提取脂肪酸，使用细微改变的 Miller (L.T. Miller, A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids, J. Clin. Microbiol. 16, 584-586, 1982)方法(L.D. Kuykendall, M.A. Roy, J.J. O'Neill and T.E. Devine, Fatty acid, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of Bradyrhizobium japonicium, Int. J. System. Bact. 38, 351-361, 1988)提取湿的生物质。如 R.M. Kroppenstedt 所述(R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt 和 M. Goodfellow, Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora,* System. Appl. Microbiol. 13, 148-160, 1990)进行分析，使用微生物鉴定系统(L.T. Miller, 同前)检查数据。

链霉菌属 DSMZ 14386 菌株的肽聚糖中包含 LL-二氨基庚二酸。缺少分枝菌酸。存在异-及反异-分枝型脂肪酸，而未检测到羟脂肪酸或 10-甲基分枝脂肪酸，即 2c 型链霉菌型脂肪酸。

链霉菌属 DSMZ 14386 菌株的鉴定

因下列形态学及化学特征而将产生化合物 GE 81112 的菌株定为链霉菌属:

- 形成分枝而不断裂的营养菌丝体。产生的气生菌丝串联 10 个以上(多数> 20)节孢子;

- 细胞壁中存在 LL-二氨基庚二酸，根据 Kroppenstedt 脂肪酸为 2c 型特征 (R.M. Kroppenstedt, Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms, pp.173-199, in: Chemical Methods in bacterial Systematics , M. Goodfellow 和 D.E. Minnikin eds; London, Accademic Press, 1985)。

至于其它微生物，产生 GE 81112 化合物的菌株的特征可能变化。

例如，利用各种已知的突变剂例如 UV 线、化学剂例如亚硝酸、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍等进行处理，可以获得菌株的人工变体和突变体。为本发明目的，认为链霉菌属 DSMZ 14386 所有保持产生 GE 81112 化合物遗传能力的天然及人工变体和突变体与其等效，因而属于本发明范围之内。

可能从发酵液的上清部分回收抗生素。

GE 81112 化合物的提取和纯化

根据素来已知的技术，例如在辅助剂存在下用溶剂提取、加入非溶剂、盐或改变溶液 pH 而沉淀、分配层析、反相分配层析、离子交换层析、分子排阻层析等，从生产微生物的发酵液中回收 GE 81112 化合物。

从发酵液中回收本发明抗生素物质的方法包括利用离子交换层析提取 GE 81112 混合物。按照该方法，将过滤的发酵液与离子交换树脂接触。利用 pH 或离子强度变化进行洗脱。可方便用于回收本发明化合物的离子交换树脂的例子有阴离子和阳离子交换树脂，即包含例如合成聚合物(例如聚苯乙烯、丙烯酸聚合物)或天然聚合物(例如纤维素、琼脂糖聚合物、硅石)基质通过引入酸(例如 COOH、$-SO_3H$)或碱(例如$-N(CH_3)_2$、$-N^+(CH_3)_3$)功能而衍生化的树脂。

上述树脂的例子有：Dowex 50W 树脂(Dow Chemical Co.)、Amberlite IR-200 和 IR-120 (Rohm & Haas)、PL-SCX 1000 和 APL-SCX 4000 A (Polymer Laboratories)、Isolute SCX IST (international sorbent technology)、SP Sepharose fast flow 和 SP Sephadex G25 (Pharmacia Biotech)。

另一回收抗生素物质的方法包括吸附于合适的基质，然后利用极性水混溶性溶剂或其混合物洗脱，减压下浓缩到残留的水中，利用已如上所述类型的沉淀剂进行沉淀。可以调整 pH 为合适的值。可方便用于回收本发明化合物的吸附基质的例子有，活性炭(例如 Darco G60、Norit CG1)、聚苯乙烯或混合的聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂(例如 Diaion HP 20, Mitsubishi Chemicals, M112 或 S112, Dow Chemical Co.;

Amberlite XAD2 或 XAD4, Rohm & Haas)、丙烯酸类树脂(例如 XAD7 或 XAD8, Rohm & Haas)、苯酚吸附剂(例如 Duolite XAD761, Rohm & Haas)、聚酰胺树脂例如聚已内酰胺、尼龙以及交联聚乙烯吡咯酮(例如 Polyamide-CC 6、Polyamide-SC 6、Polyamide-CC 6.6、Polyamide-CC 6AC 和 Polyamide-SC 6AC, Macherey-Nagel & Co., west Germany; PA 400, M.Woelm AG, West Germany PVP-CL, Aldrich Chemie GmbH & Co., KG, West Germany)、受控孔径交联葡聚糖(例如 Sephadex LH-20, Pharmacia Fine Chemicals, AB)。常用活性炭和/或聚苯乙烯树脂，特别优选树脂 Diaion HP 20 (Mitsubishi Chemicals)。

对上述类型吸附基质的吸附，也可用作纯化从发酵液中回收(例如通过离子(例如阳离子)交换层析)的粗产物的方法。

从吸附基质上洗脱 GE 81112 化合物的优选溶剂取决于特定的静止相。就活性炭而言，通过将一般包含水混溶性溶剂(例如低级酮(如丙酮)或低级醇(如甲醇))的洗脱缓冲液改变为酸性 pH 而进行洗脱。从而将含水混合物调整到合适的 pH 值。就聚苯乙烯树脂、聚苯乙烯-二乙烯苯树脂、丙烯酸树脂或聚酰胺树脂而言，优选的洗脱剂是水混溶性溶剂或其含水混合物，例如水和(C_1-C_3)链烷醇的混合物。

本申请所用术语"水混溶性溶剂"，除非另外定义，意味着具有本领域当前指定的含义，是指在适于预期用途的适当浓度范围内，可于使用条件下与水混溶的溶剂。可用于洗脱本发明化合物的水混溶性有机溶剂的例子有：低级链烷醇，例如(C_1-C_3)链烷醇，如甲醇、乙醇和丙醇；苯基(C_1-C_3)链烷醇，例如苯甲醇；低级酮，例如(C_3-C_4)酮，如丙酮和乙基甲基酮；环醚，例如二氧杂环己烷和四氢呋喃；乙二醇及其部分醚化的产物，例如乙烯乙二醇、丙烯乙二醇和乙烯乙二醇单甲醚，低级酰胺，例如二甲基甲酰胺和二乙基甲酰胺；乙酸、二甲基亚砜和乙腈。

从发酵液中回收 GE 81112 化合物的另一方法是利用水不混溶性有机溶剂，通过调整合适 pH 值、和/或加盐、和/或加入合适有机盐，

与可溶于提取溶剂中的抗生素形成离子对，来提取 GE 81112 化合物或其盐。然后例如通过加入沉淀剂，从浓缩提取物中沉淀抗生素。

本申请所用术语"水不混溶性溶剂"，意味着具有本领域当前指定的含义，是指在使用条件下与水轻微混溶或几乎不混溶的溶剂。可用于从发酵液中提取本发明化合物的水不混溶性有机溶剂的例子有：至少 4 个碳原子的链烷醇，可能是线性、分枝或环形，例如 n-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-l-丁醇、4-甲基-1-戊醇、3-甲基-l-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-l-己醇、2-乙基-l-己醇、2-甲基-3-己醇、1-辛醇、2-辛醇、环戊醇、2-环戊乙醇、3-环戊基-l-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-辛甲醇、6-甲基-5-庚-2-醇、1-壬醇、2-壬醇、1-癸醇、2-癸醇和 3-癸醇；至少 5 个碳原子的酮，例如甲基异丙酮、甲基异丁酮、甲基-n-二戊基酮、甲基异二戊基酮及其混合物。

通过在合适 pH 下加入酸，例如 p-甲苯磺酸、戊-、esan-、eptan-磺酸等代表的磺酸、或 esanoic、eptanoic、安息香酸等代表的羧酸，获得与 GE 81112 化合物的合适离子对的例子。或者，通过在合适 pH 下加入阳离子，例如三乙基铵、四丁基铵等，产生离子对。

利用任何素来已知的技术纯化粗的 GE 81112 化合物，但优选利用层析方法进行。方便地，也可利用所谓的空间排阻层析技术得到好结果。特别而言，在该技术中有效利用其大多数羟基被烷基化的受控孔径交联葡聚糖，例如 Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, AB)。

例如，可能利用中压液相层析分离系统，使用 RP-8 或 RP-18 功能性硅胶的反相层析，并利用甲酸铵溶液洗脱。根据发酵及纯化条件，从发酵液中分离的粗产物和纯化的产物通常包含不同比例的单一 GE 81112 因子 A、B1 和 B。

利用包含 GE 81112 化合物制剂的半制备型 HPLC，可方便进行各个因子 A、B 和 B1 的分离和纯化。

在装有 Hibar Lichrosorb (Merck) 25 x 250 mm 柱 RP8 (7 μm 粒径)的半制备性 HPLC 仪器(Shimadzu-LC8A)上，利用由甲酸调到 pH4.5 的 40 mM 甲酸铵、按 35 ml/分钟的流速洗脱，进行优选的用于分离纯 GE 81112 因子 A、B1 和 B 的制备型 HPLC 技术。将包含分离的 GE81112 因子的重复层析操作的洗脱物按其含量混合，减压浓缩到含水溶液中，冻干得到纯化的 GE 81112 因子 A、B1 和 B。

按本领域惯例，可能通过各种分析方法、包括利用敏感微生物的生物分析和/或 HPLC 方法，监测生产、回收及纯化步骤。在装有填充 Symmetry (Waters)或 Altima (Alltech) 5 μm 粒径 C18 固定相的 250 x 4.6 mm 柱的 Shimadzu LC10 仪器上，利用由甲酸调到 pH4.5 的 40 mM 甲酸铵、按 1 ml/分钟的流速洗脱，进行优选的分析型 HPLC 技术。在 230 nm 处检测。在这些条件下，因子 A、B1 和 B 一般分别显示 13、18、21 分钟的保留时间。

本发明的抗生素物质具有酸和碱的功能，因此在合适 pH 值下也能以内盐或两性离子的形式存在。此外，其可以按照常规方法成盐。代表性的合适的本发明化合物的酸加成盐包括利用与有机和无机酸的标准反应形成的盐，例如盐酸、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、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、棕榈酸、胆酸、双羟萘酸(pamoic)、粘液酸、谷氨酸、樟脑酸、戊二酸、乙二醇酸、邻苯二甲酸、酒石酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸、肉桂酸等。

可以形成 GE 81112 化合物加成盐的碱的代表性实例有：碱金属或碱土金属氢氧化物，例如氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化钙；氨水和有机脂肪族、脂环族或芳香族胺，例如甲胺、二甲胺、三甲胺和甲基吡啶。

将本发明的游离或两性离子化合物转化为相应的盐，以及反之，即将本发明化合物的盐转化为两性离子或游离化合物形式，属于普通技术性技能，并包括于本发明之内。

例如，通过将非加成盐形式溶解于含水溶液中，并加入稍摩尔过

量的选定的酸或碱，可以将本发明化合物转化为相应的酸或碱加成盐。然后冻干所得溶液或悬浮液，回收所需的盐。

若最终的盐形式不溶于溶剂，而非盐形式可溶，则从溶液中过滤回收。

可以从溶于含水溶剂中的相应的酸或碱盐制备非盐形式，然后中和为游离的非盐形式。

若中和之后需要脱盐，则可利用常用的脱盐方法。例如，可方便使用硅烷化硅胶、非功能性聚苯乙烯、聚丙烯及受控孔径葡聚糖树脂(例如 Sephadex LH 20)或活性碳的柱层析。利用含水溶液洗脱不需要的盐以后，通过水和极性或非极性有机溶剂的混合物(例如 50:50 至约 100%乙腈的乙腈/水)的线性梯度或步骤梯度，洗脱所需产物。

如本领域已知，利用与药物可接受的酸(或碱)或非药物可接受的酸(或碱)形成加成盐，作为方便的纯化技术。形成并分离以后，加成盐形式的 GE 81112 化合物可以转化为相应的游离-两性离子或不同的药物可接受的加成盐。

GE 81112 因子 A 的物理化学特征

A) 质谱

在装有电喷雾源的 Thermofinnigan LCQ deca 仪器上，使用 Thermofinnigan 校准混合物进行 MS 实验，GE 81112 因子 A 在 m/z = 644 处产生单质子化离子(monoprotonated ion)。电喷雾条件是：喷雾电压：4.7 kV；毛细管温度：250°C；毛细管电压：9V；注入模式 5μl/分钟。记录处于 50:50 (v/v)乙腈:水中的 0.01 mg/ml 溶液的光谱。

图 1 显示利用 25%标准化碰撞能，在 m/z = 644 处单质子化离子断裂后，GE 81112 因子 A 典型的 MS-MS 谱。在装有电喷雾源的 Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla 光谱仪的实验中，GE 81112 因子 A 在 m/z = 644.2186 处产生精确的单质子化离子质量。FTMS 条件是：电喷雾：分析源、轴外喷雾(off Axis Spray), 60 μl/小时；干气 200° C；毛细管电压：70 V；分离器电压：10 V；累积：40 次扫描；宽谱带模式：分辨率 20'000。

B) 红外光谱

GE 81112 因子 A 的红外光谱如图 2 所示。利用 IFS-48 傅立叶变换分光光度计以石蜡糊(nujol mull)记录光谱。

观察到下列吸收主带(cm^{-1}): 3356; 2956; 2855; 2256; 2128; 1663; 1596; 1455; 1378; 1345; 1123; 1050; 1026; 1002; 825; 764。

C) ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR

加入三氟乙酸(TFA)后，于 25°C DMSO-d_6 中记录 GE 81112 因子 A 的 600 MHz ^{1}H-NMR 光谱(图 3)和 150 MHz ^{13}C-NMR 光谱(图 4)。在两种光谱中检测到来自纯化过程的甲酸盐信号(^{1}H 化学位移 8.13 和 7.07-7.25 ppm; ^{13}C 化学位移 163.0 ppm)。

表 IV 和表 V 报告了观察到的因子 A ^{1}H 和 ^{13}C NMR 信号。

表 IV: GE 81112 (因子 A)在 DMSO-d_6 + TFA 中的 ^{1}H-NMR 共振

^{1}H 化学位移(ppm)	多重性(multiplicity)	^{1}H 化学位移(ppm)	多重性
1.52	br d	4.70	m
1.57-1.67	m	5.06	d
1.81	br d	6.46	br
1.88	m	6.94	s
2.87	dd	7.29	s
2.90	m	7.99	d
3.12	dd	8.17	d
3.15	m	8.30	m
3.65	m	8.57	br d
3.83	m	8.95	d
3.94	br d	9.06	br d
4.40	br s	14.09	br
4.46	m	14.27	br
4.50	dd	--	--

表 V: GE 81112 因子 A 在 DMSO-d_6 + TFA 中的 ^{13}C-NMR 共振

^{13}C 化学位移(ppm)	多重性	^{13}C 化学位移(ppm)	多重性
15.9	t	67.76	t
27.19	t	116.83	d
28.41	t	118.49	d
35.31	t	128.41	s
42.86	t	129.03	s
50.13	d	133.65	d
51.30	d	139.66	s
56.86	d	156.73	s
59.71	d	167.39	s
64.07	d	170.16	s
65.11	d	171.29	s
66.88	d	171.65	s

GE 81112 因子 B 的物理化学特征

A) 质谱

在装有电喷雾源的 Thermofinnigan LCQ deca 仪器上，使用 Thermofinnigan 校准混合物进行 MS 实验，GE 81112 因子 B 在 m/z = 659 处产生单质子化离子。电喷雾条件是：喷雾电压：4.7 kV；毛细管温度：250°；毛细管电压：9V；注入模式 5μl/分钟。记录处于 50:50 (v/v) 乙腈:水中的 0.01 mg/ml 溶液的光谱。

图 5 显示利用 28%标准化碰撞能，在 m/z = 659 处单质子化离子断裂后，GE 81112 因子 B 典型的 MS-MS 谱。在装有电喷雾源的 Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla 光谱仪的实验中，GE 81112 因子 B 在 m/z = 659.2295 处产生精确的单质子化离子质量。FTMS 条件是：电喷雾：分析源、轴外喷雾，60 μl/小时；干气 200° C；毛细管电压：70 V；分离器电压：10 V；累积：40 次扫描；宽谱带模式：分辨率 20'000。

B) 红外光谱

GE 81112 因子 B 的红外光谱如图 6 所示。利用 IFS-48 傅立叶变换分光光度计以 KBr 记录光谱。

观察到下列吸收主带(cm^{-1}): 3359; 2958; 2852; 2258; 2129; 1681; 1591: 1450; 1385; 1347; 1122; 1072; 1025; 998; 765。

C) ^{1}H-NMR和^{13}C-NMR

加入三氟乙酸(TFA)后，于 25°C DMSO-d_6 中记录 GE 81112 因子 B 的 600 MHz ^{1}H-NMR 光谱(图 7)和 150 MHz ^{13}C-NMR 光谱(图 8)。在两种光谱中检测到来自纯化过程的甲酸盐信号(^{1}H 化学位移 8.13 和 7.07-7.25 ppm; ^{13}C 化学位移 163.0 ppm)。表 VI 和表 VII 报告了观察到的因子 B ^{1}H 和 ^{13}C NMR 信号。

表 VI: GE 81112 因子 B 在 DMSO-d_6 + TFA 中的 ^{1}H-NMR 共振

^{1}H 化学位移(ppm)	多重性	^{1}H 化学位移(ppm)	多重性
1.52	br d	4.60	m
1.57-1.72	m	5.05	d
1.83	br d	6.46	br
1.90	m	6.48	s
2.63	dd	6.93	s
2.88	dd	7.40	br s
2.92	m	7.84	d
3.13	br d	8.05	d
3.64	m	8.33	m
3.83	m	8.54	d
3.95	br d	9.00	br d
4.35	br s	11.72	br s
4.46	m	11.75	br s
4.50	dd	--	--

表 VII: GE 81112 因子 B 在 DMSO-d_6 + TFA 中的 ^{13}C-NMR 共振

^{13}C 化学位移(ppm)	多重性	^{13}C 化学位移(ppm)	多重性
15.9	t	67.77	t
27.36	t	110.3	d
28.40	t	117.85	d
35.47	t	122.5	s
42.87	t	128.4	s
50.1	d	139.66	s
51.20	d	146.7	s
56.78	d	156.7	s
59.73	d	167.4	s
64.09	d	170.5	s
65.14	d	171.3	s
66.90	d	171.38	s

GE 81112 因子 B1 的物理化学特征

A) 质谱

在装有电喷雾源的 Thermofinnigan LCQ deca 仪器上，使用 Thermofinnigan 校准混合物进行 MS 实验，GE 81112 因子 B1 在 m/z = 658 处产生单质子化离子。电喷雾条件是：喷雾电压：4.7 kV；毛细管温度：250°；毛细管电压：9V；注入模式 5μl/分钟。记录处于 50:50 (v/v) 乙腈:水中的 0.01mg/ml 溶液的光谱。

图 9 显示利用 25%标准化碰撞能，在 m/z = 658 处单质子化离子断裂后，GE 81112 因子 B1 典型的 MS-MS 谱。

在装有电喷雾源的 Bruker Daltonics APEX II, 4.7 Tesla 光谱仪的实验中，GE 81112 因子 B1 在 m/z = 658.2459 处产生精确的单质子化离子质量。FTMS 条件是：电喷雾：分析源、轴外喷雾, 60 μl/小时；干气 200° C；毛细管电压：70 V；分离器电压：10 V；累积：40 次扫描；宽谱带模式：分辨率 20'000。

B) ^{1}H-NMR和^{13}C-NMR

在25°C DMSO-d_6中记录GE 81112因子B1的600 MHz ^{1}H-NMR光谱(图10)和150 MHz ^{13}C-NMR光谱(图11)。在两种光谱中检测到来自纯化过程的甲酸盐信号(^{1}H化学位移8.32 ppm; ^{13}C化学位移165.28 ppm)。

表VIII和表IX报告了观察到的因子B1 ^{1}H和^{13}C NMR信号。

表VIII: GE 81112因子B1在DMSO-d_6中的^{1}H-NMR共振

^{1}H化学位移(ppm)	多重性	^{1}H化学位移(ppm)	多重性
1.38	br d	4..40	br m
1.56-1.64	m	4.46	m
1.76	m	5.05	d
2.70	m	5.60	br s
2.82	br s	6.21	br
2.92	m	6.52	br
3.01-3.06	m	6.78	br s
3.49	br m	7.13	br
3.57	br s	7.80	br d
4.20	br dd	7.90	br d
4.26	br	8.44	br

表 IX: GE 81112 因子 B1 在 DMSO-d_6 中的 ^{13}C-NMR 共振

^{13}C 化学位移(ppm)	多重性	^{13}C 化学位移(ppm)	多重性
17.95	t	66.88	d
27.97	t	111.07	d
29.8	t	118.97	d
36.54	t	122.47	s
43.75	t	127.88	s
45.65	d	148.08	s
50.52	d	159.18	s
51.9	d	169.44	s
57.75	d	171.53	s
61.0	d	171.81	s
64.03	d	173.08	s
66.7	d	--	--

生物学活性

按照 The National Committee for Clinical Laboratory Standards (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically- 第三版; Approved Standard. NCCLS document M7-A3 Vol.13 No. 25), 使用标准 U-底 96-孔板的微稀释法测定 GE 81112 因子 A、B 和 B1 的抗微生物活性。结果报告于表 10。

所用菌株是临床分离物或来自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。将 GE 81112 因子溶于 DMSO; 进一步利用蒸馏水稀释该溶液。所用培养基有, 阳离子调节型 Mueller Hinton broth (CAMHB), 用于大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粘膜炎莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*); Todd Hewitt broth (THB), 用于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*); 抗生素培养基 N°3 (AM3)和基本培养基 Davis Mingioli Broth + 2% (w/v)葡萄糖 + 100 μg/ml 天冬酰胺(MM), 用于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); Davis Mingioli

Broth + 2% (w/v)葡萄糖(MM)，用于大肠杆菌；RPMI 1640 (RPMI)和 Minimal 40 + 0.1%维生素(MM)，用于白色念珠菌(*Candida albicans*)。除非另外说明，接种物为 10^4 CFU/ml。所有菌株于 35°C 空气中培养。培养时间 18-24 小时。培养后进行视觉读数，MIC 定义为完全抑制测试微生物生长的较低浓度。

表 X. GE 81112 因子 A、B 和 B1 的抗微生物活性

MIC (μg/ml)			
菌株(培养基)	*81112 A*	*81112 B*	*81112 B1*
819 金黄葡萄球菌 Smith ATCC19636 (CAMHB)	>512	>512	>512
49 化脓性链球菌 *cl.is.* (THB)	>512	512	512
44 肺炎链球菌 *cl.is.* (THB)	64	64	64
560 粪肠球菌 Van A (CAMHB)	*32*	32	512
102 枯草芽孢杆菌 ATCC6633 (MM)	0.13	0008	0.06
102 枯草芽孢杆菌 ATCC6633 (AM3)	>512	256	512
3292 粘膜炎莫拉菌 cl.is. (CAMHB)	2	1	2
47 大肠杆菌(MM)	0 06	0.03	013
47 大肠杆菌(CAMHB)	>512	512	512
145 白色念珠菌(MM)	>512	>512	>512
145 白色念珠菌(RPMI)	>512	>512	>512

GE 81112 因子 A、B 和 B1 抑制粘膜炎莫拉菌生长，MIC 为 1-2 μg/ml。所用菌株为临床分离物。

GE 81112 因子 A、B 和 B1 也显示抗肺炎链球菌临床分离物的临界活性(marginal activity)(MIC 64μg/ml)。此外，因子 A 和 B 针对万古霉素(VanA)抗性粪肠球菌的 MIC 为 32 μg/ml，而因子 B1 直至浓度为 512 μg/ml 仍无活性。

粘膜炎莫拉菌和肺炎链球菌被认为是重要的人类病原体。它们是呼吸道感染、特别是儿童耳炎和老人下呼吸道感染的常见原因。近来

公认粘膜炎莫拉菌和肺炎链球菌为呼吸道最常见的病原体(M.C. Enright 和 H. McKenzy, *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis - Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen, J. Med. Microbiol. 46, 360-71, 1997)。

万古霉素抗性肠球菌(VRE)成为有关人类严重感染(例如心内膜炎、脑膜炎和败血症)的重要医院获得性病原体，引起越来越多的治疗挑战 (Y.Cetinkaya, P.Falk, C.G.Mayhall, Vancomycin-resistant enterococci, Clin. Microbial. Rev.13, 686-707, 2000; L.B.Rice Emergence of vancomycin-resistant enterococci, Emerg. Infec. Dis.7, 183-1, 2001)。

GE 81112 因子 A、B 和 B1 也在很低浓度、确切 l μg/ml 的低浓度下，抑制培养于基本培养基(MM)中的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长。当相同细菌生长于丰富培养基时，因子 A、B 和 B1 的 MIC 为 256-512 μg/ml 或更高。

GE 81112 因子 A、B 和 B1 均不抑制白色念珠菌在基本培养基或丰富培养基中的生长。

GE 81112 因子 A、B 和 B1 对细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)与真核生物(例如白色念珠菌)的不同行为，提示 GE 81112 化合物的作用机理具有原核生物特异性。

根据抗微生物治疗的最近趋势，倾向于利用针对所分离病原体具有选择性活性的抗微生物谱更窄的药剂替代广谱活性的药剂，因其降低了产生抗性的选择性压力(J.C. Gyssens: "Quality Measures of Antimicrobial Drug Use" in Int. J. Antimicrobial Agents, 17, 2001, 9-19; J. Chopra "Research and Development of Antibacterial Agents" in Current Opinion in Microbiology, 1998, 1, 495-501)。因此，本发明的 GE 81112 化合物特别适于用作治疗粘膜炎莫拉菌所致呼吸道感染的选择性药剂。

本发明的化合物可以按药物可接受组合物(就此或与药物可接受载体的混合物)给药，也可以与其它抗微生物剂例如青霉素、头孢菌素、

氨基糖苷和糖肽共同给药。因而联合治疗包括，按第一次给药的治疗效果未完全消失时后续给药的方式连续、同时及分别给予该活性化合物。

本发明的化合物因而可用作药剂；单一因子 A、B 和 B1 可以单独使用，或使用其两种或多种任意比例的混合物。通过混合预定量的两种或多种因子，可获得所述混合物。或者，可以按照上述方法，从链霉菌 DSMZ 14386 发酵产物的分离物中直接获得因子的混合物。

优选按照本领域素来已知以及参考书籍报告的方法，将本发明化合物配制成适于肠胃外和/或口服和/或局部给药的制剂。

对于治疗任何有关抗生素敏感性微生物感染的 i.v.给药而言，例如药物制剂在含有合适增溶剂(例如聚丙二醇或二甲基乙酰胺)和表面活性剂(例如处于灭菌注射用水中的聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯或聚乙氧基化蓖麻子油)的水中。优选注射用制剂 pH 应为 7±0.5。必要时，应利用合适的缓冲剂适当调整制剂的 pH。磷酸可方便地用作缓冲剂。

或者，可将活性成分制备为供重建的冻干粉末。任选必要时可加入常用的冻干助剂，以获得粉末形式的冻干物。

也可能以合适的药物形式使用抗生素，例如胶囊、片剂或含水溶液或悬浮液(例如糖浆剂)供口服给药，或引入常规乳剂或凝胶剂中供局部应用，或在液体制剂中供吸入治疗。

活性成分的剂量取决于多种因素，包括类型、患者年龄和状态、选择给予的特定活性成分和制剂、给药方案等。一般而言，按单个单位剂型使用有效的抗微生物剂量。一般优选重复应用/给药，例如一天 2-6 次。有效剂量可能一般为 0.5-50 mg/kg 体重/天。优选的局部制剂是包含 1% - 10%本发明化合物的软膏。

无论如何，处方医生将能确定特定情况下特定患者的理想剂量。

附图简述

图 1 显示利用 25%标准化碰撞能，在 m/z = 644 处单质子化离子断裂后，抗生素 GE 81112 因子 A 的 MSMS 光谱。

图 2 显示抗生素 GE 81112 因子 A 在石蜡糊中的 I.R.吸收光谱。

图 3 显示抗生素 GE 81112 因子 A 在 DMSO- d_6 和 TFA(滴)中、于 600 MHz 测定的 ^{1}H-NMR 光谱。

图 4 显示抗生素 GE 81112 因子 A 在 DMSO- d_6 和 TFA 中(滴)于 150 MHz 测定的质子去偶联 ^{13}C-NMR 光谱。

图 5 显示利用 28%标准化碰撞能，在 m/z = 659 处单质子化离子断裂后，抗生素 GE 81112 因子 B 的 MsMs 光谱。

图 6 显示抗生素 GE 81112 因子 B 在 KBr 中的 I.R.吸收光谱。

图 7 显示抗生素 GE 81112 因子 B 在 DMSO- d_6 和 TFA(滴)中、于 600 MHz 测定的 ^{1}H-NMR 光谱。

图 8 显示抗生素 GE 81112 因子 B 在 DMSO- d_6 和 TFA(滴)中、于 150 MHz 测定的质子去偶联 ^{13}C-NMR 光谱。

图 9 显示利用 25%标准化碰撞能，在 m/z = 658 处单质子化离子断裂后，抗生素 GE 81112 因子 B1 的 MsMs 光谱。

图 10 显示抗生素 GE 81112 因子 B1 在 DMSO- d_6 中、于 600 MHz 测定的 ^{1}H-NMR 光谱。

图 11 显示抗生素 GE 81112 因子 B1 在 DMSO- d_6 中、于 150 MHz 测定的质子去偶联 ^{13}C-NMR 光谱。

下列实施例进一步说明而非限制本发明。

实施例 1: 链霉菌属 DSMZ 14386 的发酵以及从收集液中回收 GE 81112 化合物。

使用保存于-80°C 小瓶中的种子培养物接种到包含 100 ml V6 培养基(V6)的 500 ml 三角瓶中，其中含有以下成分(g/1): 葡萄糖 20、肉膏 5、酵母提取物 5、蛋白胨 5、水解酪蛋白 3 和 NaCl 1.5。利用蒸馏水制备培养基，以 NaOH 调 pH 至 7.5，然后 120°C 灭菌 20 分钟。将接种瓶在 200 rpm 的旋转摇床中于 28°C 培养 40-48 小时，然后用于接种包含 3 升 V6 培养基的 4 升生物反应器。培养物在前 30 小时于 27°C 温度下生长，然后在以后的 18 小时于 24°C 生长，直至接种时间为止。搅拌保持在 700 rpm，空气流速 0.5 v/v/分钟。将该培养物(1.5 升)接种

于包含200升生产培养基的300升发酵罐中，其中含有以下成分(g/l):甘油30、大豆粉15、碳酸钙5和氯化钠2。利用去离子水制备培养基，以NaOH调pH至7.3。加入30 ml Hodag AFM-5作为消泡剂。该培养物于28 °C发酵62小时，前18小时空气流速为60 l/分钟，然后提高到100 l/分钟(0.5 v/v/分钟)，直至收获时间为止。180 rpm搅拌。

然后利用蒸馏水将收获的培养液稀释到200 l，加入Hyflo助滤剂后过滤。放出菌丝体，滤出液加入约600 ml 3.25 M HC1，调到pH 3.5。然后将GE 81112抗生素混合物吸附于2.5 l酸性形式的Dowex 50W x 2阳离子交换树脂(The Dow Chemical Company)。分批搅拌过夜后，过滤回收树脂，放出液体。

两只发酵罐如上所述平行进行，然后混合每个运行中的Dowex树脂。将树脂(5 l)上样到柱(12.5 cm直径；45 cm床高)中，利用6 l 20 mM pH 3.5磷酸钠缓冲液以90 ml/分钟流速洗涤；然后利用10 l 20 mM pH 3.5磷酸钠缓冲液：甲醇8:2 (v/v)混合物洗涤。然后利用以磷酸缓冲到pH 10的257 mM氨水进行洗脱。收集一升流分，立即通过加入磷酸调到约pH6。利用生物分析，即抑制培养于基本培养基(MM)中的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长，以及分析型HPLC，按实施例2所述方法，评价每一流分中的抗生素含量。混合从Dowex树脂洗脱的流分5-10，得到5.8 l富含GE 81112化合物混合物的溶液。该溶液样品(50 ml)经真空浓缩，然后冻干，得到1.48 gr粗的GE 81112化合物制剂。

实施例2 GE 81112因子A、B1和B的分离与纯化

将实施例1获得的溶液分批与1.2 l聚苯乙烯树脂HP20 (Mitsubishi Chemicals Co.)搅拌过夜。然后过滤回收树脂，上样到7.5 cm直径、27 cm床高的柱中。柱子然后利用6 l 1:9 (v/v)甲醇：蒸馏水以40 ml/分钟流速洗脱，再利用4 l 3:7 (v/v)混合物洗脱。收集一升流分，并利用HPLC分析。前3个流分包含富含因子A的GE 81112因子混合物，混合在一起。后面的3个流分富含因子B1和B，也混合在一起。将两个混合物真空浓缩至小体积，然后冻干，得到分别富

含因子 A 以及因子 B1 和 B 的 3.8 gr 和 1.7 gr 固体。

然后通过 Hibar Lichrosorb (Merck) 25 x 250 mm 柱 RP8 (7 μm 粒径)的制备型 HPLC (Shimadzu-LC8A)，利用以甲酸调到 pH4.5 的 40 mM 甲酸铵、按 3.5 ml/分钟流速洗脱，获得各个纯的因子。将约 100 mg 上述抗生素制剂溶解于 350 μm 洗脱相中，进行层析。因子 A、B1 和 B 一般分别于约 9.5、12.4 和 13.4 分钟后洗脱。将显示含均一抗生素成分的重复层析流分混合，真空浓缩至残留水中。然后将溶液冻干，再溶成分解于 40 ml 蒸馏水，再次冻干，分别得到 116、13、10mg 抗生素 GE 81112 因子 A、B1 和 B。

在装有 SPD-M10A 二极管阵列检测器和 Sil-9A 自动进样器的 Shimadzu LC10-AS 仪器中进行 HPLC 分析。层析柱为购自 Alltech 的"Altima" RP18, 5 pm, 250x4.6 mm i.d。利用通过加入甲酸调到 pH4.5 的 40 mM 甲酸铵缓冲液、按 1 ml/分钟流速进行无梯度洗脱。在 230 nm 处 UV 检测。

在上述分析型 HPLC 条件下检测这 3 种因子，显示以下保留时间：因子 A 为 14.1 分钟，因子 B1 为 18.4 分钟，因子 B 为 21.6 分钟。

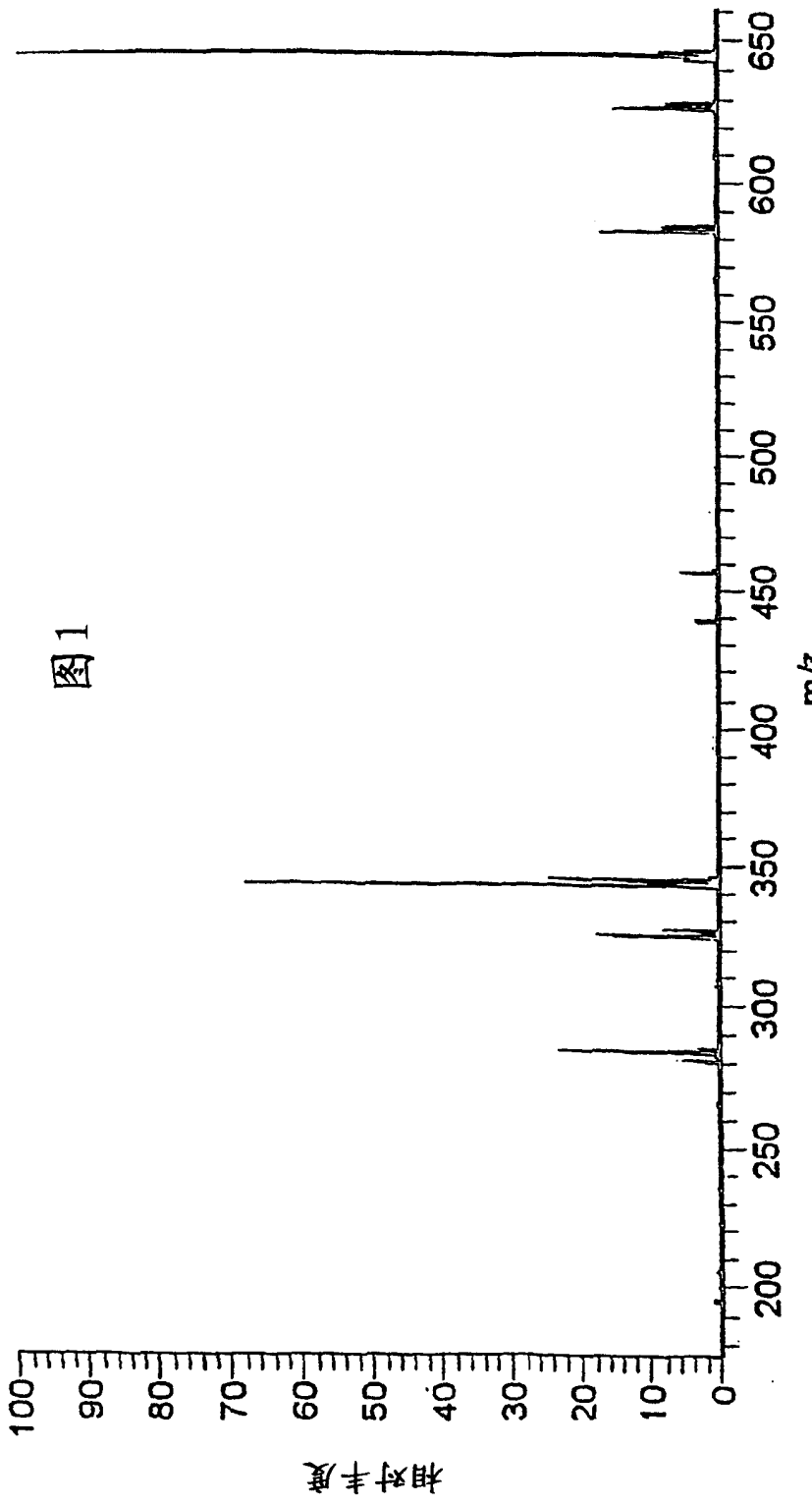


图1

利用25%的标准碰撞能在m/z=644处的
单质子化离子的碎裂后GE81112因子A的MsMs光谱

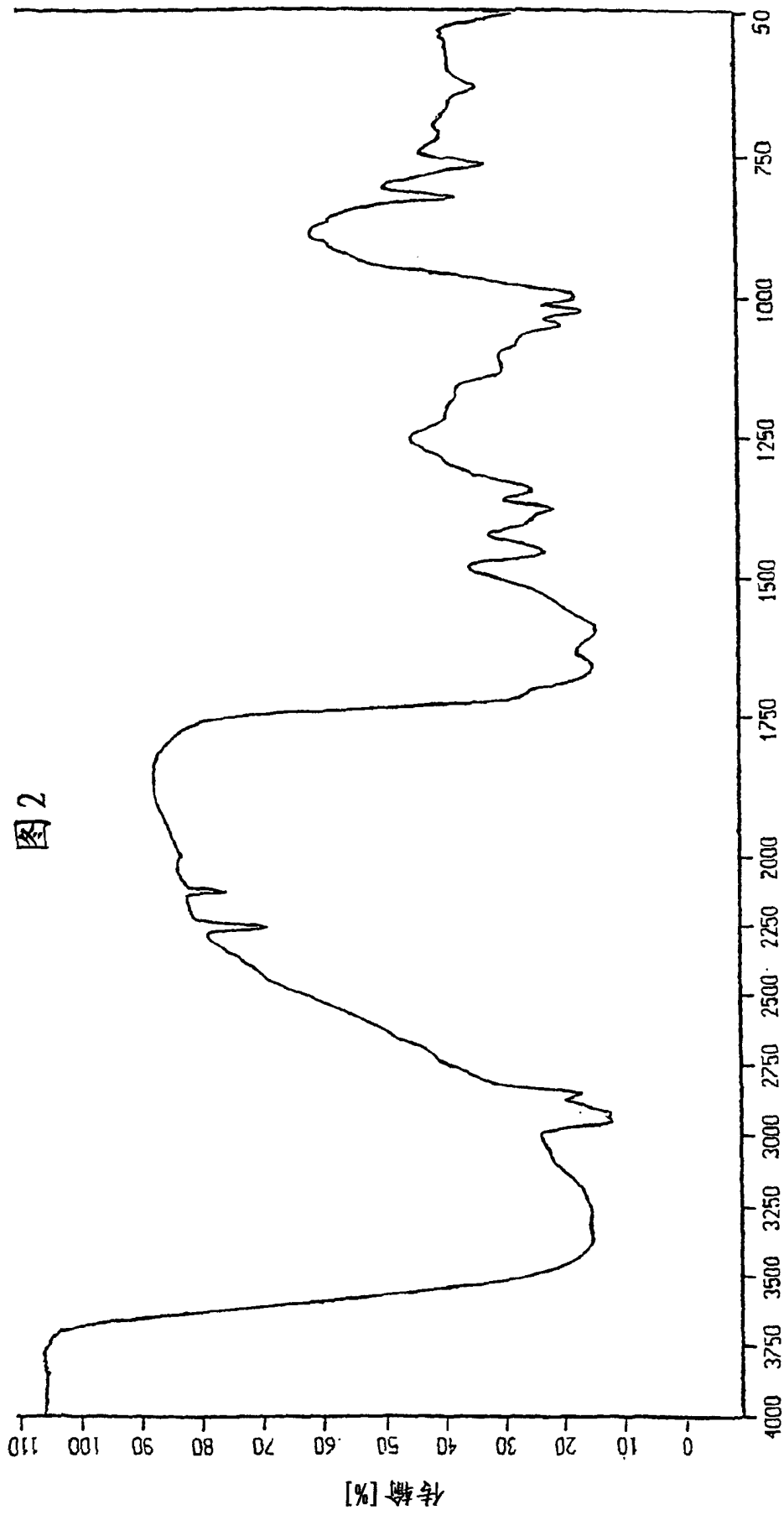
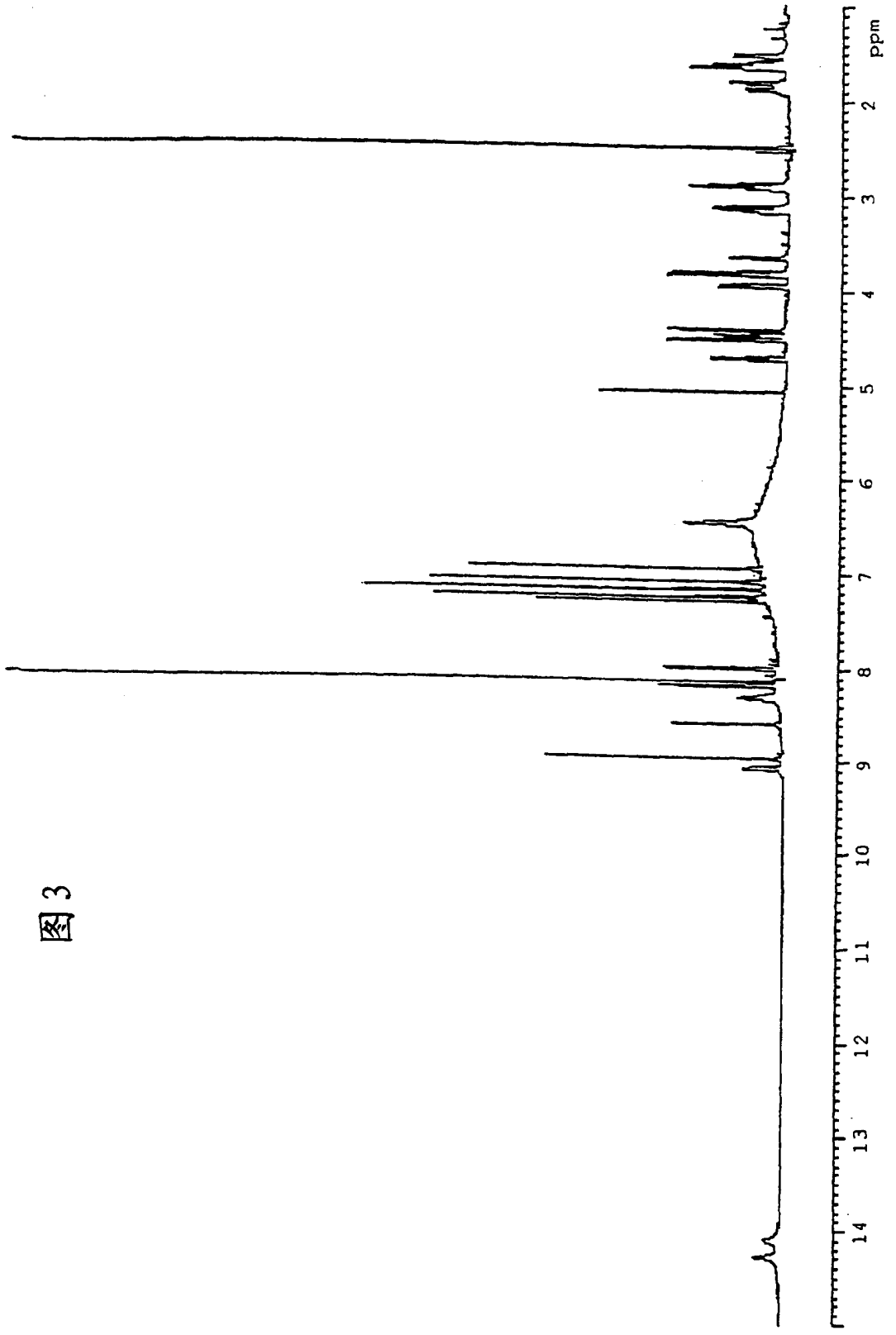


图2

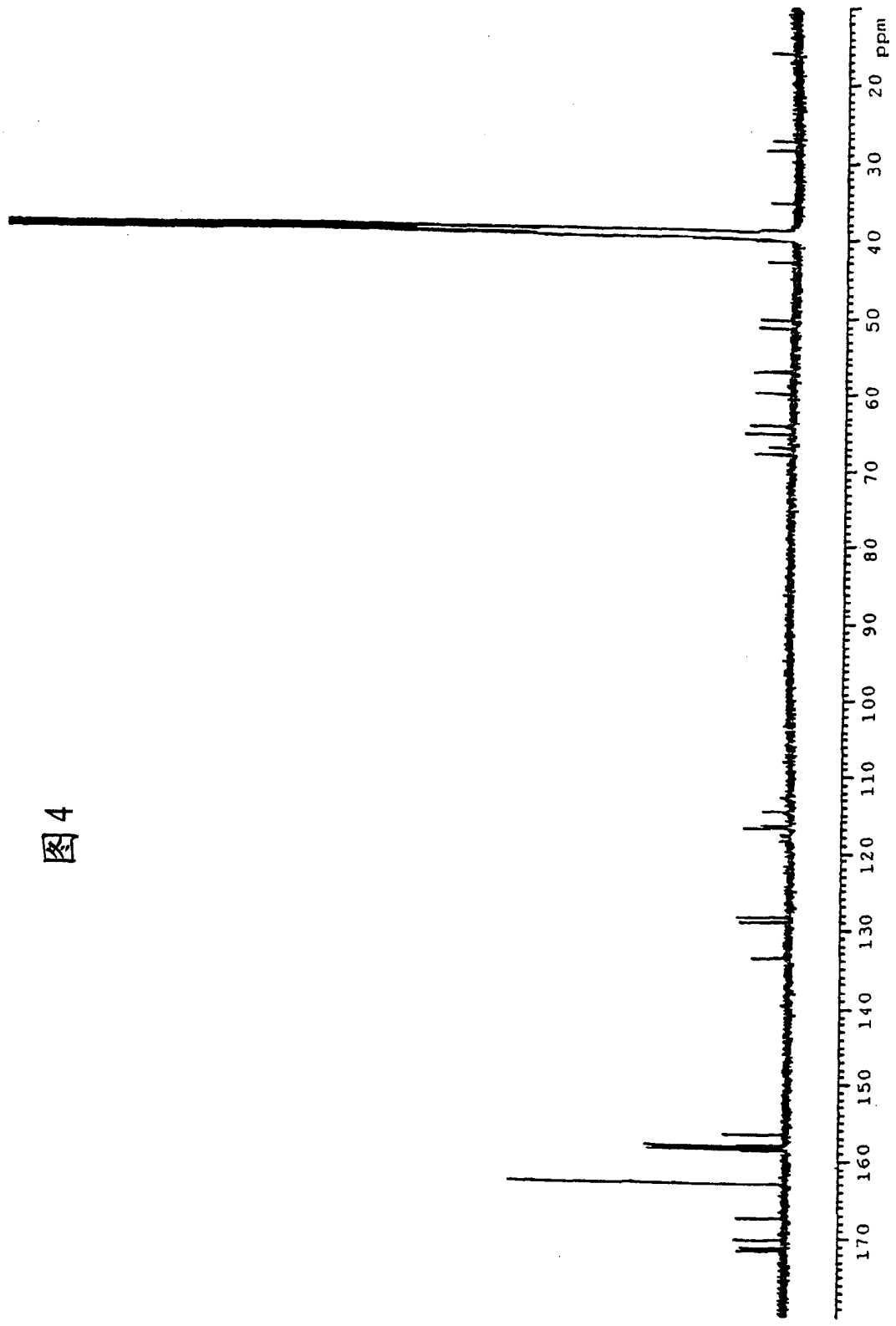
在石蜡糊中的GE81112因子A的红外光谱

图3



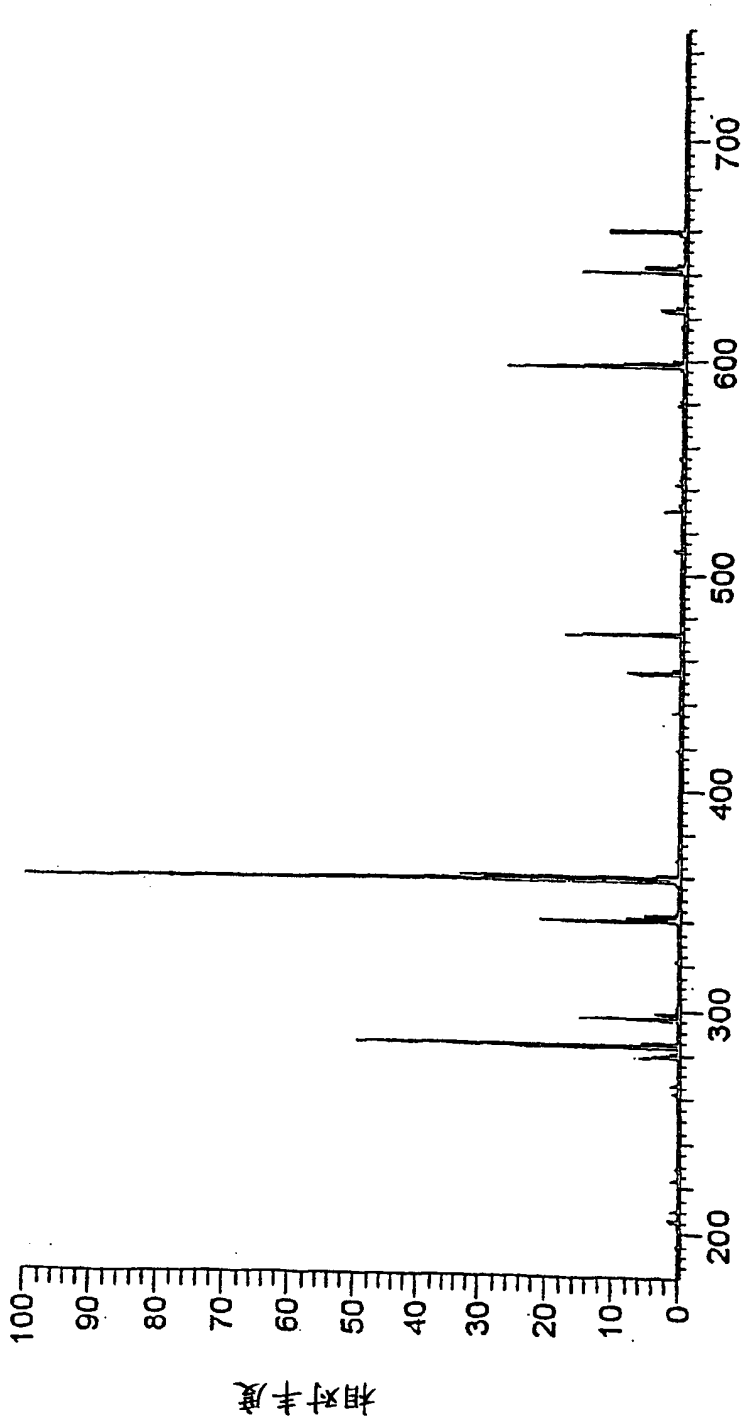
在DMSO-d_6和TFA(滴)中的GE81112因子A的^{1}H光谱

图4



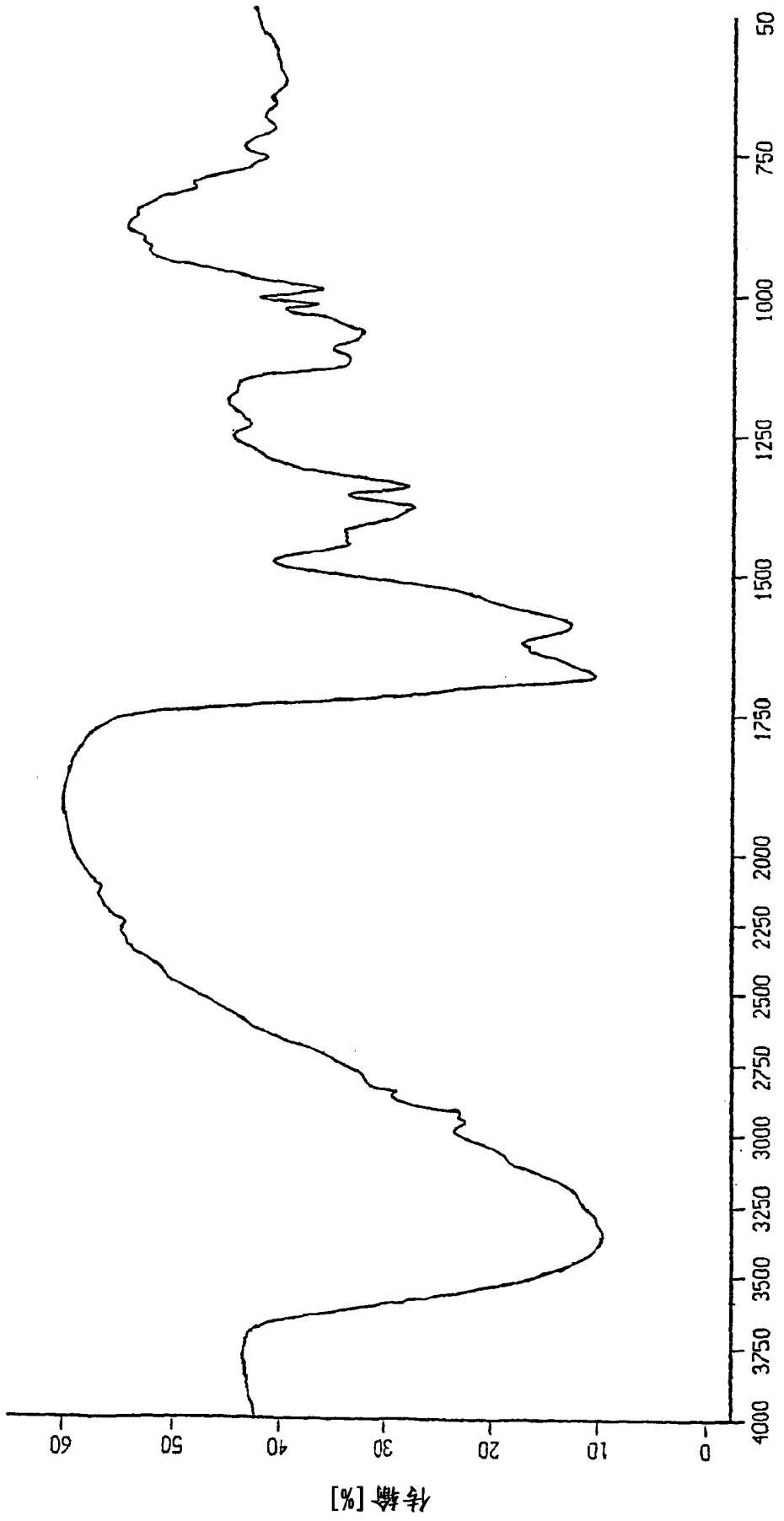
在 DSMO-d_6和 TFA（滴）中的 GE81112 因子 A 的 ^{13}C 光谱

图5



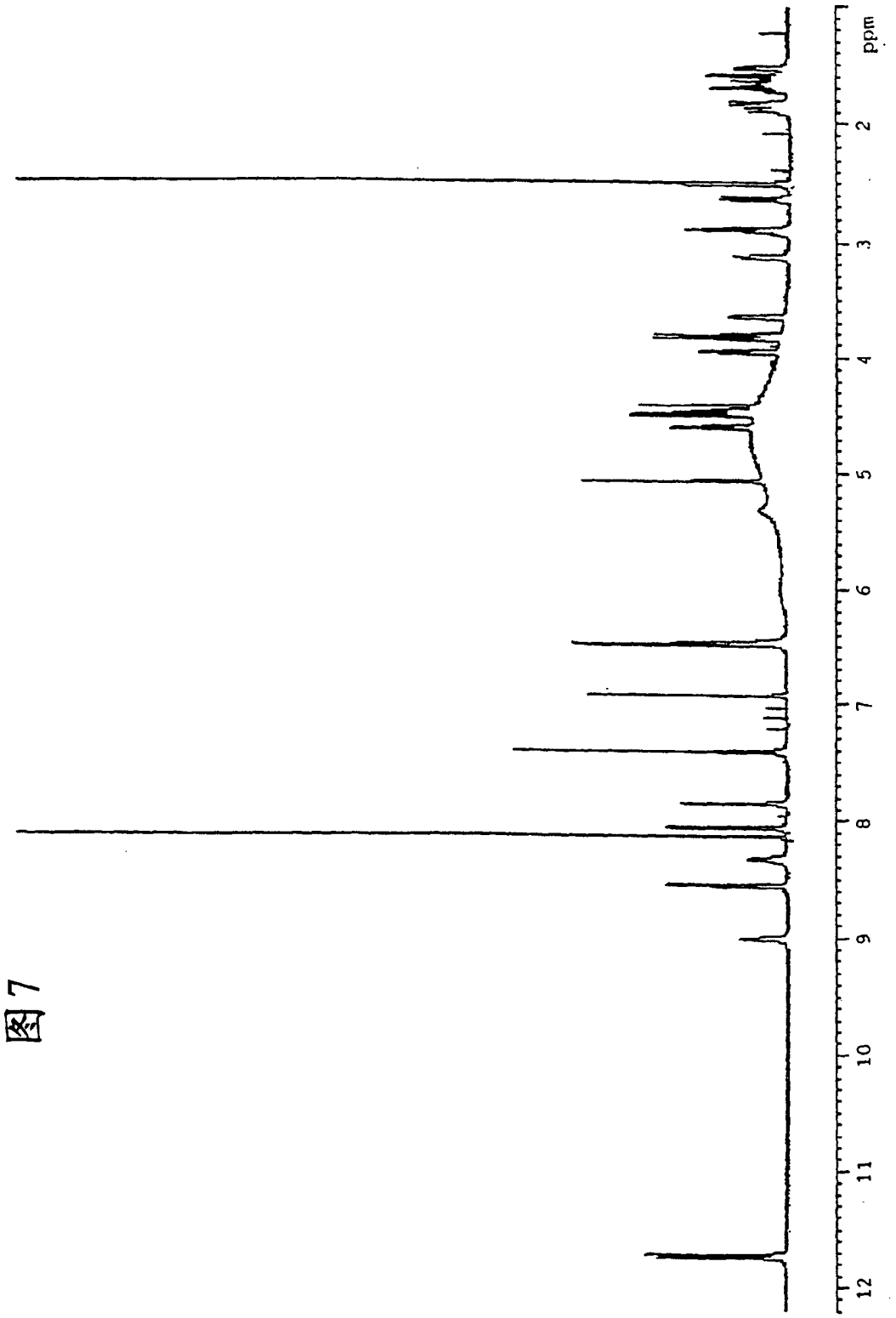
利用28%的标准碰撞能，在m/z=659处
单质子化离子的碎裂后GE81112因子B的MsMs光谱

图6



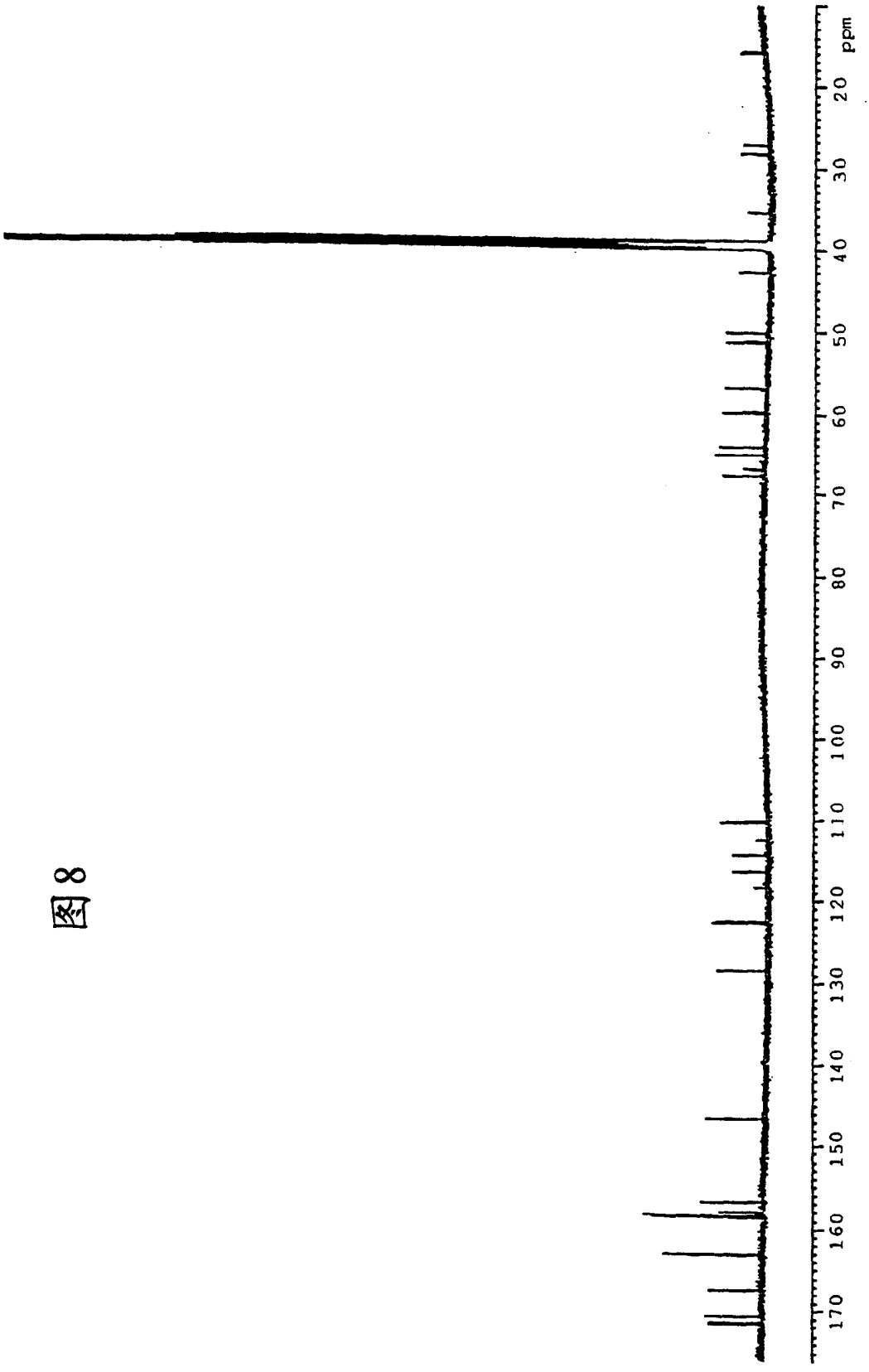
在KBr中的GE81112因子B的红外光谱

图7



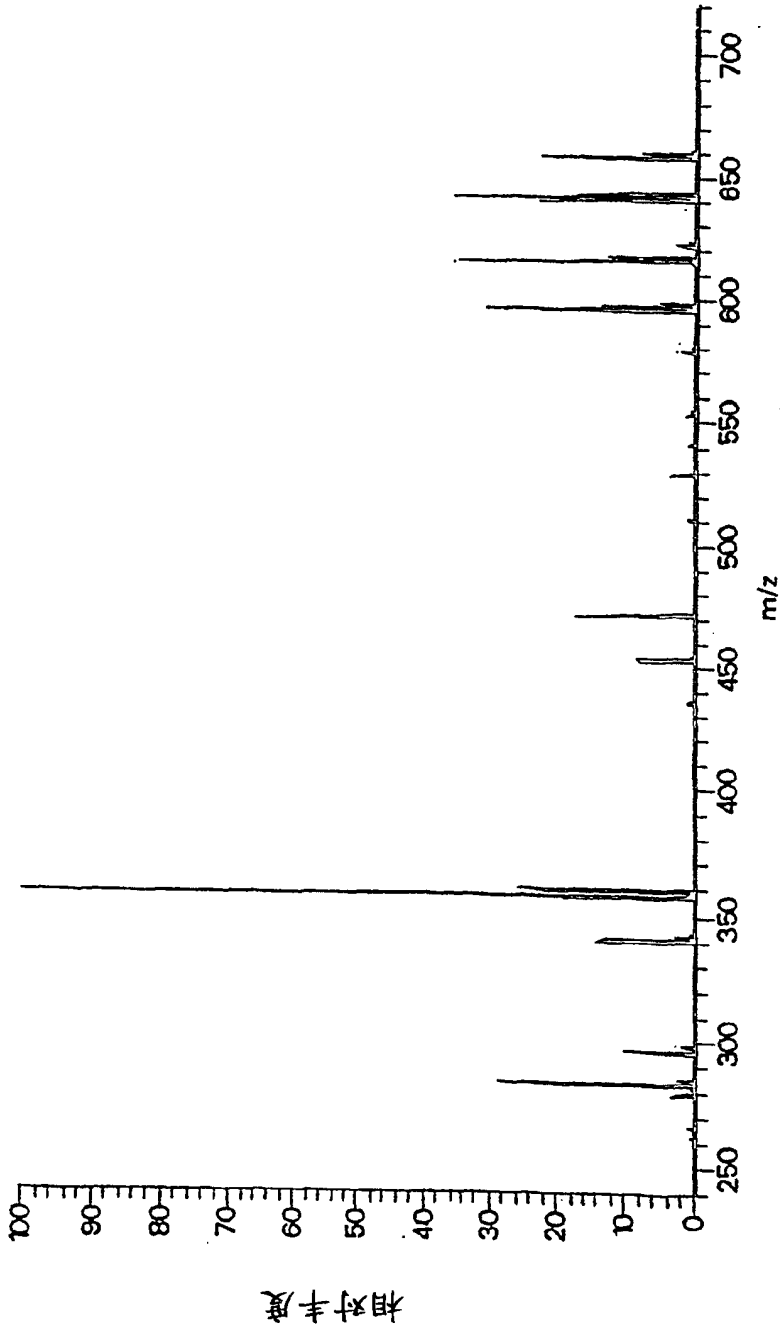
在 DSMO-d_6和 TFA（滴）中的 CE81112 因子 B 的 ^1H 光谱

图8



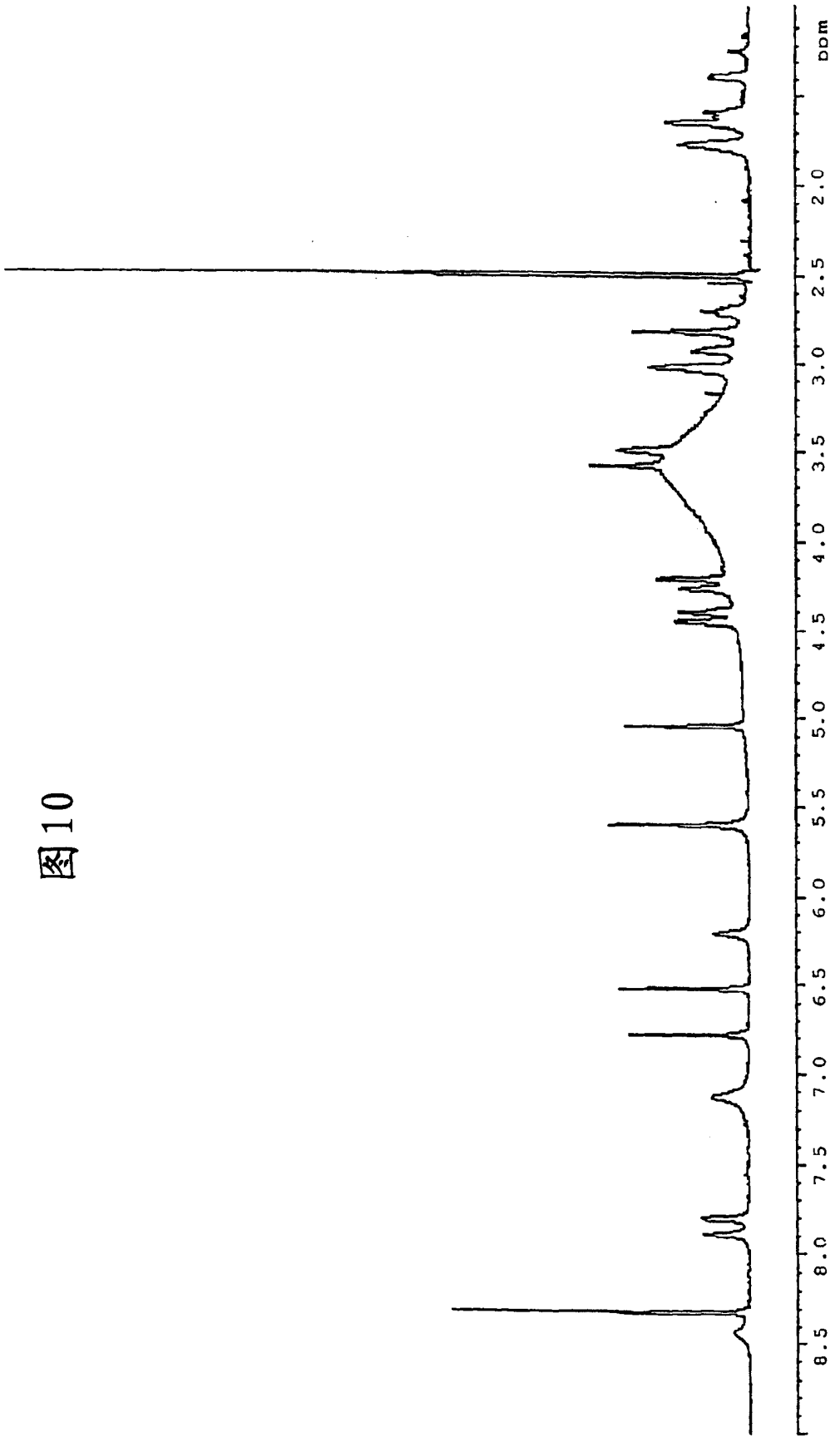
在DSMO-d_6和TFA（滴）中的GE81112因子B的^{13}C光谱

图9



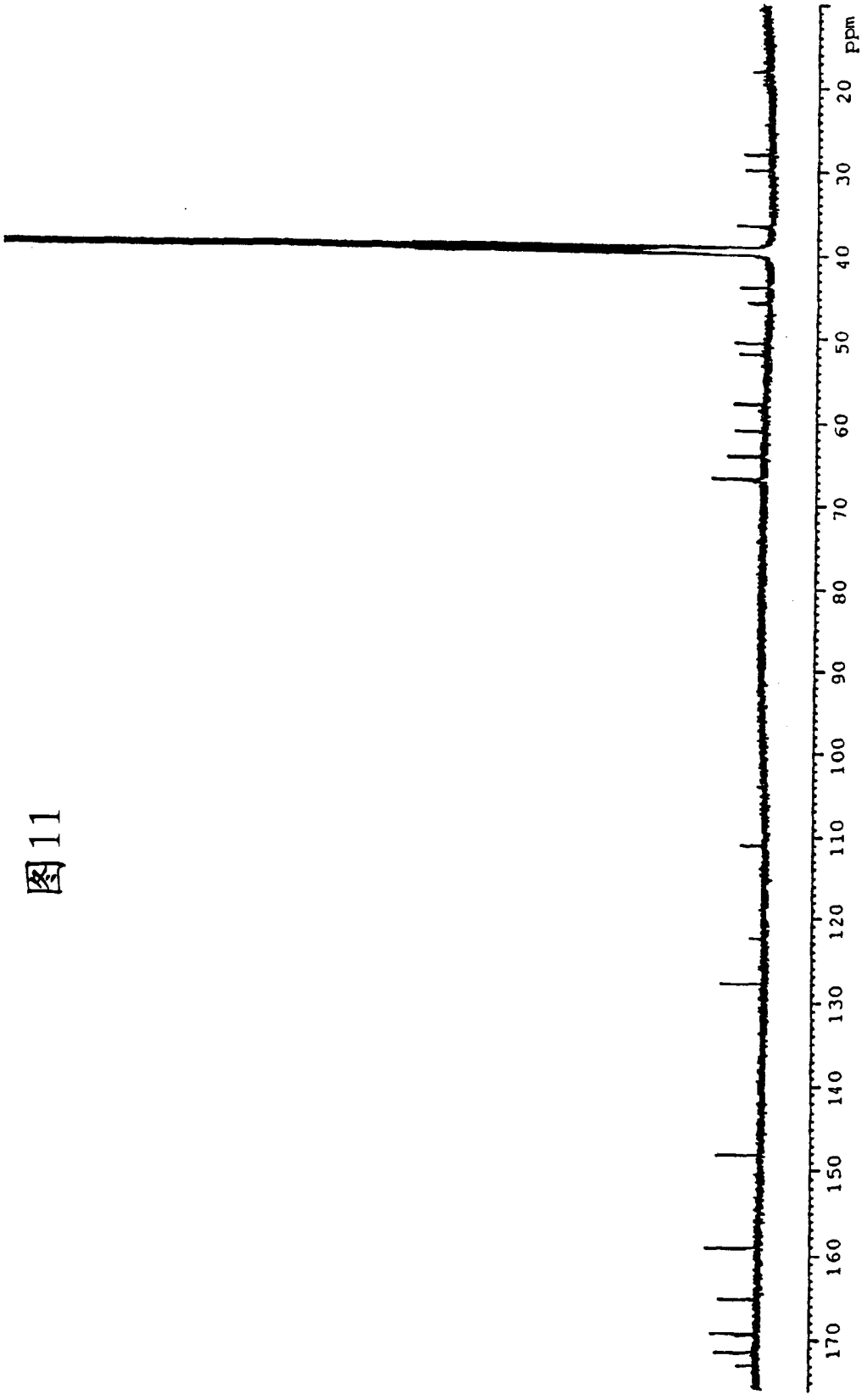
利用25%的标准化碰撞能，在m/z=658处
单质子化离子断裂后，GE81112因子B1的MsMs光谱

图10



在 DSMO-d_6 中的 GE81112 因子 B1 的 ^1H 光谱

图11



在 DSMO-d_6 中的 GE81112 因子 B1 的 ^{13}C 光谱