



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101050445 B

(45) 授权公告日 2011.08.10

(21) 申请号 200710089045.0

C12P 17/16 (2006.01)

(22) 申请日 2003.09.22

C07D 417/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07D 307/00 (2006.01)

60/412994 2002.09.23 US

C12R 1/01 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

03822662.6 2003.09.22

(56) 对比文件

CN 1369484 A, 2002.09.18, 摘要, 说明书第 2 页第 2-27 行, 第 2 页末段至第 3 页第 29 行, 实施例 3.

(83) 生物保藏信息

PTA-3880 2001.11.27

US 6194181 B1, 2001.02.27, 摘要、实施例

PTA-3881 2001.11.27

1-5.

(73) 专利权人 布里斯托尔-迈尔斯斯奎布公司

审查员 廖雅静

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 D·贝尼尼 R·斯坦卡瓦格 蒋树仁

侯信雄 B·伊甘 D·古 D·侯

L·明茨迈尔 T·P·图利

B·L·戴维斯 I·哈格罗

M·马斯卡里 G·加尔文

G·施泰因 C·W·麦康罗格

F·T·卡姆佐格卢

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 黄可峻

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

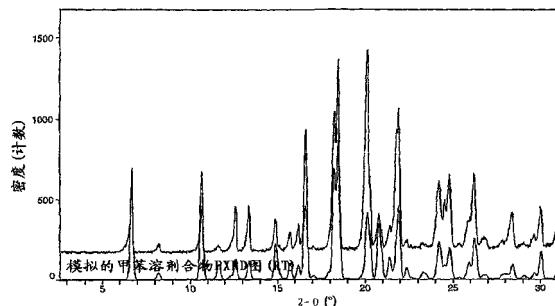
权利要求书 1 页 说明书 34 页 附图 15 页

(54) 发明名称

产埃坡霉素的微生物

(57) 摘要

本发明涉及产埃坡霉素的微生物,以 ATCC 号 PTA 3880 保藏的纤维堆囊菌菌株和以 ATCC 号 PTA 3881 保藏的纤维堆囊菌菌株。



1. 以 ATCC 号 PTA 3880 保藏的纤维堆囊菌 (*Sorangiumcellulosum*) 菌株。

产埃坡霉素的微生物

[0001] 本申请是申请号为 03822662.6、发明名称为“埃坡霉素 B 的制备、分离和纯化的方法,及埃坡霉素 B 的 X-射线晶体结构”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求以 2002 年 9 月 23 日提交的美国临时申请序号 60/412,994 为优先权。

[0004] 发明领域

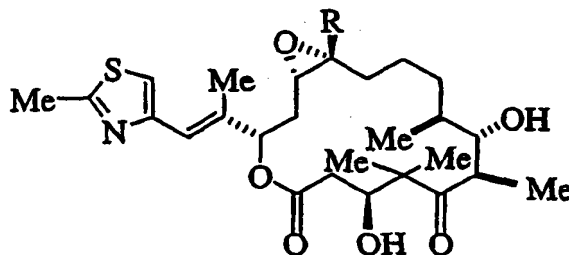
[0005] 本发明涉及埃坡霉素 (epothilone) B 的生产、分离和纯化的改进方法。例如,这些方法包括生产埃坡霉素 B 的发酵过程、通过在树脂上吸附的分离以及随后的纯化过程。

[0006] 发明背景

[0007] 埃坡霉素是一类较新的大环内酯化合物,最初由粘细菌(纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*))发酵获得。由于这类化合物具有抗真菌的性质最初它们是作为植物保护剂进行研究。然后由于它们对动物细胞具有细胞毒活性埃坡霉素变得引人注目,后来将这种细胞毒活性表征为微管蛋白聚合剂。现在知道埃坡霉素能发挥类似于紫杉醇(TAXOL®)的稳定微管效应和抗快速增殖细胞如肿瘤细胞或其它过度增殖细胞的疾病的细胞毒活性。埃坡霉素作为化疗剂的用途在 Bollaget 等, *Cancer Research* 55,2325,1995 中有描述。

[0008] 埃坡霉素 A 和 B(分别为 epo A 或 epo B)具有下面的结构,

[0009]



[0010] 埃坡霉素 A R = H

[0011] 埃坡霉素 B R = Me

[0012] 获得埃坡霉素的示意图由 Hofle 等在 WO 93/10121 中揭示。Hofle 在含碳源、氮源和无机盐的介质中培养了纤维堆囊菌的菌株。在该菌株的培养过程中加入了吸附剂树脂。用溶剂从吸附树脂上洗脱埃坡霉素。通过反相色谱法分离各种埃坡霉素并使其结晶。然而, Hofle 等承认这种方法只能生产低数量的埃坡霉素 B,以及在发酵中埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例也低。这种埃坡霉素 B 相对于埃坡霉素 A 的低比例使得纯埃坡霉素 B 的回收困难。因此,在技术上需要生产埃坡霉素 B 优于埃坡霉素 A 的改进的发酵方法,以及分离和纯化埃坡霉素 B 的改进方法。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及一种生产埃坡霉素 B 的改进的发酵方法。

[0015] 本发明还包括用于埃坡霉素生产的通过诱变获得的纤维堆囊菌新菌株。

[0016] 本发明还包括通过对发酵提供添加剂来提高纤维堆囊菌的新菌株生产的埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例的方法。在一优选的实施方案中,添加剂为丙酸盐、调节至合适的

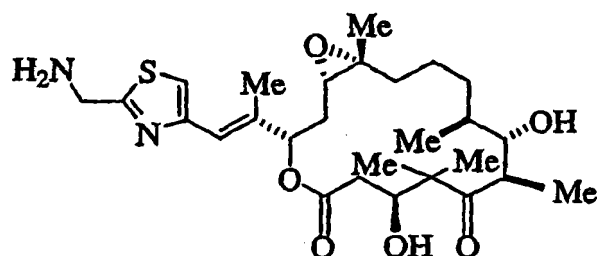
pH 的丙酸或另一丙酸盐前体。

[0017] 本发明还包括一种用于使用树脂从发酵培养基中分离埃坡霉素 B 的改进的萃取方法。还包括减少杂质含量和改进下游处理的洗涤富含埃坡霉素树脂的方法。

[0018] 本发明还包括一种纯化埃坡霉素 B 的改进方法。在一实施方案中,利用结晶实现纯化。在另一实施方案中,通过色谱法实现纯化,其中色谱法包括正相色谱法或反相色谱法。在另一实施方案中,通过结晶与色谱分离法纯化样品相结合实现纯化,其中色谱分离法包括正相和反相色谱法。在进一步的实施方案中,树脂萃取物仅通过结晶处理。

[0019] 埃坡霉素 B ("epo B") 作为中间体用于衍生物 1 ("D1") 的制备中, (在美国专利 6,262,094 中作了描述,在此引入作为参考),其中噻唑环上的 2-甲基被胺取代:

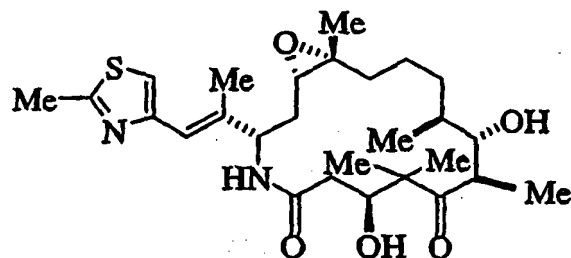
[0020]



[0021] 衍生物 1

[0022] 埃坡霉素 B 也用于衍生物 2 ("D2") 的制备中 (这种将埃坡霉素 B 内酯转化成衍生物 2 内酰胺的方法在 Borzilleri 等, J. Amer. Chem. Soc. 122, 8890, 2000 以及 WO 9902514 中作了描述,在此引入作为参考):

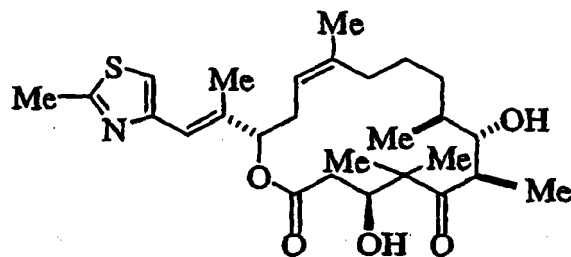
[0023]



[0024] 衍生物 2

[0025] 此外,埃坡霉素 B ("epo B") 还用于衍生物 3 (埃坡霉素 D, "D3") 的制备中 (在美国专利 6,320,045 作了描述,在此引入作为参考):

[0026]



[0027] 衍生物 3

[0028] 本发明还包括利用本文中描述的方法和材料生产的埃坡霉素 B 的晶形。

[0029] 应当理解以上概述和以下的详细说明为本发明的示例,而不是限制本发明。

[0030] 附图简述

[0031] 本发明的优点、特性和各种特点似乎更充分地体现在附图上。附图中：

[0032] 图 1 显示的是晶形 epoB-EA β 的单斜晶胞中的分子结构，在该单斜晶胞的客通道 (guest channel) 中含两分子的埃坡霉素 B 和两分子的乙酸乙酯。

[0033] 图 2 显示的是晶形 epoB-AN β 的单斜晶胞中的分子结构，在该单斜晶胞的客通道中含两分子的埃坡霉素 B 和两分子的乙腈。

[0034] 图 3 显示的是晶形 epoB-IP β 的单斜晶胞中的分子结构，在该单斜晶胞的客通道中含两分子的埃坡霉素 B 和两分子的异丙醇。

[0035] 图 4 显示的是晶形 epoB-To β 的单斜晶胞中的分子结构，在该单斜晶胞客通道中含两分子的埃坡霉素 B 和两分子的甲苯。

[0036] 图 5 显示的是埃坡霉素 B 的乙酸乙酯溶剂合物 (晶形 epoB-EA β) 的 PXRD 观察图 (上部) 和 PXRD 模拟图 (底下)。在图 5 中，模拟图是根据 -33°C 下单斜晶结构中提炼的原子参数计算出的，观察图是在 $+23^{\circ}\text{C}$ 下测量得出的。

[0037] 图 6 显示的是埃坡霉素 B 的甲苯溶剂合物 (晶形 epoB-TO β) 的 PXRD 观察图 (上部) 和 PXRD 模拟图 (底下)。在图 6 中，模拟图是根据 -33°C 下单斜晶结构中提炼的原子参数计算出的，观察图是在 $+23^{\circ}\text{C}$ 下测量得出的。

[0038] 图 7 显示的是埃坡霉素 B 的乙腈溶剂合物 (晶形 epoB-AN β) 的 PXRD 观察图 (上部) 和 PXRD 模拟图 (底下)。在图 7 中，模拟图是根据 -40°C 下单斜晶结构中提炼的原子参数计算出的，观察图是在 $+23^{\circ}\text{C}$ 下测量得出的。

[0039] 图 8 显示的是埃坡霉素 B 的异丙醇溶剂合物 (晶形 epoB-IP β) 的 PXRD 观察图 (上部) 和 PXRD 模拟图 (底下)。在图 8 中，模拟图是根据 -3°C 下单斜晶结构中提炼的原子参数计算出的，观察图是在 $+23^{\circ}\text{C}$ 下测量得出的。

[0040] 图 9 显示的是按照实施例 7 步骤 A 中描述的方法生产的含甲苯的初级的埃坡霉素 B 溶剂合物的 PXRD 观察图。

[0041] 图 10 显示的是对于图 9 中含甲苯的初级的溶剂合物进行的热分析 (DSC 和 TGA)。

[0042] 图 11 显示的是按照实施例 7 步骤 B 中描述的方法生产的含甲苯的再结晶的埃坡霉素 B 的溶剂合物的 PXRD 观察图。

[0043] 图 12 显示的是对于图 11 中含甲苯的再结晶的溶剂合物进行的热分析 (DSC 和 TGA)。

[0044] 图 13 显示的是按照实施例 7 步骤 C 中描述的方法生产的含乙酸乙酯的埃坡霉素 B 的溶剂合物的 PXRD 观察图。

[0045] 图 14 显示的是对于图 13 中含乙酸乙酯的溶剂合物进行的热分析 (DSC 和 TGA)。

[0046] 图 15 显示的是按照实施例 7C 描述的方法制备的含甲苯的溶剂合物的 PXRD 观察图 (上部)，连同室温下埃坡霉素 B 的甲苯溶剂合物的 PXRD 模拟图 (底下)。

[0047] 图 16 显示的是对于图 15 中含甲苯的溶剂合物进行的热分析 (DSC 和 TGA)。

[0048] 应当理解这些图是为了说明本发明的构思，本质上不是限制本发明。为了清楚在图 1-4 中埃坡霉素所有的甲基和亚甲基的氢原子都被忽略。在图 1-4 中，分子间氢键以虚线条显示在图的右下和左上部分，且氢键长 (埃) 是指分子间的氧-氧距离。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明描述具体的处理方法和纤维堆囊菌的新突变株,这些突变株一起或单独地产生增加埃坡霉素 B 浓度的发酵,这主要是通过减少在发酵过程中埃坡霉素 A 产生的相对量实现的。例如,纤维堆囊菌或其它合适的微生物的细胞经一个或多个最初的成长期培养扩增,于是用于为产埃坡霉素发酵提供接种物。在发酵的第一时段期间,例如大约 24-72 小时,当细胞利用介质中的营养素时发生细胞生长。此后,将营养素,如维生素、矿物质、碳水化合物和氨基酸(或其它碳或氮源如氨基酸前体)以有助于埃坡霉素产生的量加入到介质中。在一实施方案中,将营养素如维生素、矿物质、碳水化合物和氨基酸以维持发酵过程中埃坡霉素 A 或埃坡霉素 B 的最大生产率的量加入。在一实施方案中,埃坡霉素 A 或埃坡霉素 B 的最大生产率是这样的生产率:与不加入添加剂或营养素相比产生更大量的埃坡霉素 A 或埃坡霉素 B,也比添加剂或营养素以低于最佳的量加入时产生更大的生产率。在发酵过程中,将丙酸、其前体或其盐以有效增加埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例(“产物比例”)的量加入。

[0051] 本发明还涉及用于生产埃坡霉素的纤维堆囊菌的新菌株。这些新菌株,尤其是菌株 SC16408,已经通过诱变继之以随机选择获得。

[0052] 纤维堆囊菌最初是 1985 年从南非 Zambesi 河的堤岸收集的土样中分离得到的。Hofle 等首先描述了该生物产生埃坡霉素的特征(上面有引用)。Hofle 等使用的菌株称为 So ce90,并保藏在 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen(German Collection of Microorganisms, DSM),保藏号为 6773。So ce90 菌株经过 UV 诱变继之以随机选择产生 Soce90B2 菌株。So ce90B2 菌株(也称为 SC16224)生产的埃坡霉素 B 在振荡烧瓶(例如每个烧瓶中含 1.8w/v%树脂)中的滴度为约 50mg/L 或 2.8mg/g 树脂例如可为 3.5 或 4.5mg/g),且埃坡霉素 B/A 的比例为约 0.6。

[0053] 本发明中,So ce90B2 菌株或其衍生物经历用亚硝基胍(NTG)诱变、继之以随机选择产生 SC16408 菌株(以 ATCC 编号 PTA-3880 保藏)和 SC16449(以 ATCC 编号 PTA-3881 保藏)。后面的两种菌株作为按照布达佩斯条约规定的专利保藏由美国标准菌库保藏。选择过程的详述在实施例中阐述。

[0054] 在一实施方案中,本发明提供产生(例如,在以下定义的生产条件)下每升肉汤体积至少约 100mg 埃坡霉素 B 的纤维堆囊菌菌株。在另一实施方案中,本发明提供在生产埃坡霉素 B 的同等条件下产生每升肉汤体积至少 80mg 埃坡霉素 B 且埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例为至少 1 的纤维堆囊菌菌株。在一实施方案中本发明提供产生 5mg 埃坡霉素 B/g 树脂的埃坡霉素 B、或产生 5mg/g 树脂的埃坡霉素 B 且埃坡霉素 B/A 的比例为至少 1.0 的菌株。在另一实施方案中,埃坡霉素 B/A 的比例为至少 1.5。在另一实施方案中,埃坡霉素 B/A 的比例为至少 1.5 至 4.0。

[0055] 本发明还涉及通过对发酵供给添加剂提高纤维堆囊菌生产的埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例的方法。在优选的实施方案中,添加剂包括丙酸盐,在细胞已经生长直到 96 小时、但优选约 24-48 小时之后加入。在一些优选的实施方案中,在加入丙酸盐之前让细胞生长大约 34 小时。早期 GBF 的研究探查了,在影响发酵的其它因素中,丙酸盐加入到介质中的时间对于埃坡霉素 B/埃坡霉素 A(B/A)比例增加的改进产生 0.1%的影响。本发明的发明人已经意外地发现通过供给丙酸盐或丙酸钠能明显提高埃坡霉素尤其是埃坡霉素 B 的滴度、以及在振荡烧瓶、14L 发酵罐和生产发酵罐中产生的 B/A 比例是本发明的特点之

一。供给丙酸盐或丙酸钠引起埃坡霉素 B 的滴度明显提高。例如,埃坡霉素 B 的烧瓶生产可通过以下方式提高:一旦开始供给就定期地(例如,每天)补充丙酸钠至优选范围 0.05 到 0.80mg/ml (0.005-0.08%) 内,更优选在 0.005-0.04% 的范围内,这可在培养物中进行监测。在一实施方案中,培养物中丙酸盐的量定在 0.02% 或更低。此外,还发现其它丙酸盐相关的化合物包括但不限于丙酸甲酯和丙酸乙酯能提高埃坡霉素 B 生产量和 B/A 比例。

[0056] 在一实施方案中,尤其是用于烧瓶中的发酵,加入含磷酸二氢盐和磷酸氢盐混合物的其它进料,磷酸二氢盐和磷酸氢盐所选择的比例能维持合适的 pH。可将这种进料掺入到丙酸盐进料中或分开加入。

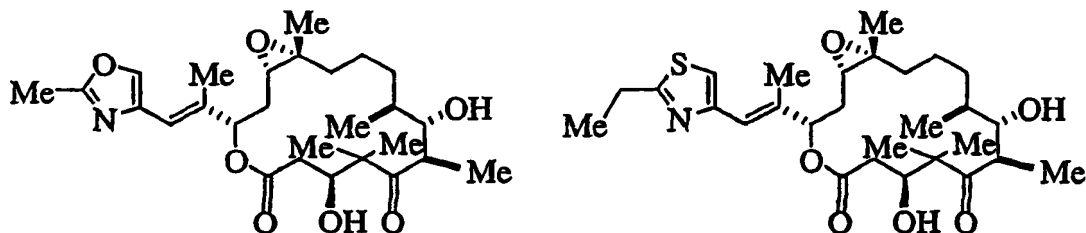
[0057] 本发明中,描述了大规模的埃坡霉素纯化的方法,该方法成功地利用了树脂的加入。发现这种树脂的掺入对于埃坡霉素的分离和纯化是有用的,它能显著地提高埃坡霉素的滴度。在本发明的一个优选的实施方案中,树脂为苯乙烯/二乙烯基苯聚合树脂,如 XAD 树脂,优选 XAD-16 或同等物(可以 Amberlite XAD-16 的商品名购自 Sigma-Aldrich, St Louis, MO 或 Rohm 和 Haas 公司, Philadelphia, PA)。其它带有疏水性表面的 Amberlite 树脂也可用于本发明中,如基于苯乙烯的 XAD 4、XAD-1180 或 XAD-1600 (Rohm 和 Haas 公司),还有树脂如基于苯乙烯的 XD-207、HP20、HP21、SP825、SP850、SP700 或 SP207 (由于加入溴基团疏水性更强)(这些树脂由 Mitsubishi, Tokyo, Japan 或 Mitsubishi Chemical America, Inc. White Plains, NY 生产)。可将树脂以较宽的含量范围掺入介质中,如 0.2w/v% 至 5.0w/v%, 优选 1.5w/v% 至 4.0w/v%。

[0058] 含源自发酵的埃坡霉素的树脂任选地用水与 20-30% 乙腈水溶液或甲醇水溶液洗涤以除去极性杂质,或用含洗涤剂 and 一定量的胺的溶液洗涤(以碱形式加入到溶液中),其中洗涤剂优选离子型洗涤剂如基于烷基硫酸盐的洗涤剂。选择各成分的量以提高后面的由树脂中获得的埃坡霉素萃取物的质量。一种优选的水洗涤剂使用了 0.5w/v% 十二烷基硫酸钠和 0.5w/v% 氨。在最后的实施方案中,在溶剂萃取之前优选地将树脂用水洗涤一次或多次。

[0059] 优选地将含发酵获得的埃坡霉素用与水相不混溶的(不发生相分离的)溶剂如乙酸乙酯或甲基叔丁基醚(MTBE)萃取以移去吸附在树脂上的埃坡霉素。可用于萃取埃坡霉素 B 的其它溶剂包括正丁醇、乙酸异丙酯、乙酸正丙酯、乙酸正丁酯和乙酸叔丁酯。优选地将富溶剂萃取物浓缩,并将埃坡霉素 B 从浓缩物中结晶。在一实施方案中,将富溶剂用水洗涤,并将水洗涤过的富溶剂浓缩和任选地研磨过滤。当溶剂合适时,如为乙酸乙酯,通过将蒸馏溶剂交换到反溶剂中从而使埃坡霉素 B 结晶出来。换言之,将相对高沸点的第二种溶剂(埃坡霉素 B 基本上不溶于其中)加入到富溶剂中,并将富溶剂蒸发至足以产生结晶。可用真空推进或促进蒸馏。在一实施方案中,将溶剂浓缩并加入适量的反溶剂。适用的反溶剂包括甲苯、己烷和庚烷。可将所得的浆液加热、并冷却至所选择的设定温度以提高产生的晶体的质量。可变化温度以提高晶体的纯度、使粉末减至最少、和产生更快的过滤浆液。对于其它的溶剂,如 MTBE,蒸馏浓缩富溶剂能产生冷却时的有效结晶环境(不使用反溶剂)。优选地将所得的晶体过滤生产初级的埃坡霉素 B。

[0060] 在萃取和最初的结晶过程中埃坡霉素 B 与存在于初始萃取物中的大多数杂质尤其是埃坡霉素 A 分离。初级的埃坡霉素 B 通常含有埃坡霉素 A,它是一种主要杂质。通常还存在由发酵产生的两种其它的结构相似的杂质,即下面的噁唑类似物和乙基噁唑类似物

[0061]



[0062]

噁唑

乙

基噻唑

[0063] 随后使用的本文中描述的用于埃坡霉素 B 纯化的方法（包括再结晶和色谱分离步骤）尤其包括除去这两种化合物至它们的含量不再显著。

[0064] 然后可将初级的埃坡霉素 B（即含甲苯的晶形 epo B，初级），优选按上述方法获得的埃坡霉素 B，通过在乙酸乙酯中加热接着加入甲苯并继续加热再结晶。然后冷却该混合物，将所得的结晶浆液过滤并用甲苯洗涤滤饼得曾经再结晶的埃坡霉素 B（即含甲苯的晶形 epoB，再结晶的）。另外，可将初级的埃坡霉素 B 经实施例描述的制备型高效反相色谱（例如，在 RP/C-18 柱上）步骤处理。任选地，在将埃坡霉素样品装入柱子之前，预先加入一定体积的合适的有机溶剂或有机溶剂的混合物以减少埃坡霉素沉淀。在一实施方案中，有机溶剂为诸如二甲亚砜（DMSO）的有机溶剂。任选地，加入痕量的合适的有机溶剂或有机溶剂的混合物以减少埃坡霉素沉淀。然后用合适的有机溶剂、有机溶剂的混合物或有机溶剂的水溶液洗脱。在一实施方案中，用乙腈和水的混合物洗脱埃坡霉素。例如，使用这类溶剂的洗脱图可以是线性的或梯度的，对其进行选择以获得低的杂质含量。将含埃坡霉素 B 的部分合并、浓缩、并用包括但不限于乙酸乙酯的溶剂萃取。然后将该富溶剂的萃取物浓缩和结晶（例如通过加入低极性溶剂如正庚烷或庚烷），任选地冷却。过滤浆液，用溶剂 / 反溶剂（所选择的比例和量不致溶解大量的埃坡霉素 B）如比例为 2 : 1 的乙酸乙酯 / 正庚烷洗涤。将洗涤过的晶体干燥得高质量的埃坡霉素 B。

[0065] 也可使用其它的提纯方法，例如在正相（如硅土、或以硅土为基础的正相等）色谱分离法。例如，可应用高效正相色谱分离法。可将样品以较低极性的溶剂如二氯甲烷装在柱子上，并用较高极性的溶剂如乙酸乙酯和庚烷的混合物洗脱埃坡霉素。例如，使用这类溶剂的洗脱图可以是线性的或梯度的，对其进行选择以获得低的杂质含量。将该需要的部分合并、浓缩和结晶，例如通过加入低极性溶剂如正庚烷、庚烷或甲苯从乙酸乙酯中结晶。过滤浆液，用溶剂 / 反溶剂（所选择的比例和量不致溶解大量的埃坡霉素 B）如比例为 2 : 1 的乙酸乙酯 / 正庚烷或乙酸乙酯 / 甲苯洗涤。将洗涤过的晶体干燥得高质量的埃坡霉素 B。

[0066] 在某些情况下不需要除去乙基噻唑或噁唑类似物，如在 D1 的合成中，可通过单独结晶纯化埃坡霉素 B。例如，将固体埃坡霉素 B 物溶解在温热的乙酸乙酯中并通过冷却至环境温度或通过冷却器结晶（或再结晶），接着过滤并干燥（例如，在真空中）。可重复结晶以获得所需的纯度，如结晶 2 至 3 次。

[0067] 例如，用于使产埃坡霉素的微生物生长的生长培养基可配制如下：

[0068]

组分	优选 (g/L)	更优选 (g/L)	更更优选 (g/L)
脱脂乳粉	0.5-12	1-8	2-6
烤 Nutrisoy 粉 ¹	0.5-12	1-8	2-6
Tastone- 154 ¹	0.5-12	1-6	1-4
Maltrin-M040 ¹	4-18	6-14	8-12
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2-2.4	0.4-1.6	0.8-1.2
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2-2.4	0.4-1.6	0.8-1.2
EDTA, Fe111, Na 盐	0.002- 0.02	0.004-0.016	0.006- 0.014
HEPES	6-20	8-16	10-14
甘油	0.5-12	1-8	2-6

[0069] ¹ 也可以其它脱脂乳、豆粉、酵母萃取物和 Maltrin 淀粉替换使用取得同等的结果。

[0070] 例如用于使产埃坡霉素的微生物生长和用于生产埃坡霉素的生产培养基,尤其是振摇烧瓶中的培养基,可按上述配方进行配制,只是甘油有如下的差异、以及有下述的树脂的加入:

[0071]

组分	优选 (g/L)	更优选 (g/L)	更更优选 (g/L)
甘油	2-20	4-16	6-14
树脂	10-40	12-35	15-30

[0072] 有效的营养料液,尤其是用于振摇烧瓶中的营养料液,含有:

[0073]

组分	优选 (%)
丙酸钠	2-5
Maltrin-M040	8-12

Tastone-154	2-5
-------------	-----

[0074] 这种营养料液可进一步含如下的磷酸二钠和磷酸一钠的混合物：

[0075]

组分	优选 (%)
磷酸二钠	1.0-2.0
磷酸一钠	0.3-0.7

[0076] 选择磷酸二钠与磷酸一钠的比例以使加料时培养物偏离所需的 pH 的 pH 变化最小。

[0077] 为了在发酵罐中使用,优选地将如上所述的除 HEPES (优选地将 HEPES 除掉) 之外的营养组分与消泡剂 (例如源自 Dow Corning, AFEmulsion, 食品级) 一起使用,消泡剂的加入如下：

[0078]

组分	优选 (g/L)	更优选 (g/L)	更更优选 (g/L)
消泡剂	0.5-5	1-4.5	1.5-4

[0079] 可将苛性碱 (氢氧化钠或氢氧化钾溶液) 加入到发酵培养基中以维持有效的 pH 范围。树脂可加入如下：

[0080]

组分	优选 (g/L)	更优选 (g/L)	更更优选 (g/L)
树脂	10-50	12-45	15-40

[0081] 在生产发酵过程中,优选地将丙酸盐和营养素根据需要分开加入。例如,丙酸盐进料可含 80 至 150g/L 丙酸钠,所加入的最优选的量应将丙酸盐含量维持 (例如,由 HPLC 测定) 在 0.05 至 0.20mg/ml。可在将起始培养物加入到发酵罐 20-40 小时之后开始加入丙酸盐。补充营养素,例如补充下述的无菌原料：

[0082]

组分	优选 (g/L)
Tastone-154	15-25
Maltrin-M040	55-75
消泡剂	0.5-1.5

[0083] 对于较长时期的发酵,优选地加入其它营养素,例如加入下述无菌的原料,与前述的原料相比其加入量较大:

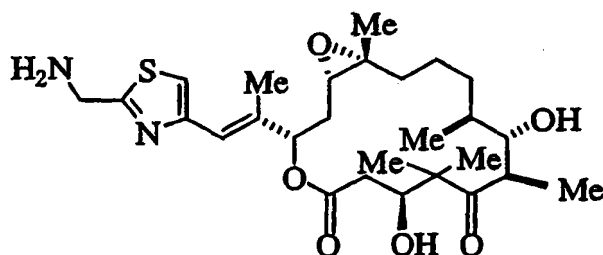
[0084]

组分	优选 (g/L)
脱脂乳粉	40-60
Maltrin-M040	140-180
甘油	60-90
消泡剂	0.5-1.5

[0085] 可对上述两种营养素进行选择以防止引发生长期。

[0086] 本发明包括生产埃坡霉素 B 的方法,其中埃坡霉素 B ("epo B") 被转化为下式的衍生物 1 ("D1") (在美国专利 6,262,094 中有记载,在此引入作为参考):

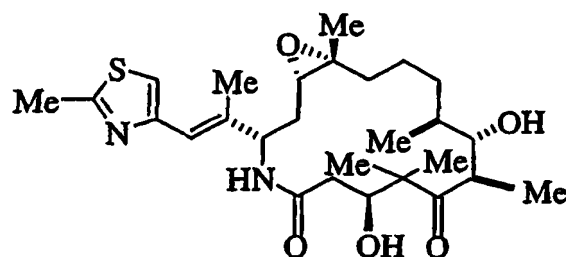
[0087]



[0088] 衍生物 1

[0089] 本发明还包括生产埃坡霉素 B 的方法,其中埃坡霉素 B 被转化为下式的衍生物 2 ("D2") (在 Borzilleri 等, J. Amer. Chem. Soc. 122,8890,2000 和 WO 99/02514 中有记载,在此引入作为参考):

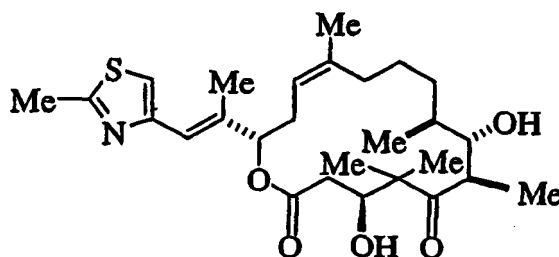
[0090]



[0091] 衍生物 2

[0092] 本发明还包括生产 epothiione B 的方法,其中 epothiione B ("epoB") 被转化为下式的衍生物 3 (埃坡霉素 D, "D3") (在美国专利 6,320,045 中有记载,在此引入作为参考):

[0093]



[0094] 衍生物 3

[0095] 埃坡霉素 B 的晶形

[0096] 申请人还利用本发明的方法和本文中描述的物质已经获得多种埃坡霉素 B 的晶形。利用不同的溶剂和溶剂体系获得了多种埃坡霉素 B 晶体。例如, 申请人已经发现了含甲苯的埃坡霉素 B 溶剂合物晶形, 本文中称为 epoB-To β , 该晶形具有下面的表 1 所报告的晶胞数据。埃坡霉素 B 含甲苯的溶剂合物的晶形进一步用本文中的图 9-12 和图 15 和 16 说明。申请人还利用乙腈 (即 epoB-AN β)、乙酸乙酯 (即 epoB-Ea β)、和异丙醇 (即 epoB-IP β)、以及在下面的实施例中所述的溶剂体系获得了多种埃坡霉素 B 晶体。这些结晶学的异构形式具有单斜晶笼形结构, 其中 P2₁ 晶架群含有亲脂性溶剂通道, 这些通道沿 b 轴贯穿整个晶体 (1 个通道 / 晶胞)。每个通道可容纳最高达两个溶剂分子如甲苯、乙腈、乙酸乙酯、异丙醇、或 MTBE (理想地产生 1 : 1 的埃坡霉素 B 溶剂合物)。从甲苯 / 乙酸乙酯的溶剂混合物 (例如, 1 : 1 混合物) 中结晶导致甲苯优先掺入到笼形结构的通道中 (即, 获得晶形 epoB-TO β , 而不是 epoB-EA β)。埃坡霉素的氢键给体 (羟基) 包含于埃坡霉素间的氢键中, 不能有效地与客溶剂结合, 而是抑制这种结合。

[0097] 晶形 epoB-TO β 、epoB-AN β 、epoB-EA β 和 epoB-IP β 显示出表 1 所示的晶胞数据: 获得这些含甲苯、乙腈、乙酸乙酯和异丙醇的晶形的结晶结晶条件在下面的实施例中给出。利用实施例 7 中描述的方法制备的晶体的 PXRD 图显示在图 9、11 和 13 中, 在下面还作了进一步的描述。

[0098] 制成表的这些晶形的具体示例性的参数如下, 如表 1 所示:

[0099]

晶形	
epoB-TO β	按实施例 8A 的描述从甲苯中结晶
epoB-AN β	按实施例 8B 的描述从乙腈中结晶
epoB-EA β	按实施例 8C 的描述从乙酸乙酯 (ETOAc) 中结晶
epoB-IP β	按实施例 8D 的描述从异丙醇 (IPA) 中结晶

[0100] epoB-AN β 、epoB-EA β 、epoB-IP β 和 epoB-To β 的部分原子坐标分别如表 2、3、4 和 5 所示。图 9、11 和 13 显示的 PXRD 图由下面的表 6、7 和 8 中所列的数据表征。

[0101]

表1

晶胞数据

晶形	T(°C)	a(Å)	b(Å)	c(Å)	B	V	Z	V/Z	sg	d(calc)	R	理想的溶剂晶格点
Epo B-TOβ-33		11.853(1)	10.613(2)	14.328(2)	113.04(1)	1659(1)	2	829	P2 ₁	1.201	0.09	每个epo B 1个甲苯
Epo B-ANβ-40		11.961(1)	10.543(1)	13.601(2)	111.89(1)	1592(1)	2	796	P2 ₁	1.145	0.07	每个epo B 1个乙腈
Epo B-EAβ-33		11.939(1)	10.587(1)	13.882(1)	111.87(1)	1628(1)	2	814	P2 ₁	1.215	0.07	每个epo B 1个EtOAc
EpoB-lpβ-3		11.928(2)	10.610(1)	13.870(2)	111.92(1)	1628(1)	2	814	P2 ₁	1.158	0.09	每个epo B 1个IPA

¹ 计算的理想密度，假设1:1溶剂占有率

[0102] 表 2

[0103] 埃坡霉素 B 乙腈溶剂合物的部分原子坐标 EpoB-ANβ 晶形（大部分氢原子被忽

略)

[0104]	原子	X	Y	Z
[0105]	C1	0.4422	0.2380	0.3076
[0106]	C2	0.5619	0.2882	0.3165
[0107]	C3	0.6422	0.1833	0.3013
[0108]	C4	0.7565	0.2263	0.2807
[0109]	C5	0.8531	0.2847	0.3800
[0110]	C6	0.8409	0.4180	0.4193
[0111]	C7	0.8968	0.4218	0.5419
[0112]	C8	0.8360	0.3345	0.5975
[0113]	C9	0.7205	0.3935	0.6018
[0114]	C10	0.6345	0.2947	0.6184
[0115]	C11	0.5287	0.3609	0.6355
[0116]	C12	0.4328	0.2722	0.6397
[0117]	C13	0.3118	0.2674	0.5573
[0118]	C14	0.2626	0.3435	0.4562
[0119]	C15	0.2748	0.2789	0.3613
[0120]	O16	0.3977	0.3084	0.3684
[0121]	C16	0.7197	0.3194	0.1878
[0122]	C17	0.8080	0.1051	0.2508
[0123]	C18	0.9083	0.5112	0.3717
[0124]	C19	0.9258	0.3048	0.7095
[0125]	C20	0.4763	0.1572	0.7109
[0126]	C21	0.1833	0.3270	0.2580
[0127]	C22	0.1927	0.4656	0.2359
[0128]	C23	0.1008	0.2458	0.1993
[0129]	C24	-0.0043	0.2676	0.1034
[0130]	C25	-0.0708	0.1728	0.0409
[0131]	C26	-0.1519	0.3799	-0.0163
[0132]	C27	-0.2252	0.4942	-0.0664
[0133]	S	-0.1936	0.2297	-0.0595
[0134]	N	-0.0507	0.3873	0.0719
[0135]	O1	0.3897	0.1501	0.2552
[0136]	O2	0.6748	0.1045	0.3926
[0137]	O5	0.9464	0.2278	0.4266
[0138]	O7	0.8893	0.5485	0.5778
[0139]	O12	0.3313	0.3359	0.6550
[0140]	H3	0.5936	0.1283	0.2313
[0141]	H6	0.7466	0.4426	0.3937

[0142]	H7	0.9913	0.3942	0.5683
[0143]	H8	0.8117	0.2471	0.5514
[0144]	H13	0.2618	0.1794	0.5410
[0145]	H15	0.2633	0.1778	0.3662
[0146]	H30	0.6691	0.0154	0.3705
[0147]	H70	0.9636	0.5994	0.5825
[0148]	N27	0.4609	0.5049	0.0188 (乙腈)
[0149]	C28	0.3963	0.4080	0.0038 (乙腈)
[0150]	C29	0.3379	0.2975	-0.0775 (乙腈)

[0151] 表 3

[0152] 埃坡霉素 B 乙酸乙酯溶剂合物的部分原子坐标晶形 EpoB-EA β (大部分氢原子被忽略)

[0153]	原子	X	Y	Z
[0154]	C1	0.4400	0.2438	0.3107
[0155]	C2	0.5605	0.2943	0.3190
[0156]	C3	0.6416	0.1904	0.3056
[0157]	C4	0.7559	0.2327	0.2857
[0158]	C5	0.8532	0.2913	0.3822
[0159]	C6	0.8410	0.4228	0.4212
[0160]	C7	0.8957	0.4275	0.5404
[0161]	C8	0.8319	0.3405	0.5928
[0162]	C9	0.7164	0.4000	0.5966
[0163]	C10	0.6298	0.3042	0.6134
[0164]	C11	0.5231	0.3717	0.6266
[0165]	C12	0.4266	0.2844	0.6321
[0166]	C13	0.3066	0.2780	0.5503
[0167]	C14	0.2581	0.3526	0.4526
[0168]	C15	0.2706	0.2867	0.3589
[0169]	O16	0.3940	0.3148	0.3668
[0170]	C16	0.7203	0.3272	0.1940
[0171]	C17	0.8079	0.1121	0.2559
[0172]	C18	0.9092	0.5160	0.3757
[0173]	C19	0.9227	0.3099	0.7056
[0174]	C20	0.4667	0.1703	0.7040
[0175]	C21	0.1800	0.3335	0.2576
[0176]	C22	0.1887	0.4688	0.2331
[0177]	C23	0.0962	0.2506	0.2011
[0178]	C24	-0.0076	0.2687	0.1042
[0179]	C25	-0.0762	0.1706	0.0472

[0180]	C26	-0.1515	0.3743	-0.0242
[0181]	C27	-0.2158	0.4821	-0.0821
[0182]	S	-0.1923	0.2232	-0.0566
[0183]	N	-0.0487	0.3847	0.0652
[0184]	O1	0.3878	0.1559	0.2575
[0185]	O3	0.6749	0.1137	0.3972
[0186]	O6	0.9464	0.2337	0.4280
[0187]	O7	0.8889	0.5526	0.5755
[0188]	O12	0.3257	0.3484	0.6457
[0189]	H3	0.5927	0.1346	0.2372
[0190]	H6	0.7463	0.4478	0.3947
[0191]	H7	0.9884	0.3992	0.5620
[0192]	H8	0.8080	0.2533	0.5499
[0193]	H13	0.2573	0.1911	0.5357
[0194]	H15	0.2575	0.1863	0.3624
[0195]	H30	0.6713	0.0150	0.3759
[0196]	H70	0.9745	0.5994	0.5930
[0197]	O28	0.5242	0.5794	0.0077 (乙酸乙酯)
[0198]	O31	0.4179	0.4326	0.0063 (乙酸乙酯)
[0199]	C28	0.4731	0.5098	0.0256 (乙酸乙酯)
[0200]	C29	0.4265	0.4705	0.0892 (乙酸乙酯)
[0201]	C31	0.3610	0.3621	-0.0408 (乙酸乙酯)
[0202]	C30	0.2548	0.3272	-0.0460 (乙酸乙酯)

[0203] 表 4

[0204] 埃坡霉素 B, 异丙醇溶剂合物, EpoB-IP β 晶形的部分原子坐标 (大部分氢原子被忽略)

[0205]	原子	X	Y	Z
[0206]	C1	0.4418	0.2548	0.3104
[0207]	C2	0.5609	0.3055	0.3186
[0208]	C3	0.6429	0.2009	0.3049
[0209]	C4	0.7565	0.2462	0.2851
[0210]	C5	0.8541	0.3018	0.3837
[0211]	C6	0.8410	0.4357	0.4229
[0212]	C7	0.8977	0.4390	0.5415
[0213]	C8	0.8345	0.3493	0.5940
[0214]	C9	0.7184	0.4107	0.5972
[0215]	C10	0.6325	0.3111	0.6156
[0216]	C11	0.5261	0.3793	0.6303
[0217]	C12	0.4292	0.2892	0.6329

[0218]	C13	0.3087	0.2842	0.5528	
[0219]	C14	0.2607	0.3630	0.4551	
[0220]	C15	0.2736	0.2932	0.3613	
[0221]	O16	0.3950	0.3241	0.3669	
[0222]	C16	0.7179	0.3380	0.1935	
[0223]	C17	0.8084	0.1250	0.2541	
[0224]	C18	0.9098	0.5290	0.3774	
[0225]	C19	0.9269	0.3222	0.7069	
[0226]	C20	0.4742	0.1736	0.7031	
[0227]	C21	0.1807	0.3387	0.2590	
[0228]	C22	0.1879	0.4780	0.2352	
[0229]	C23	0.1028	0.2530	0.2009	
[0230]	C24	-0.0041	0.2724	0.1029	
[0231]	C25	-0.0678	0.1712	0.0456	
[0232]	C26	-0.1517	0.3781	-0.0198	
[0233]	C27	-0.2289	0.4888	-0.0775	
[0234]	S	-0.1896	0.2262	-0.0575	
[0235]	N	-0.0526	0.3893	0.0653	
[0236]	O1	0.3903	0.1657	0.2594	
[0237]	O3	0.6763	0.1239	0.3954	
[0238]	O5	0.9485	0.2459	0.4293	
[0239]	O7	0.8898	0.5642	0.5781	
[0240]	O12	0.3283	0.3539	0.6476	
[0241]	H3	0.5946	0.1457	0.2365	
[0242]	H6	0.7464	0.4597	0.3977	
[0243]	H7	0.9915	0.4115	0.5668	
[0244]	H8	0.8111	0.2625	0.5504	
[0245]	H13	0.2582	0.1971	0.5380	
[0246]	H15	0.2640	0.1927	0.3679	
[0247]	H30	0.6731	0.0260	0.3733	
[0248]	H70	0.9599	0.6223	0.5696	
[0249]	O28	0.4344	0.2122	0.0495	(异丙醇)
[0250]	C28	0.3601	0.2863	-0.0462	(异丙醇)
[0251]	C30	0.4351	0.3798	-0.0762	(异丙醇)
[0252]	C29	0.2460	0.3279	-0.0487	(异丙醇)
[0253]	表 5				
[0254]	埃坡霉素 B 乙腈溶剂合物的部分原子坐标晶形 EpoB-T0 B, (大部分氢原子被忽略)				
[0255]	原子	X	Y	Z	

[0256]	C1	0.4314	0.2211	0.3158
[0257]	C2	0.5581	0.2739	0.3228
[0258]	C3	0.6395	0.1704	0.3110
[0259]	C4	0.7506	0.2081	0.2888
[0260]	C5	0.8509	0.2746	0.3880
[0261]	C6	0.8414	0.4043	0.4212
[0262]	C7	0.8976	0.4053	0.5382
[0263]	C8	0.8372	0.3234	0.5911
[0264]	C9	0.7204	0.3812	0.5930
[0265]	C10	0.6312	0.2790	0.6075
[0266]	C11	0.5255	0.3494	0.6227
[0267]	C12	0.4302	0.2588	0.6250
[0268]	C13	0.3014	0.2537	0.5473
[0269]	C14	0.2538	0.3361	0.4501
[0270]	C15	0.2643	0.2640	0.3626
[0271]	016	0.3877	0.2964	0.3648
[0272]	C16	0.7158	0.3123	0.2026
[0273]	C17	0.8082	0.0907	0.2610
[0274]	C18	0.9061	0.4961	0.3806
[0275]	C19	0.9323	0.2951	0.6989
[0276]	C20	0.4703	0.1447	0.6945
[0277]	C21	0.1702	0.3170	0.2598
[0278]	C22	0.1709	0.4486	0.2391
[0279]	C23	0.0898	0.2230	0.2030
[0280]	C24	-0.0145	0.2462	0.1060
[0281]	C25	-0.0811	0.1430	0.0546
[0282]	C26	-0.1432	0.3561	-0.0251
[0283]	C27	-0.2089	0.4563	-0.0926
[0284]	S	-0.1987	0.1985	-0.0555
[0285]	N	-0.0507	0.3632	0.0580
[0286]	01	0.3838	0.1303	0.2676
[0287]	03	0.6742	0.0956	0.3983
[0288]	05	0.9468	0.2169	0.4313
[0289]	07	0.8912	0.5329	0.5727
[0290]	012	0.3254	0.3255	0.6408
[0291]	H3	0.5816	0.1062	0.2496
[0292]	H6	0.7457	0.4264	0.3944
[0293]	H7	0.9919	0.3719	0.5628
[0294]	H8	0.8141	0.2297	0.5521

[0295]	H13	0.2871	0.1529	0.5221	
[0296]	H15	0.2567	0.1589	0.3722	
[0297]	H30	0.6633	-0.0002	0.3785	
[0298]	H70	0.9663	0.5756	0.5776	
[0299]	C28	0.4258	0.4317	0.0030	(甲苯)
[0300]	C29	0.3526	0.3996	0.0429	(甲苯)
[0301]	C30	0.2586	0.3239	0.0126	(甲苯)
[0302]	C31	0.2245	0.2386	-0.0713	(甲苯)
[0303]	C32	0.2984	0.2800	-0.1182	(甲苯)
[0304]	C33	0.3923	0.3496	-0.1016	(甲苯)
[0305]	C34	0.5043	0.4979	-0.0119	(甲苯)

[0306] 表 6

[0307] 埃坡霉素 B 含甲苯的溶剂合物的 PXRD 数据, 利用实施例 7 的方法步骤 A 生产如图 9 所示

	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)
[0308]	6.680	13.2212	48.5	20.720	4.2833	4.2
	8.210	10.7604	2.1	21.320	4.1641	1.4
	10.610	8.3312	2.2	21.890	4.0570	6.3
	12.590	7.0251	4.3	24.200	3.6747	3.2
	13.370	6.6169	25.8	24.500	3.6304	4.7
	14.840	5.9646	1.9	24.800	3.5871	14.4
	15.680	5.6469	0.9	26.150	3.4049	4.4
	16.160	5.4802	2.3	26.870	3.3153	4.5
	16.550	5.3520	2.9	28.370	3.1433	4.3
	18.170	4.8783	5.0	29.930	2.9829	2.2
	18.410	4.8152	10.6	30.890	2.8924	2.0
	20.090	4.4162	100.0	31.400	2.8466	2.2

[0309] 表 7

[0310] 埃坡霉素 B 含甲苯的溶剂合物的 PXRD 数据, 利用实施例 7 的方法步骤 B 生产, 如图 11 所示

	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)
[0311]	6.680	13.2212	62.1	20.720	4.2833	9.0
	8.210	10.7604	3.4	21.320	4.1641	4.4
	10.610	8.3312	6.9	21.890	4.0570	21.8
	12.590	7.0251	8.1	24.200	3.6747	10.8
	13.370	6.6169	26.9	24.500	3.6304	9.7
	14.870	5.9526	5.9	24.800	3.5871	18.9
	15.680	5.6469	3.7	26.150	3.4049	12.8
	16.160	5.4802	4.5	26.900	3.3117	4.9
	16.580	5.3424	9.1	28.340	3.1466	7.6
	18.170	4.8783	20.3	29.960	2.9800	5.9
	18.440	4.8075	28.2	30.950	2.8869	5.3
	20.090	4.4162	100.0	31.400	2.8466	4.1

[0312] 表 8

[0313] 埃坡霉素 B 含乙酸乙酯的溶剂合物的 PXRD 数据, 利用实施例 7 的方法步骤 C 生产, 如图 13 所示

	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)	散射角 (度, 2θ)	d-间距 (Å)	相对密度 (%)
[0314]	6.800	12.9881	26.2	20.720	4.2833	100.0
	8.950	12.7082	32.5	22.610	3.9294	25.5
	8.450	10.4553	4.0	24.470	3.6347	8.9
	10.850	8.1474	9.4	24.860	3.5786	13.5
	11.690	7.5638	2.8	25.190	3.5325	7.8
	13.070	6.7681	11.6	26.120	3.4088	5.7
	13.850	6.3887	10.2	26.600	3.3483	5.9
	14.990	5.9053	4.7	27.050	3.2936	3.5
	16.040	5.5210	5.4	27.530	3.2373	5.2
	16.850	5.2574	11.0	28.850	3.0921	6.7
	18.200	4.8703	13.5	29.090	3.0671	6.7
	18.770	4.7237	16.9	30.020	2.9742	4.0
	19.130	4.6356	14.3	30.320	2.9454	4.6
	20.480	4.3330	72.2	30.740	2.9062	5.6
	20.600	4.3080	71.6	31.220	2.8626	6.5

[0315] 定义

[0316] 就本申请而言, 下列术语有如下所述的各自的含义:

[0317] “埃坡霉素 B 比较生产条件。”为了测量埃坡霉素 B 相对于埃坡霉素 A 的生产量, 或菌株之间埃坡霉素 B 的净生产量, 需要标准的条件。埃坡霉素 B 比较生产条件”的含义如下。应当注意标准条件可以按实施例中的描述进行适当地换算 (例如, 按照实施例 2 中的 125mL 生产烧瓶换算):

[0318] 1) F1 阶段:

[0319] 将 1mL 冷冻的小瓶或维持烧瓶转入 125mL 装有约 (ca.) 10mL 培养基 E (如下所述的组合物) 的烧瓶中。将 F1 烧瓶在 30°C 和 160rpm 下保温 3-4 天。

[0320] 2) F2 阶段:

[0321] 将 F1 烧瓶 (约 10mL) 中的全部内容物转入 (10%) 250mL 含 90mL 培养基 E 的烧瓶中。将该 F2 烧瓶同样在 30°C 和 160rpm 下保温 3-4 天。

[0322] 3) 生产阶段:

[0323] 将生产烧瓶 (250mL 装有 90mL 培养基 E 的烧瓶, 参见下面的培养基配方) 以 F2 阶段培养物灌输至 10% 的量 (10mL)。另外, 可以运用 “固定烧瓶”, 这些固定烧瓶由常规烧瓶每 3-4 天移植 5% 至 10% 的量而来。生产阶段掺入至少 15g/L 的树脂。一旦接种, 生产烧瓶就在 30°C 和 160rpm 下保温 14 天。掺入进料以提高埃坡霉素 B/A 的比例。进料从接种后 72 小时开始加入如下:

[0324] 每个生产烧瓶 (100mL 培养物容量) 每天加入 1mL 进料, 从 3-11 天开始, 需要时继续加入直到第 14 天。

[0325] 含丙酸盐的进料装有 10% Maltrin-M040、4% 丙酸钠、和 3% Tastone-154, 这样当按所述方式以 100 倍稀释倍数加入时, 每天在培养肉汤中的最终浓度变成 0.1% Maltrin-M040、0.04% 丙酸钠、和 0.03% Tastone-154 (不包括先前加入的剩余含量)。通

常采集烧瓶用于接种后 14 天的分析。

[0326] “丙酸前体”是指可以有效产生丙酸的量加入到适当的培养物中的任何化合物，其中丙酸的量能有效增加埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例。例如，丙酸可以用不稳定的酯通过细胞的酶作用自然产生。本领域的普通技术人员能识别用于产生丙酸或用于增加埃坡霉素 B 与埃坡霉素 A 的比例易于试验的候选化合物。例子包括丙酸的甲酯和乙酯。

[0327] “进料，”是指将至少一种或多种营养素或添加剂，如丙酸盐、丙酸钠、含丙酸钠的混合物或溶液、维生素、矿物质、碳水化合物源或氨基酸源，在发酵过程期间不只一种场合加入，例如定时地、通过脉动进料、通过基本上连续进料等等。应当理解术语“不只一次加入”的含义包括在整个发酵期间连续进料。

[0328] “含甲苯”是指一种主要含一定量的甲苯溶剂合物，甲苯的量可由本领域的技术人员运用分析技术进行测量，其中含甲苯的溶剂合物可含有也可不含有一种或多种其它溶剂。

[0329] “含乙酸乙酯”是指一种主要含一定量的乙酸乙酯的溶剂合物，乙酸乙酯的量可由本领域的技术人员运用分析技术进行测量，其中含乙酸乙酯的溶剂合物可含有也可不含有一种或多种其它溶剂。

[0330] 实施例

[0331] 以下实施例是使用本领域技术人员公知的和常规的标准技术进行的，除另有详细的说明外。这些实施例是示例性的，但不限制本发明。

[0332] 实施例 1

[0333] 通过突变和选择制备 SC16408 菌株，以及制备细胞库

[0334] SC16408 菌株由亚硝基胍 (NTG) 处理 So ce90B2 菌株 (SC16224)、继之以随机选择而产生。这样，将 SC16224 悬浮在 10mM Tris-HCl 缓冲液中并在 pH8.2 下经受 1mg/mL NTG 处理 60 分钟。用 NTG 处理后，通过菌落选择获得菌落细胞系并试验其埃坡霉素 B 的生产能力、和 B/A 的比例。将分离的菌落转入烧瓶中培养 8-14 天，接着在生长培养基（培养基 E）每隔 3-4 天转移一次：

[0335] 用于振荡烧瓶的生长培养基 E：

[0336]

组分	g/L
脱脂乳粉	4
烤 Nutrisoy 粉	4
Tastone-154	2
Maltrin-M180	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1

EDTA, Fe111, Na 盐	0.008
HEPES	12
甘油	4.3

[0337] 将上述组分加入到蒸馏水中并用 10% NaOH (或 KOH) 将 pH 调至 pH 7.2 后在 121℃ 下灭菌 30 分钟。

[0338] 研究细胞库的制备 : 将 10mL SC16408 菌株的 3 天培养物转入装有 90mL 培养基 E 的 250mL 烧瓶中。然后将烧瓶在 30℃、160rpm 下保温 2 天。在 2 天结束时, 从烧瓶中取出 1.8mL 试样量并转入低温的小瓶中, 然后在 -70℃ 下冷冻。

[0339] 原始细胞库的制备 : 将 2 小瓶源自研究细胞库的培养物解冻并转入装有 10mL 培养基 E 的 2×125mL 的烧瓶中, 然后在 30℃、160rpm 下保温 4-5 天。下一步, 将 2×10mL 培养物转入装有 90mL 培养基 E 的 2×250mL 的烧瓶中, 然后在 30℃、160rpm 下保温 2-4 天。最后, 合并这两个烧瓶并将 1.8mL 试样量转入低温的小瓶中, 并在冷冻箱中于 -70℃ 下贮存。

[0340] 工作细胞库的制备 : 将 5 小瓶源自原始细胞库工作单元库的培养物解冻并转入装有 10mL 培养基 E 的 2×125mL 的烧瓶中, 然后在 30℃、160rpm 下保温 3-6 天。下一步, 将 5×10mL 培养物转入装有 90mL 培养基 E 的 5×250mL 的烧瓶中, 然后在 30℃、160rpm 下保温 2-4 天。用这 5 个烧瓶内的细胞接种装有 90mL 培养基 E 的 12×250mL 烧瓶, 将其再一次在 30℃、160rpm 下保温 2-4 天。最后, 将这些烧瓶一起合并, 并将 1.8mL 试样量转入低温的小瓶中并在冷冻箱中于 -70℃ 下贮存。产生约 500-600 小瓶供工作细胞库之用。

[0341] 实施例 2

[0342] 通过振摇烧瓶发酵培养生产埃坡霉素

[0343] 将来自冷冻小瓶 (1.5mL) 中的细胞接种到 125mL 烧瓶内的 45mL 培养基 E 中并使其在 30℃ 和 160rpm 下生长 4-8 天 (F1 阶段)。然后, 将 5mL F1 阶段的细胞转入装有 45mL 培养基 E 的 125mL 新烧瓶中并使其生长 3-4 天 (F2 阶段)。然后将 F2 阶段的细胞用作埃坡霉素 B 发酵的接种物。将百分之十的接种物 (5.0mL) 转入装有 45mL 生产培养基的 125mL 烧瓶中。然后将这些烧瓶在振荡器 (160rpm) 内于 30℃ 保温 2 周。生产培养基为改良的培养基 E, 其中含 1.6% (0.8g) XAD-16 树脂。用于振摇烧瓶的生产培养基的组合物显示如下 :

[0344] 用于振摇烧瓶的埃坡霉素 B 生产培养基

[0345]

组分	g/L
脱脂乳粉	4
烤 Nutrisoy 粉	4
Tastone-154	2
Maltrin-M040	10

CaCl ₂ • 2H ₂ O	1
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1
EDTA, Fe111, Na 盐	0.008
HEPES	12
甘油	10
XAD-16resin	16

[0346] 将上述组分溶解于蒸馏水中并用 10% NaOH(或 KOH) 将 pH 调至 pH7.2 后在 121℃ 下灭菌 30 分钟。

[0347] 用于振摇烧瓶埃坡霉素 B 发酵的料液组合为 4% 丙酸钠、10% Maltrin-M040 和 3% Tastone-154。将进料(100mL 在 250mL 烧瓶中)用 NaOH 调至 pH6.8-7.0 并于 121℃ 下灭菌 30 分钟。从接种后第 3 天到第 14 天,每天向每个发酵烧瓶中加入 0.5mL 料液。另外,还发现双倍进料并在第 3、5、7 和 10 天加入时可取得同样的结果。也可通过以下方式取得改进的结果:通过用磷酸盐(以 1.5% 磷酸二钠和 0.5% 磷酸一钠的形式)进一步补充上述料液,这样当进入培养基中稀释 100 倍时,最终含量分别为 0.015% 和 0.005%,排除先前加入的剩余含量。加入磷酸盐的增加的优点是不需进行 pH 调节。另外通过补充磷酸盐可提高产率(对于埃坡霉素 B)达到 10-20%。

[0348] 至于埃坡霉素的分析,采集树脂样品(0.8g)并通过 HPLC 分析。在第 14 天振摇烧瓶中的埃坡霉素产物能产生以下的滴度:

[0349] 埃坡霉素 A :5.0-7.0mg/g 树脂

[0350] 埃坡霉素 B :8.0-12.0mg/g 树脂

[0351] B/A 比例 :1.1-2.0

[0352] 与先前的菌株相比,SC16408 培养显然在振摇烧瓶中产生更多的埃坡霉素 B。

[0353] 实施例 3

[0354] 在 14L 发酵罐中培养生产埃坡霉素

[0355]

F1 阶段	将取自两个冷冻小瓶中的 3.0mL 等分试样接种到 250mL 烧瓶内的 90mL 培养基 E 中并使其在 30℃ 和 160rpm 下生长 4-8 小时。
F2 阶段	将 20mL(10%)F1 阶段的细胞转入 500mL 烧瓶内的 180mL 培养基 E 中并在 30℃ 和 160rpm 下保温 2-4 天。
F3 阶段	重复 F2 阶段步骤以增加接种物数量。将 20mLF2 阶段的接种物转入各装有 180mL 培养基 E 的 6-8×500mL 烧瓶中并在 30℃ 和 160rpm 下保温 2-4 天。

F4 阶段	将 120mL(10%)F3 阶段的培养物转入 4L 抽气瓶内的 1080mL 培养基 E 中,然后在 30℃和 160rpm 下保温 2-4 天。
-------	--

[0356] 利用培养基 E 形成用于 14L 发酵罐的接种物。振摇烧瓶和抽气瓶阶段的高压灭菌时间分别是 30 和 60 分钟。至于发酵罐,将生产培养基在 121℃下灭菌 60 分钟。14L 发酵罐生产培养基为改良的振摇烧瓶生产培养基(如上所述),其中 HEPES 已经被除掉并加入了 2.5g/L 的消泡剂(Antifoam AF,来自 Dow Corning)。在 14L 发酵罐中配制六升生产培养基(pH 调至 7.2-7.4)并灭菌。下表对 14L 发酵罐规模的过程参数进行了汇总:

[0357] 实验台的最高发酵罐工艺参数:

[0358]

	F1 至 F4	14L
温度	30℃	32℃
压力		10psi
气流		0.25vvm
pH		7.2-7.4
DO		20-40%
叶轮直径(英寸)		3.3-4.2
端速(m/s)		1.3-2.2
进端灭菌时间		60min
培养基灭菌时间	30min	60min
树脂		15-30g/L

[0359]

营养物进料组合物:	在 5L 的瓶内配制含 4.1% Maltrin-M040 和 1.3% Tastone-154 的溶液。将进料在 121℃下灭菌 60 分钟。
营养物进料速度:	进料速度为 6mL/小时。
丙酸钠进料:	将 5.0%丙酸钠(1.5L 在 2L 的瓶内)在 121℃下灭菌 60 分钟。

丙酸钠进料速度：	从 24-48 小时开始至结束, 2Ml/ 小时。调整进料速度以将丙酸钠浓度维持在 0.05-0.2mg/mL 之间 (HPLC 分析)。
----------	---

[0360] 14L 发酵罐内的埃坡霉素 B 滴度范围总结如下：

[0361] 埃坡霉素 B 滴度, mg/g 树脂 B/A 比例

[0362] 5-12 1.0-3.0

[0363] 实施例 4

[0364] 埃坡霉素的生产方法

[0365] 50L 发酵罐接种期：

[0366] 对于F1阶段,配制培养基E(2L)并将其分配到17个单独的250mL烧瓶中,各90mL。然后将烧瓶在121℃下通过高压灭菌法灭菌30分钟。将来自一个冷冻小瓶中的细胞接种到每个烧瓶中并使其在大约在约30℃和160rpm下生长4-8天。

[0367] 对于 F2 阶段, 配制 27L 的培养基 E 并将其分配到 17 个单独的 4L 烧瓶中, 各 1.5L, 然后按上述方法灭菌。用来自 F1 阶段的烧瓶中的全部内容物接种每个 4L 烧瓶, 然后使其在约 30°C 和 160rpm 下生长 2-4 天。

[0368] 对于 F3 阶段, 配制 80L 的培养基 E 并分到两个 50L 不锈钢的种发酵罐中, 每个 50L 发酵罐用来自 F2 阶段的三个 4L 烧瓶中的内容物接种。使这些 50L 的发酵罐在 30-33℃ 下生长 2-4 天, 然后合并并用于接种 800L 的发酵罐。

[0369] 培养基 E* 是：

[0370]

组分	g/L
脱脂乳粉 (或豆蛋白浓度)	5
烤 Nutrisoy 粉	5
Tastone-154	2.5
Maltrin-M040	12.3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2
EDTA, FeIII, Na 盐	0.012
甘油	5.4
消泡剂	2.5

[0371] 800L 的发酵罐接种期：

[0372] 使接种物在 800L 的不锈钢发酵罐中生长直到细胞群足以接种下一个接种期 (5,000L 发酵罐)。

[0373] 将这批培养基 E* 转入去离子水 (400L) 中配制并将该混合物, pH8.7-8.9, 在 17 磅/平方英寸、124℃ 下灭菌 60 分钟。将培养基从杀菌器转移到 800L 的发酵罐中, 并将 pH 调至 pH7.1-7.3。然后用 80L 来自 F3 阶段培养物接种该发酵罐。该批在以下控制设定值下进行:

[0374]	压力:	8-12 psig	气流:	0.5-0.7 vvm
	温度:	30-33°C	pH:	7.1 - 7.3
	搅拌器轴转速:	50-60 rpm		

[0375] 根据需要, 加入苛性碱 (氢氧化钠或氢氧化钾溶液) 使 pH 从无菌的补充物到维持在 7.1-7.3 范围内。每隔一段时间对该批取样并分析其无菌状态、pH、沉积以及葡萄糖浓缩。并监测出口气 CO₂ 和 O₂。在大约 48-60 小时, 当葡萄糖浓缩开始下降时, 将 800L 发酵罐 (大约 440-480L) 中的内容物转入 5,000L 的发酵罐中。

[0376] 5,000L 的发酵罐接种期:

[0377] 在此阶段接种物的处理中使用 5,000L 的不锈钢发酵罐。使接种物在该发酵罐中生长直到细胞群足以接种 40,000L 的生产发酵罐。

[0378] 将按上述方法制备的培养基 E (转入到去离子水中, 2,600L) 转入 5,000L 的发酵罐中, 然后用大约 440-480L 来自 800L 的发酵罐中的接种物接种。该批在调控设定值下进行并进行如上所述的监测。再将 pH 维持在 7.1-7.3 的范围内。在约 48-72 小时, 当葡萄糖浓缩开始下降时, 将 5,000L 发酵罐中的内容物转入 40,000L 的发酵罐中。

[0379] 40,000L 的发酵罐生产阶段:

[0380] 在该埃坡霉素的生产阶段中使用 40,000L 的不锈钢发酵罐。一旦将发酵罐灭菌和装入无菌培养基后, 就用在 5,000L 发酵罐中制备的接种物接种。一旦达到特定的生产参数, 就采集生产发酵罐中的内容物。

[0381] 用于生产发酵罐的培养基分为两部分灭菌。将树脂加入到 2,800L 的水中并将该混合物在 17 磅/平方英寸、124℃ 下灭菌 75 分钟:

[0382]

组分	量
洗过的 XAD-16 树脂	15-40g/L

[0383] 为获得 18,000L 的培养基, 将下列组分加入到去离子水 (15,000L) 中并将 pH 调至 7.1-7.3。培养基在连续式杀菌机于 150℃ 下灭菌 (持续时间 100 秒, 出口温度 60℃):

[0384]

组分	重量 (kg)

脱脂乳粉	130
烤 Nutrisoy 粉	130
Tastone-154	65
Maltrin-M040	238
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21.6
EDTA, FeIII, Na 盐	0.22
甘油	216
消泡剂	54

[0385] 将培养基和树脂转入生产发酵罐中,然后用约 3,100L 来自 5,000L 的发酵罐中的接种物接种。将该批在如上所述的控制设定值下进行,除气流为 0.2-0.4wm 外。根据需要,用苛性碱上调 pH(在 0 和 80 小时之间)。在 80 小时之后,用硫酸下调 pH。根据需要,用消泡剂调节起泡。至少一天一次对该发酵罐取样分析其无菌状态、pH、沉积、葡萄糖、丙酸盐和埃坡霉素 B 的浓度。监测并记录出口气的 CO_2 。在大约 30-60 小时时开始进料,一直到 CO_2 不低于 0.3%。

[0386] 用 1.9L/注(范围为 1.5-3.0)的注料量给发酵罐供给丙酸钠(102g/L)。注料的时间间隔开始时为 60 分钟,每隔 12 小时递减,至最短的 12 分钟。将丙酸盐加入到 2,800L 的去离子水中并将该溶液在 17 磅/平方英寸、124℃下灭菌 75 分钟。在优选的实施方案中,丙酸钠进料与含其它培养基组分的进料分开。

[0387] 给该发酵罐进料 Maltrin-M040 和 Tastone-154,注料量为 14.5L。注料的时间间隔开始时为 60 分钟,在 104 小时时变化到 40 分钟。将各组分加入到去离子水(3,000L)中并在 17 磅/平方英寸、124℃下灭菌 75 分钟。进料含:

[0388]

组分	g/L
Tastone-154	20
Maltrin-M040	66
消泡剂	1.0

[0389] 在该过程中,一些培养基组分如脱脂奶粉、Maltrin-M040 和甘油被耗尽。在大约 115 小时开始,先前的进料被中止,将下述混合物以 14.5L 的注料量每隔 40 分钟加入到生产发酵罐中。将各组分加入到去离子水(3,000L)中,并将该混合物,pH8.7-8.9,在 17 磅/平方英寸、124℃下灭菌 75 分钟。

[0390]

组分	g/L
脱脂乳粉	49
Maltrin-M040	154
Tastone-154	20
甘油	78
消泡剂	1.6

[0391] 当达到所需的埃坡霉素 B 的浓度时（通常在 9-21 天之后），采集容器中的内容物。埃坡霉素 B 滴度在大约 5-24mg/g 树脂之间变化，B/A 比例大约为 1.5-4。

[0392] 实施例 5

[0393] 用 MTBE 从 XAD-16 树脂中萃取埃坡霉素 B 并结晶得到固体埃坡霉素 B；用反相色谱分离纯化；最后分离高质量的埃坡霉素 B

[0394] 将所收集的并水洗过的含埃坡霉素（大约 5.03kg 埃坡霉素 B）的 XAD-16 树脂（大约 550kg）与甲醇的水溶液混合并以浆液的形式装入萃取柱。将该填充的树脂用甲醇的水溶液（先用 30% MeOH 然后用 50% MeOH 各 1 柱床体积）洗涤以除去不必要的高极性物质。用 MTBE 洗涤（大约 4 柱床体积）脱掉埃坡霉素。收集富洗脱液并研磨过滤。在重力沉降除去任何水相之后，浓缩富 MTBE 液。重力沉降浓缩液，移去水相，向该批中另外加入 MTBE（2 柱床体积）。将该批再浓缩至大约每升 5 至 15g 埃坡霉素 B 的浓度。通过 5-6 小时逐渐冷却至约 0℃ 使该批结晶。将结晶固体过滤、洗涤并干燥。将所得的产物滤饼溶解于温热的乙酸乙酯中并研磨过滤。将富滤液在真空下浓缩至大约每升 20 至 45g 埃坡霉素 B 的浓度。加热至 70℃ 后，然后将该批缓慢冷却至大约 0℃ 得到结晶浆液，将结晶浆液过滤、用冷的 EtOAc 洗涤、并在低于 40℃ 下干燥得到分离的再结晶的埃坡霉素 B（以树脂中的量计产率为 84%）。然后将该产物通过反相色谱分离法纯化。

[0395] 将填充有反相固定载体 RP/C-18 的色谱柱（11cm 直径 × 40cm 层床长度）用乙腈的水溶液（30-50% v/v）平衡。将再结晶的产物溶解于二甲亚砜（DMSO，每公斤 1-1.5L），过滤该混合物以除去不溶物，然后装在柱子上，装柱前先加入等份的 100% DMSO，追加等体积的 DMSO 以减少在含水流动相加入时样品的沉淀。使用乙腈的水溶液（30-50% v/v）从柱中洗脱样品，并通过 UV 检测器在 290nm 处监测流出物。收集若干部分的埃坡霉素 B 产物峰。以 HPLC 分析各部份的埃坡霉素 A 和 B 及其它相关的杂质。

[0396] 将所需的合并柱部份装入蒸馏箱，并将该批在低于 40℃ 的温度下真空浓缩以除去乙腈。将产生的水相用乙酸乙酯萃取高达三次，并将该有机溶液在低于 40℃ 的温度下真空浓缩得到浓度为 0.1 至 0.2g/mL 的埃坡霉素 B。在 40℃ 下向该批中加入正庚烷（或庚烷），然后将该批缓慢冷却到 2 至 -10℃ 并维持至少 2 小时。过滤结晶浆液并用乙酸乙酯 / 正庚烷溶液洗涤，然后将最终的埃坡霉素 B 滤饼在 35-40℃ 下真空干燥得到 3.367kg，效能为 91.7%，相当于 3.09kg 的埃坡霉素 B 活性。从树脂中得到的产率为 61.4%。HPLC 显示埃

埃坡霉素 B 占面积的 99.6%、埃坡霉素 A 占面积的 0.4%，没有面积 > 0.1% 的其它杂质。

[0397] 实施例 6

[0398] 用乙酸乙酯从 XAD-16 树脂中萃取埃坡霉素 B 并用甲苯作为反溶剂结晶得到固体埃坡霉素 B；用反相色谱法分离纯化；最后分离出高质量的埃坡霉素 B

[0399] 在振动筛 (SWECO TM) 上用水洗涤含埃坡霉素 B 的 XAD-16 树脂以净化该树脂。将该树脂的一部分（大约 6.6L，含 15.6g 埃坡霉素 B，经检测每克树脂 2.36mg 埃坡霉素 B）使用大约 5L 的水转入 20L 的容器中以用水冲洗该树脂。然后将乙酸乙酯（大约 2 柱床体积 (BV) 的进料树脂）加入到容器中。将浆液搅拌约一小时，并使用 600mL 螺帽离心容器在 3,500rpm 下离心 5 分钟以分层。倾出第一份富乙酸乙酯的上清液，并测量其体积。接下来，将倾斜的含多水树脂的底层在容器中合并并向该容器中加入乙酸乙酯 (2BV)。将该浆液搅拌约 1 小时然后离心分层。倾出第二份富乙酸乙酯的上清液，并测量其体积。

[0400] 然后将水（~ 0.3BV 进料树脂）加入到合并的第一份和第二份富乙酸乙酯馏份中并搅拌大约 5 分钟。让各层静置大约 30 分钟。接下来，下面的水层与上面的富乙酸乙酯层分离。将洗涤过的富乙酸乙酯层在低于 45℃ 的温度下浓缩至浓度为大约每升 10g 的埃坡霉素活度。然后将浓缩的富乙酸乙酯溶液研磨过滤并浓缩至 20-25g/L 的埃坡霉素 B。

[0401] 浓缩后，加入甲苯并利用真空在低于 50℃ 下再浓缩至加入甲苯之前该批的体积。使该批经大约 1 小时冷却至约 18℃，然后在此温度下搅拌大约 16 小时以得到产物晶体。接下来，将该批结晶过滤并用甲苯（~ 0.2BV）洗涤，干燥所得的固体得大约 30.4g 含 13.5g 埃坡霉素 B 活度的固体。从起始树脂中计算活性产率为 87%。

[0402] 将利用以上处理从树脂中萃取的固体埃坡霉素 B 以反相色谱法进行纯化。柱子 (Phenomenex Luna, 15, C18 (2), 5.0cm × 25cm, 柱 BV 400mL) 用 3BV 的 40% (v/v) 乙腈 - 水预平衡。将大约 4-6g 的固体埃坡霉素 B 在约 40℃ 下溶解于大约 6mL 的 DMSO 中，然后将混合物经滤膜过滤以除去微粒。将大约 1.5mL 的 DMSO 注入到样品环中以防止埃坡霉素在管中沉淀。然后富含埃坡霉素的滤液注入到样品环注入之后，用约 0.5mL 的 DMSO 洗涤埃坡霉素滤液容器并随之注入约 1mL 的 DMSO 到样品环中。注入埃坡霉素样品后注射 DMSO 可防止在管中产生沉淀。以大约 5mL/ 分钟的流速将样品环的内容物装在柱上。

[0403] 将埃坡霉素装在柱上后，然后向柱中泵入 40% 乙腈水溶液。3-4 分钟后，流速增至大约 60mL/ 分钟。收集若干部分的埃坡霉素 A 和 B 峰。含富含埃坡霉素 B 的部份一般在 2.5L 和 3.25L 洗脱体积之间的馏分中获得（通常埃坡霉素 B 峰在约 6 和 8 柱床体积之间流出）。该合并的部份的体积为大约 0.75L。埃坡霉素 B 峰几乎达到基线（< 10% 的峰高）后向柱中泵入 100% 乙腈。当色谱显示在 290nm 处的吸收基本上回到基线时，向柱中泵入 40% 乙腈 - 水溶液再平衡该柱以进行下一次色谱。通常使用 2BV 的 100% 乙腈和 3BV 40% 乙腈洗涤和再平衡柱子。

[0404] 利用 HPLC 分析对各部份进行分析以测定纯度，并将所需要的部份合并。通常产率为 90-98%。

[0405] 将合并的埃坡霉素 B 部份在低于 0℃ 下真空浓缩至大约 50% 的初始体积。该浓缩部份用乙酸乙酯萃取两次。将合并的乙酸乙酯 extracts 在约 40℃ 的浴温下浓缩至大约 0.1g/mL 埃坡霉素 B。在约 15 分钟内边搅拌边加入正庚烷（或庚烷）（使用一定量的 50% 乙酸乙酯溶液）。将萃取物冷却至 5℃ 并在该温度下保持至少 2 小时。将产物晶体过滤并用

1 : 2 (v : v) 的正庚烷 : 乙酸乙酯溶液洗涤。最后, 将晶体在约 40℃ 下真空干燥大约 12 小时。HPLC 显示各批中埃坡霉素 B 占面积的 99.5–99.7%, 埃坡霉素 A 占面积的 0.3–0.5%。

[0406] 实施例 7

[0407] 用乙酸乙酯从 XAD-16 树脂中萃取埃坡霉素 B 并用甲苯作为反溶剂结晶, 继之以重结晶得到初级的埃坡霉素 B; 用正相色谱法分离纯化; 最后分离出高质量的埃坡霉素 B

[0408] 步骤 A, 使用 EtOAc 萃取 – 甲苯结晶制备初级的埃坡霉素 B:

[0409] 将水洗过的富含埃坡霉素 B 的树脂 (1350g) 装在柱上。用水 (2700mL) 装柱和冲洗柱子。以 9450mL (7 柱床体积) 的乙酸乙酯过柱洗脱活性的埃坡霉素。让乙酸乙酯洗脱液沉降至少一小时。除去棕褐色水层和乳剂层。将富乙酸乙酯溶液在真空下浓缩至目标浓度为大约每升 20g 埃坡霉素 B。让浓缩液静置 2 小时并冷却至 20℃。将冷却了的浓缩液研磨过滤, 并用乙酸乙酯 (36mL) 洗涤过滤器。将合并的滤液和冲洗液浓缩至大约每升 80g 埃坡霉素 B 并加热至 65℃。加入等体积的甲苯, 搅拌 10–15 分钟以上, 同时将温度保持在 60℃ 以上。将温度维持在 65℃ 30 分钟, 接着在 1.5 小时内降温至 40℃, 然后在 2 小时内降温至 1℃。将产生的结晶浆液在 1℃ 下搅拌至少 60 分钟。滤出固体物并用甲苯 (浆液体积的 20%) 洗涤。(在该方法的多次重复中, 母液通常含 2–6% 的进料的埃坡霉素 B 活度)。在烘箱中于 40–45℃ 下将固体物真空干燥至少 4 小时。另外, 也可以在烘箱中在 40℃ 和室温之间的温度下将固体物真空干燥至少 4 小时。

[0410] 该干燥的原始的埃坡霉素 B 滤饼的重量范围在 8.4 至 20g 之间, 埃坡霉素 B 效能范围在 650 至 713 μ g/mg 之间。滤饼中还含有 12% 至 26% 的埃坡霉素 A (面积百分比)。残留溶剂含 0.7% (w/w) EtOAc 和 13% (w/w) 甲苯。

[0411] 对于 5 批的计算如下:

[0412]

进料重 (g)	分析 (g epo B/Kg)	epo B 进料 (g)	原始滤饼中 的 Epo B (g)	%回收率
1327–1391	4.4–12.2	6.0–16.5	5.5–13.6	87–98

[0413] 分离过程中总损失平均为 9.4%。对于原始滤饼从树脂中得到的埃坡霉素 A 峰相对于埃坡霉素 B 峰的百分比平均从 49% 降至 19%。在此步骤所述的方法之后得到的晶体溶剂合物的 PXRD 图和热分析分别显示在图 9 和 10 中。图 9 的 PXRD 图进一步由上面的表 6 报告的数据表征。

[0414] 步骤 B, 埃坡霉素 B 的再结晶:

[0415] 将 EtOAc (0.14L) 加入到 15g 初级的埃坡霉素 B (710 μ g/mg) 中并边搅拌边加热到 65–68℃。(埃坡霉素 B 的目标浓度为每升 75–80g 活度)。在 20 分钟内将甲苯 (0.14L) 加入同时将温度维持在 60℃ 以上。将产生的浆液保持在 65℃ 下 0.25 小时至 1 小时。然后将该批在 3 小时内冷却至 40℃。将该批在 2 小时内继续冷却至 0–2℃。然后将该批保持在 0–2℃ 下 12 小时。然后过滤所得的结晶浆液并用甲苯 (2×0.028L) 洗涤滤饼。通常, 不到 3% 的进料埃坡霉素 B 活度损失到合并的母液和冲洗液中。在真空烘箱中于 42℃ 和 29 英寸 Hg 的压力下将滤饼干燥 2 小时。另外, 也可以在真空烘箱中在 40℃ 和室温之间的温度和 29

英寸的压力下将滤饼真空干燥 2 小时。该干燥的滤饼重量为 13.6g, 效能为 764 μ g/mg。残留的溶剂包括 EtOAc (0.9wt%) 和甲苯 (13.2%)。通常, EtOAc 和甲苯以 13-14wt% 的总含量存在。再结晶的滤饼的埃坡霉素 A 峰相对于埃坡霉素 B 峰的面积百分比降至平均 6.9%。

[0416] 在此步骤所述的方法之后得到的晶体溶剂合物的 PXRD 图和热分析分别显示在图 11 和 12 中。图 11 的 PXRD 图进一步由上面的表 7 报告的数据表征。

[0417] 正相色谱分离:

[0418] 配制下列流动相:

[0419] 20% (v/v) 乙酸乙酯 / 正庚烷溶液 (~ 10L),

[0420] 40% 乙酸乙酯 / 正庚烷 (~ 10L), 和

[0421] 100% 乙酸乙酯 (~ 10L)。

[0422] 安装以下设备:

[0423] Waters Delta Prep 4000 ;检测器 :UV 定在 290nm ;柱 :Phenomenex Luna, 10 微米, 硅土 (2), 5.0cm $\times$ 25cm (柱体积 ~ 490mL)。

[0424] 在注射埃坡霉素溶液之前用 3 柱床体积的 20% (v/v) 乙酸乙酯 / 正庚烷溶液平衡柱子。

[0425] 将埃坡霉素 B 滤饼 (5.5g) 溶解于 55mL 的二氯甲烷中。将该批通过 1 微米的 PTFE 滤膜过滤以除去任何可能存在的微粒。用二氯甲烷 (2-5mL) 冲洗该滤膜。将富二氯甲烷滤液注入柱中, 最初的 30 秒内的初始流速为 5mL/ 分钟, 接着将流速增至 20mL/ 分钟直到样品完全装上。用二氯甲烷 (2-5mL) 冲洗含埃坡霉素滤液的容器, 将冲洗液也输入柱中。

[0426] 用 20% EtOAc/ 庚烷开始洗脱, 同时将流速增加至 118mL/ 分钟。在流速达到 118mL/ 分钟之后, 运用泵程序控制器运行期望的的泵程序。应用下述泵程序:

			% 乙酸乙酯/庚烷			体积	柱床体积
	时间	流速 (mL/min)	A	B	C	mL	BV
[0427]	0	118	20				
	7.5	118	20			897	1.83
	7.6	118		40			
	45.6	118		40		4496	9.18
	45.7	150			100		
	69.3	150			100	3555	7.26
	69.4	150	20				
	85.7	150	20			2460	5.02
	85.8	0	20				

[0428] 收集各部份洗脱液并用 HPLC 分析纯度。

[0429] 在 5 批中, 所收集的部份中埃坡霉素 B 的面积百分比为 99.59-99.93%, 产率平均为 91%。

[0430] 任选地, 类似地应用等浓度的 40% 乙酸乙酯 / 正庚烷洗脱步骤、类似的 100% 乙酸乙酯冲洗柱步骤继之以 40% 乙酸乙酯再平衡进行色谱分离。使用同样的色谱分离设备, 其中使用直径较小的柱 1.0cm $\times$ 25cm。在中心馏份中埃坡霉素 B 的色谱分离产率为 86% 且所

收集的部份中埃坡霉素 B 的面积百分比为 99.4%。上述等浓度方法还可在 11cm 轴向压缩柱上进行,其中中心馏份中洗脱的 epo B 为 31-35gm,色谱的产率为 90-94%。所收集的中心馏份中埃坡霉素 B 的面积百分比为 99.6-99.9%。柱子可重复行使多次。

[0431] 步骤 C,最后的结晶:

[0432] 将需要的中心部馏份合并得到 1.62-1.73L 的批量体积。在 40-45℃ 下真空除去溶剂。目标蒸馏体积为 25-28mL (埃坡霉素 B 的浓度为大约 200-210g/L)。向浓缩液中加入温热的 (大约 40℃) 庚烷 (50mL)。另外,也可以在此步骤将温热的 (约 40℃) EtOAc (50mL) 加入到浓缩液中。将产生的浆液在约 40℃ 下搅拌约 2 小时,然后在约 5 小时内冷却至约 0℃ 并在约 0℃ 下再搅拌至少 5 小时。在整个结晶期间应用中等速度的机械搅拌。将结晶浆液过滤并用冷的 1:1 EtOAc/庚烷 (25mL) 洗涤。在真空烘箱中于 40-45℃ 下将固体物干燥 5-6 小时。另外,也可以在真空烘箱中在 40℃ 和室温之间的温度下将固体物干燥 5-6 小时。自再结晶的 (一次) 埃坡霉素 B 分离得到的埃坡霉素 B 的重量 (对于 5 批) 为大约 4.2-5.0g (83.5-85.6% 活度产率),其 HPLC 纯度为 99.78 至 99.93% 面积百分比 (平均 99.80%)。对于色谱分离的埃坡霉素 B 活度进料而言损失到母液中的埃坡霉素 B 为大约 4%。滤饼中残留的溶剂为 EtOAc (5.8-6.0% w/w) 和庚烷 (0.6-0.7% v/v)。最终的埃坡霉素 B 滤饼的效能范围为 91.5 至 92.7% w/w。HPLC 纯度在 99.7 面积百分比以上。使用此步骤所述的方法得到的晶体溶剂合物的 PXRD 图和热分析分别显示在图 13 和 14 中。从图 14 可以看出,按照上述操作制备和干燥所得的乙酸乙酯溶剂合物的熔点为约 102℃。图 13 的 PXRD 图进一步由上面的表 8 报告的数据表征。

[0433] 另外,也可以将合并的含 4.83Kg Epo B 中心馏份 (1790L) 在 < 30℃ 下真空浓缩至目标浓度为 200-210g/L,然后加入正庚烷 (60kg)。重复该浓缩操作然后另外加入 60kg 庚烷。将浆液在三小时内冷却至 20℃,然后收集并用 30Kg 庚烷洗涤。将所得固体物在真空下于 20-36℃ 干燥 16 小时。总共获得 5.141Kg 固体,其 HPLC 纯度 > 99.6 面积%。滤饼中的残留溶剂为 10.6% 乙酸乙酯和 1.4% 庚烷。

[0434] 实施例 7A

[0435] 从树脂中萃取埃坡霉素 B,接着重复再结晶

[0436] 将水洗过的含估计量 4.10Kg 埃坡霉素 B 活度 (面积%:埃坡霉素 B = 58.0%;埃坡霉素 A = 29.2%) 富含埃坡霉素的树脂 (549.8kg) 用水匀浆并装柱 (700L)。排去柱中液体并用氮气吹柱。然后用乙酸乙酯 (2969Kg) 洗脱,以每小时 ~ 1 柱床体积的速率通过柱子,总共 ~ 6 柱床体积。让合并的富含乙酸乙酯的洗脱液重力沉降 ~ 1 小时,然后除去下层的水相。然后将富乙酸乙酯浓缩至 ~ 574kg。然后将浓缩的富乙酸乙酯在研磨过滤之前于 ~ 20℃ 下静置 ~ 2 天。将滤膜和管道用乙酸乙酯 (总共 ~ 115kg) 洗涤。然后将研磨滤液和冲洗液浓缩至体积为 ~ 64L,然后温热至 ~ 65℃。然后边搅拌边加入等体积温热的甲苯并将所得物保持在 ~ 65℃ 下 ~ 30 分钟。然后将该批在 ~ 4 小时内缓慢冷却至 ~ 40℃,接着在 ~ 2.5 小时内冷却至 0℃。然后将冷浆液在 ~ 0℃ 下保持 ~ 1 小时。然后过滤所得的结晶浆液并用甲苯 (~ 64L) 洗涤滤饼。将产生的滤饼在真空下略微干燥,然后用温热的乙酸乙酯 (200kg) 从过滤干燥装置将其再溶解。

[0437] 类似地通过将富乙酸乙酯浓缩至 ~ 65L 进行第一次再结晶。在温热至 65℃ 之后边搅拌边加入等体积的甲苯并将所得物保持在 ~ 65℃ 下 ~ 30 分钟。类似地按照上述方法进行

该批冷却,并使用上述同样的操作和设备过滤和洗涤所产生着结晶浆液。

[0438] 如上所述再进行两次类似的再结晶得到埃坡霉素 B 结晶滤饼 (4.384Kg) (81.5% w/w) (3.573kg 埃坡霉素 B) (HPLC 面积%:埃坡霉素 B = 97.18 ;埃坡霉素 A = 1.40 ;埃坡霉素 F = 0.30 ;噁唑类似物 = 0.30 和乙基噁唑类似物 = 0.56)。没有可检测的 (> HPLC 0.1 面积%) 别的杂质。产物中含 13.8% w/w 甲苯和 0.8% w/w 乙酸乙酯。从树脂到分离纯化的埃坡霉素 B 总活度产率为 87%。

[0439] 实施例 7B

[0440] 从母液流回收 Epo B

[0441] 将 MTBE 或 EtOAc 萃取物 Epo B 结晶后的母液合并,母液每升溶液中含 2.2g Epo B 和 4.8g Epo A。在 50℃下将十升该溶液真空浓缩至浓度为每升 11-15g Epo B。加入 1 体积的甲苯开始形成固体物;继续蒸馏直至达到 11-15g Epo B/L 的浓度。再加入 1 体积的甲苯,并将蒸馏再重复一次至达到 11-15g Epo B/L。在 1 小时内将浆液冷却至室温,然后搅拌 90 分钟。然后将混合物再加热至 ~ 50℃,搅拌 1 小时并在 1 小时内冷却至室温。在搅拌至少 3 小时之后,通过过滤收集固体物,用甲苯洗涤然后在 ~ 40℃下真空干燥得到 ~ 92% Epo B 活度的回收率。对固体物进行分析:42.9% w/w Epo B,16% w/w 甲苯。母液中含 66% 的进料埃坡霉素 A 并仅含 5% 的进料埃坡霉素 B。

[0442] 实施例 7C

[0443] 按实施例 7 中所述的正相色谱分离操作合并的中心馏份 (200mL) 含 646mg Epo B,将其缓慢加入到 43mL 的甲苯中同时在水套内冷却水温度为 ~ 65℃下真空浓缩至 ~ 43mL。在真空的条件下加入甲苯 (43mL),同时在水套内冷却水温度为 ~ 65℃下继续蒸馏。将所得浆液浓缩至 ~ 43mL 然后让其在 ~ 3 小时内冷却至 ~ 20℃。收集所得晶体,用 2×5mL 甲苯洗涤并在 ~ 40℃下真空干燥 (29" Hg) 30 分钟得到 729mg 的分离出的结晶滤饼 85.3% w/w Epo B)。HPLC 纯度为 99.77 面积% (不包括甲苯的面积%)。滤饼中残留的溶剂为 15.3% w/w 甲苯和 0.3% w/w EtOAc。母液和冲洗液仅含 0.5% 的埃坡霉素 B 进料活度。

[0444] 按此步骤中描述的方法得到的晶体溶剂合物 PXRD 观察图显示在图 15 中 (上图),伴有一幅室温下甲苯溶剂合物的 PXRD 模拟图 (下图)。该晶体溶剂合物的热分析如图 16 所示

[0445] 实施例 8

[0446] 特定晶形的制备

[0447] 实施例 8A:epoB-To β 的制备

[0448] 埃坡霉素 B 甲苯溶剂合物的制备

[0449] 将 Epo B 在 ~ 40℃下溶解于 ~ 13mL 的乙酸乙酯中。加入 1 体积的甲苯接着在浴温 < 40℃下浓缩至 9mL。将其再加热至 ~ 55℃,接着再加入 1 体积的甲苯。然后浓缩至 ~ 10mL 并让其冷却至 18℃。所得浆液用于 X 射线结构测定。

[0450] 按照上述方法得到的 epoB-To β 单斜晶胞的分子结构和 epoB-To β 的 PXRD 图分别如图 4 和 6 所示。

[0451] 实施例 8B:epoB-AN β 的制备

[0452] 埃坡霉素 B 乙腈溶剂合物的制备

[0453] 让基本纯的埃坡霉素 B 在乙腈水溶液中的溶液 (由实施例 5 中反相色谱分离产生

的柱馏份合并而成)在室温下缓慢蒸发得到乙腈-水结晶浆液。直接通过 X 射线衍射检测该结晶浆液。

[0454] 按照上述方法得到的 epoB-AN β 单斜晶胞的分子结构和 epoB-AN β 的 PXRD 图分别如图 2 和 7 所示。

[0455] 实施例 8C :epoB-EA β 的制备

[0456] 埃坡霉素 B EtOAc 溶剂合物的制备

[0457] 将埃坡霉素 B 在 1 : 1EtOAc/庚烷中的溶液浓缩至目标浓度为 $\sim 190195\text{g/L}$ 。在 $\sim 40^\circ\text{C}$ 下向该埃坡霉素 B 的稠浆液中边搅拌边加入 10 体积的 EtOAc。将产生的浆液在 40°C 下搅拌 2 小时,在 5 小时内冷却至约 0°C 并在 0°C 下再搅拌至少 5 小时。然后将结晶浆液过滤并用冷的 1 : 1EtOAc/庚烷洗涤滤饼。将滤饼在真空烘箱中干燥 5-6 小时得到最终的含 $\sim 5-14\%$ EtOAc 的埃坡霉素 B 滤饼。

[0458] 按照上述方法得到的 epoB-EA β 单斜晶胞的分子结构和 epoB-EA β 的 PXRD 图分别如图 1 和 5 所示。

[0459] 实施例 8D :epoB-IP β 的制备

[0460] 埃坡霉素 BIPA 溶剂合物的制备

[0461] 通过溶液加热将埃坡霉素 B (70mg) 溶解于 4mL 的 IPA 中直至形成透明的溶液。将该溶液冷却至环境温度。通过过滤除去刚形成的任何固体。将清滤液置于小型的小瓶中并用带有若干针孔的铝箔覆盖。让溶剂在环境温度下若干天内慢慢地蒸发直至观察到相当的晶体成长。晶体以湿浆液送去 X 射线分析。

[0462] 按照上述方法得到的 epoB-IP β 单斜晶胞的分子结构和 epoB-IP β 的 PXRD 图分别如图 3 和 8 所示。

[0463] 实施例 9

[0464] 由埃坡霉素 B (内酯) 形成衍生物 2 (内酰胺)

[0465] 通过将四丁铵氯化物和叠氮化钠在 THF/DMF 中混合制备四丁铵叠氮化物 (TBA 叠氮化物) 溶液。通过过滤除去 NaCl 晶体回收所产生的 TBA 叠氮化物溶液。将催化量的试剂如三 (二亚苄基丙酮) - 二钯或该催化剂的氯仿加合物 (选择这类试剂以稳定烯丙基阳离子、氯化铵、埃坡霉素 B 和 THF/DMF 溶液) 在搅拌下加入烧瓶中。通过在 $0-5^\circ\text{C}$ 下通入氮气约 25 分钟除去浆液中的氧气。在 $0-5^\circ\text{C}$ 下加入三甲基膦。将反应混合物加热至 $32-38^\circ\text{C}$ 并持续搅拌 4-16 小时由于酯官能键的断裂而生成氨基酸中间体。将反应混合物冷却至 $18-24^\circ\text{C}$ 并过滤除去固体物。用 THF 洗涤固体物并将该滤液与富滤液合并。在 $30-37^\circ\text{C}$ 下将该溶液在 9-10 小时内滴加至 1-羟基苯并三唑水合物、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐和碳酸钾的 THF-DMF 浆液中。将所得的混合物冷却至 $0-12^\circ\text{C}$ 、用水熄灭同时将温度保持 (10°C)。将混合物用乙酸乙酯萃取三至四次,并将合并的乙酸乙酯层用环己烷 (3 : 1 的乙酸乙酯 - 环己烷比例) 稀释,反过来用水萃取。将有机层再用环己烷进一步稀释至 2 : 1 的乙酸乙酯 - 环己烷比例并通过充满活性炭的筒如 Zeta PadR51 SP 或 R53SP 中以降低残留的 Pd 量。将三乙胺 (1%) 加入到有机滤液中并将该溶液用短硅胶以含 1% 三乙胺的 2 : 1 乙酸乙酯 - 环己烷过滤纯化。收集富洗脱液并在 $< 37^\circ\text{C}$ 下浓缩至最终浓度为 $11-14\text{mL/g}$ 。加入另外的环己烷并将该浆液在 $67-78^\circ\text{C}$ 下加热 45-60 分钟。将浆液缓慢冷却至约 21°C 、过滤并用 1 : 1 乙酸乙酯 - 环己烷洗涤结晶固体。将湿滤饼在 $< 45^\circ\text{C}$ 下真

空干燥得到埃坡霉素 B 的晶体内酰胺类似物,产率为约 56M%。

[0466] 实施例 10

[0467] 由埃坡霉素 B 形成氨基取代的埃坡霉素衍生物 (衍生物 1)

[0468] 通过酶在埃坡霉素 B 噻唑环上 2- 甲基的羟基化作用将埃坡霉素 B 转化为埃坡霉素 F。通过放线菌菌株在埃坡霉素 B 上的作用实现该转化。用于此步骤中的放线菌菌株公开于 2002 年 12 月 17 日申请的美国专利申请序号 10/321, 188 和 WO 00/39276, 这两篇文献都在此引入作为参考。

[0469] 将埃坡霉素 B 的乙醇溶液 (5% v/w) 加入微生物中,使其在适当的培养基中于 16-18°C 下生长,并用 50% w/v 氢氧化钠或 30w/v 硫酸将 pH 维持在 6.9 和 7.1 之间。继续进行生物转化直至埃坡霉素 B 的浓度降低至其初始值的 3-5%。将能吸附埃坡霉素 F 的树脂如 XAD-16 或 SP207 加入到发酵罐中 (5% v/w) 并在 10-18°C 下搅拌 16-72 小时。倾出发酵肉汤并用水 (2 : 1 水 - 树脂的比例) 洗涤该树脂。重复洗涤两次以上。通过在布氏漏斗上过滤除去大部分残留的水。

[0470] 将预先吸附了埃坡霉素 F 的 XAD-16 树脂用水浆液并上柱。用乙酸乙酯萃取树脂柱并收集富洗脱液。放出水层然后用 5% 碳酸氢钠溶液和水洗涤富乙酸乙酯部份以脱色。在减压下浓缩富有机部份,然后通过硅土预涂的滤膜,接着进行 10 μ M 研磨过滤。然后将产物真空蒸馏并通过在搅拌下加入作为反溶剂的甲苯使最初的埃坡霉素 F 结晶。将富甲苯混合物进一步浓缩以减少乙酸乙酯含量并加入更多的甲苯。过滤所得的结晶浆液并用甲苯洗涤。

[0471] 将埃坡霉素 F 溶解于二氯甲烷或二氯甲烷 / 乙酸乙酯的混合物中,然后装在填充有高效液相色谱级硅土的色谱柱上,色谱柱已经用 60-80 : 40-20 乙酸乙酯 : 正庚烷混合物 (v/v) 平衡。

[0472] 将产物用等浓度的或逐步梯度的 60-80 : 40-20 乙酸乙酯 : 正庚烷混合物 (v/v)、继之以 60-80 : 40-20 乙酸乙酯 : 正庚烷 (v/v) 从柱上洗脱。通过在 290nm 处的 UV 检测对样品和过程监测。把埃坡霉素 F 产物峰分成几部分以使洗脱出的杂质减至最少。将合并的富部份真空蒸馏至目标浓度为约 100g/L。向埃坡霉素 F 的浆液中边搅拌边加入等体积的正庚烷。将该批再真空蒸馏至目标浓度为大约 100g/L,加入乙酸乙酯,并将该浆液维持在 40°C。将该批冷却至 2 至 -10°C 并在该温度下维持至少 5 小时以使产物从溶液中结晶。将产生的浆液过滤并用冷的 1 : 1 乙酸乙酯 / 正庚烷溶液洗涤。将最终的埃坡霉素 F 滤饼在 35-40°C 下真空干燥。

[0473] 将 1,8- 二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳 -7- 烯 (DBU, 1.8 当量) 缓慢加入到埃坡霉素 F 和二苯基磷酰叠氮 (1.5 当量) 在四氢呋喃 (预先在 3A MS 上干燥) 的混悬液中,并将该反应物在 15-25°C 下搅拌 12-24 小时。将三甲基膦 / 四氢呋喃溶液 (1.0M, 1.1 当量) 缓慢加入到反应混合物中。加入水和氢氧化铵并将混合物再搅拌 30 分钟。将反应混合物用水稀释并将水相用三份二氯甲烷萃取。然后将有机相用稀氨水和半饱和的氯化钠溶液洗涤、并蒸干得到粗制的在噻唑的甲基上功能化的氨基衍生物 (衍生物 1)。

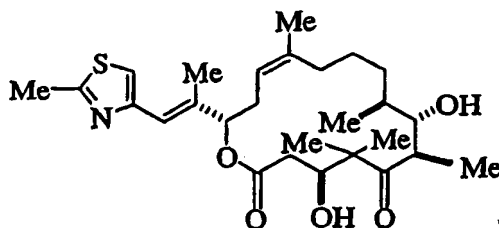
[0474] 将粗制品用以 2.5% 甲醇 -0.2% 三乙胺 - 二氯甲烷预处理的硅胶通过柱色谱法纯化。将适宜质量的部份合并、微米滤网过滤并蒸干得到色谱分离的衍生物 1。将所得物加入到乙酸乙酯中并将产生的混悬液在 72-75°C 下加热得到溶液。缓慢加入反溶剂正庚烷,并让

混合物在晶种存在的情况下缓慢冷却同时于 15-25℃ 下搅拌。冷却并保持在 ~ 5℃ 后,通过过滤分离出产生的固体,接着真空干燥得到纯化的晶体氨基衍生物(衍生物 1),埃坡霉素 F 的平均产率为约 70M%。

[0475] 实施例 11

[0476] 由埃坡霉素 B 制备埃坡霉素 D(衍生物 3)

[0477]



[0478] [[4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,15R*(E)]]-4,8-二羟基-5,5,7,9,13-五甲基-16-[1-甲基-2-(2-甲基-4-噻唑基)乙烯基]-1-氧杂-13(Z)-环十六碳二烯-2,6-二酮[埃坡霉素 D,衍生物 3]

[0479] 在 -78℃ 氩气氛围下向无水 THF(5ml) 中加入 WC16(198mg,0.5mmol) 接着加入 nBuLi(0.625ml 的 1.6M 在己烷中的溶液,1.0mmol)。将反应物在 20 分钟内温热至室温。取出一部分的(0.50ml,0.05mmol) 钨试剂并在氩气的氛围下加入到埃坡霉素 B(9.0mg,0.018mmol) 中,将该反应混合物搅拌 15 分钟,然后通过加入饱和 NaHCO₃(1ml) 熄灭反应。用 EtOAc(3×1ml) 萃取该反应混合物,将合并的萃取液干燥(Na₂SO₄)、过滤,并在真空下除去挥发物。将残留物用 35% EtOAc/ 己烷色谱分离得到发明名称的化合物(7.0mg,0.014mmol)。MS m/z 492.3(M⁺H)。

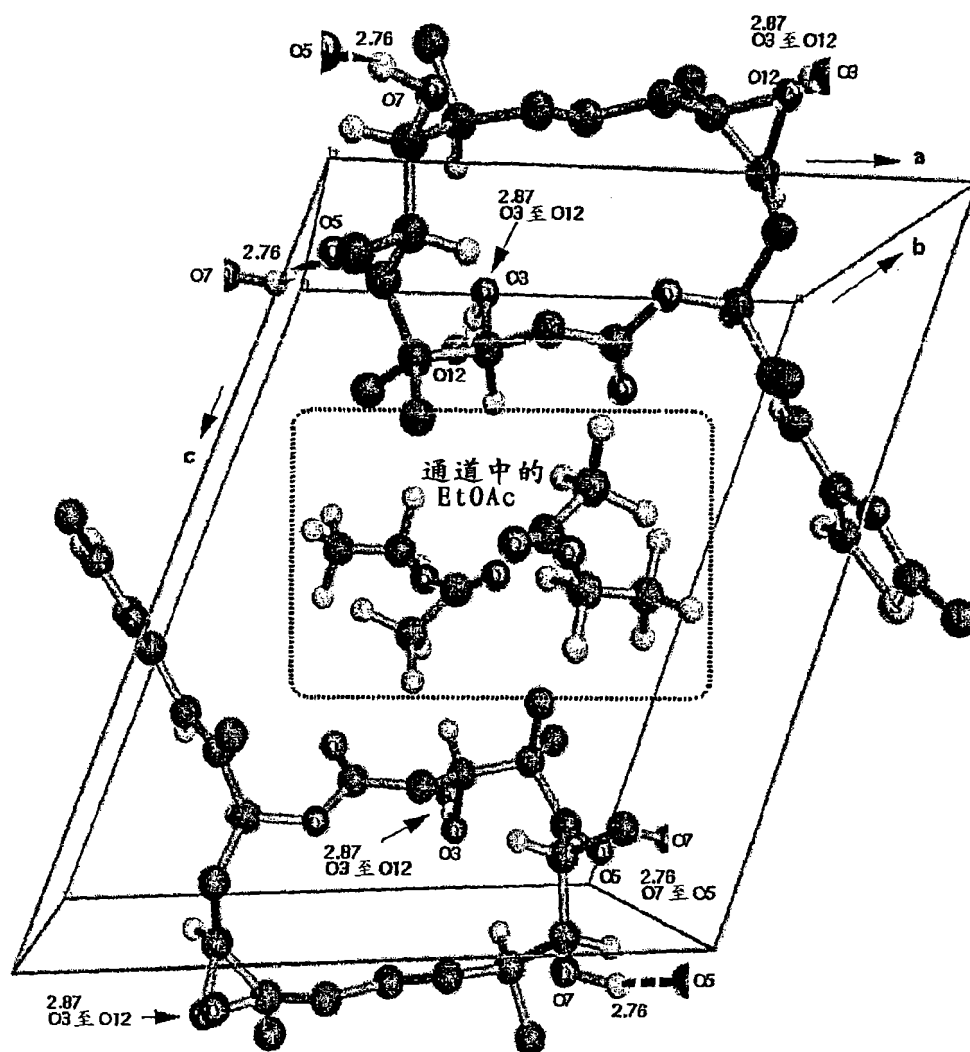


图 1

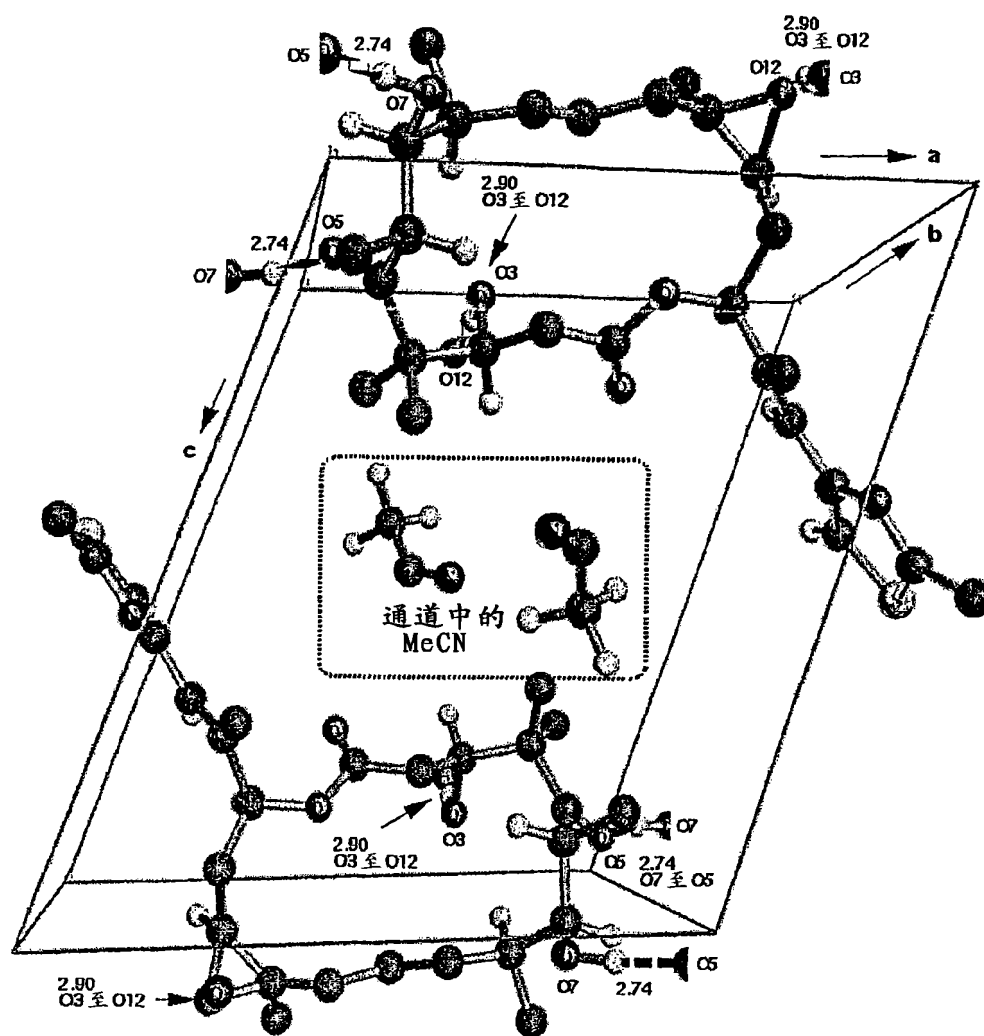


图 2

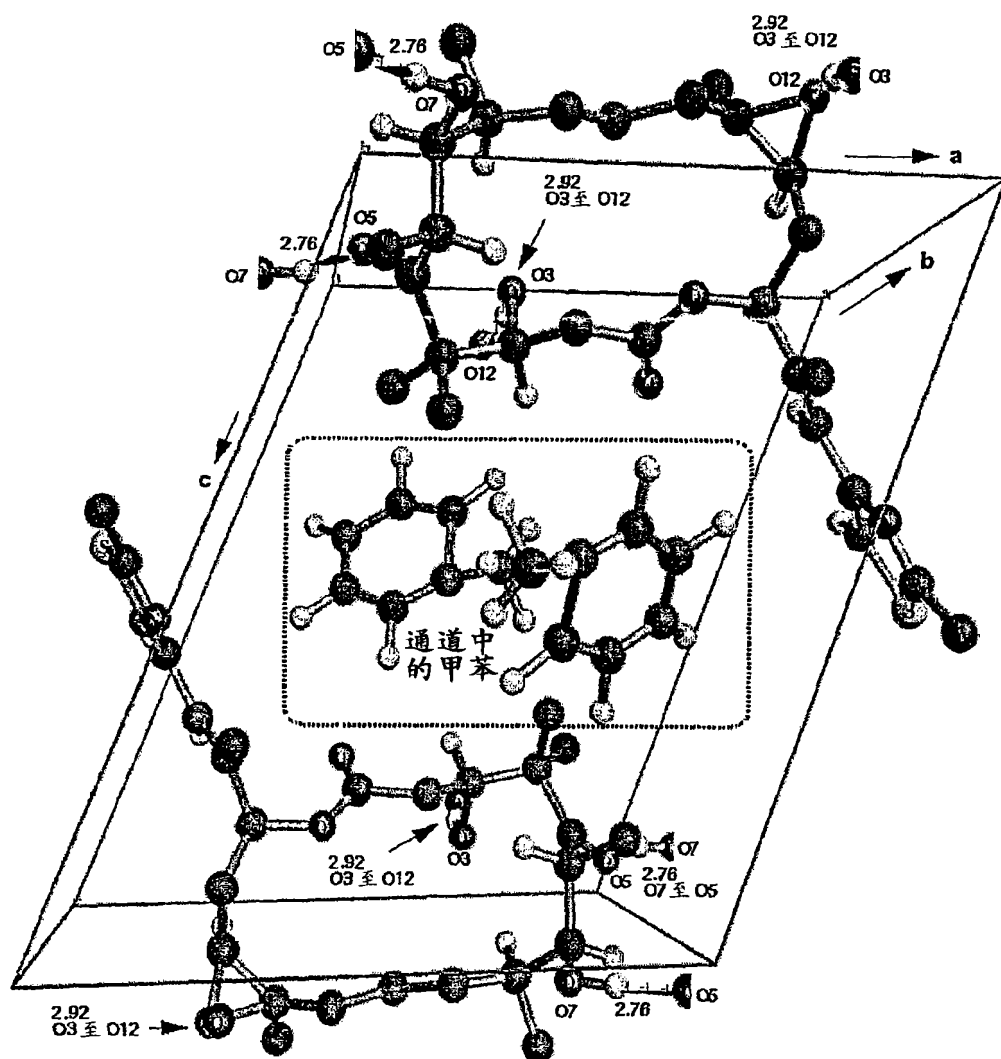


图 4

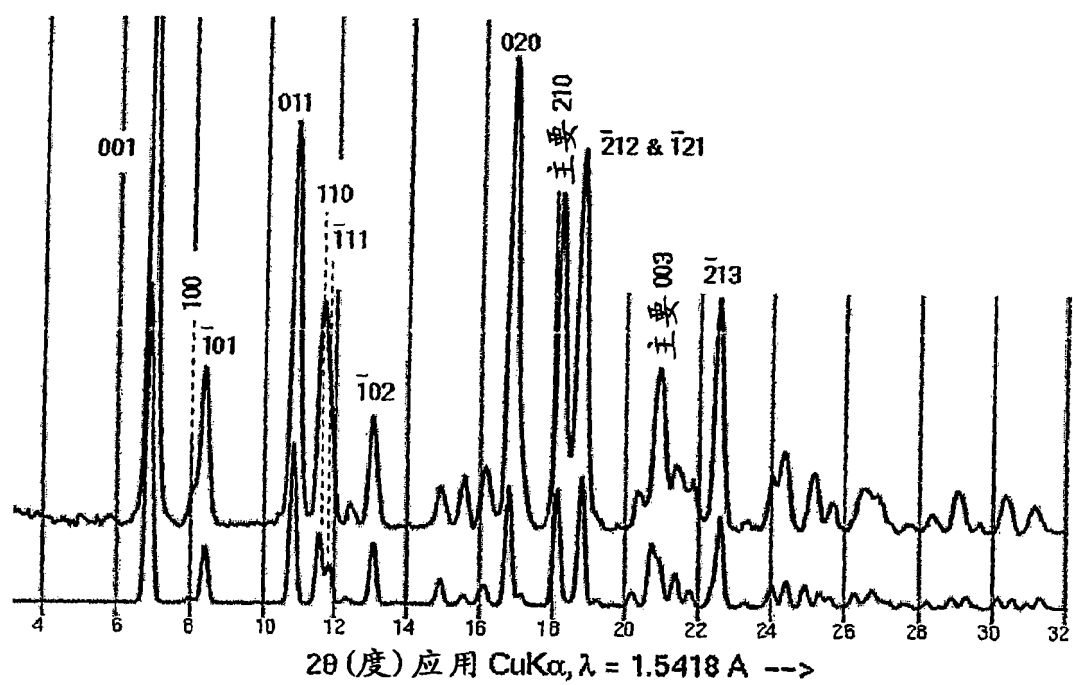


图 5

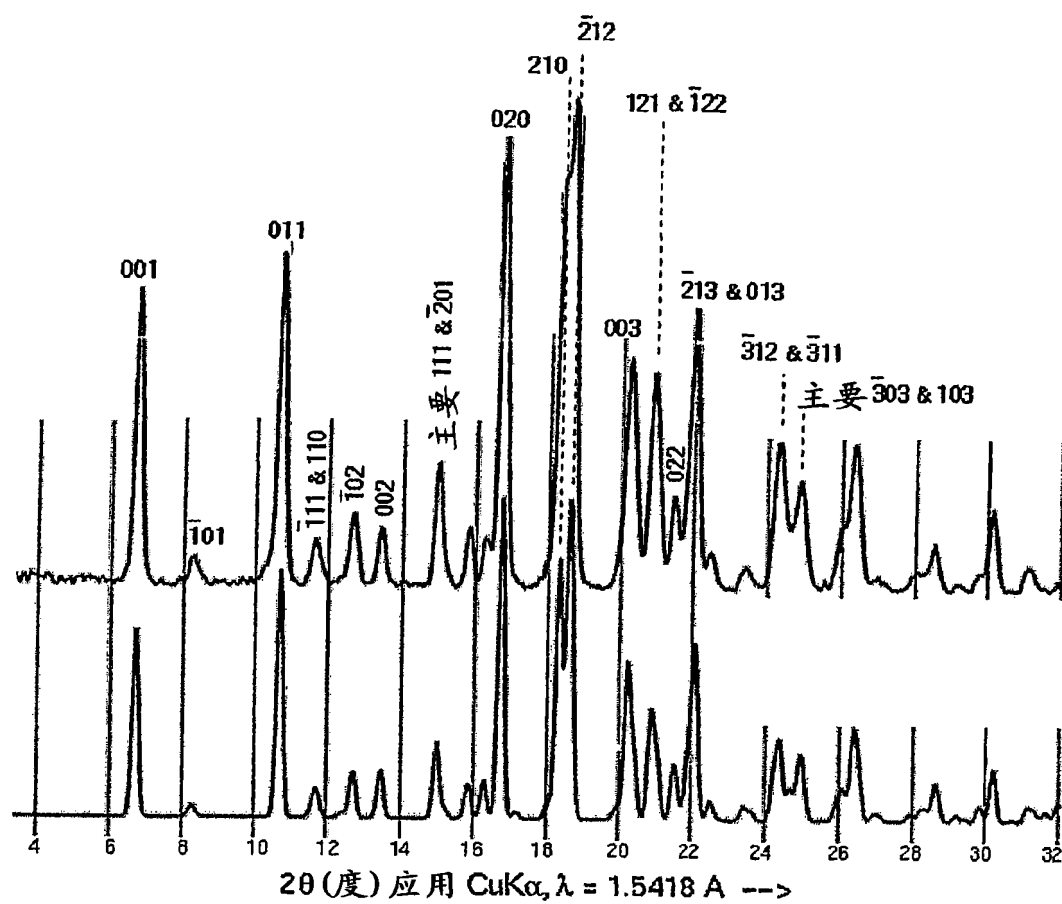


图 6

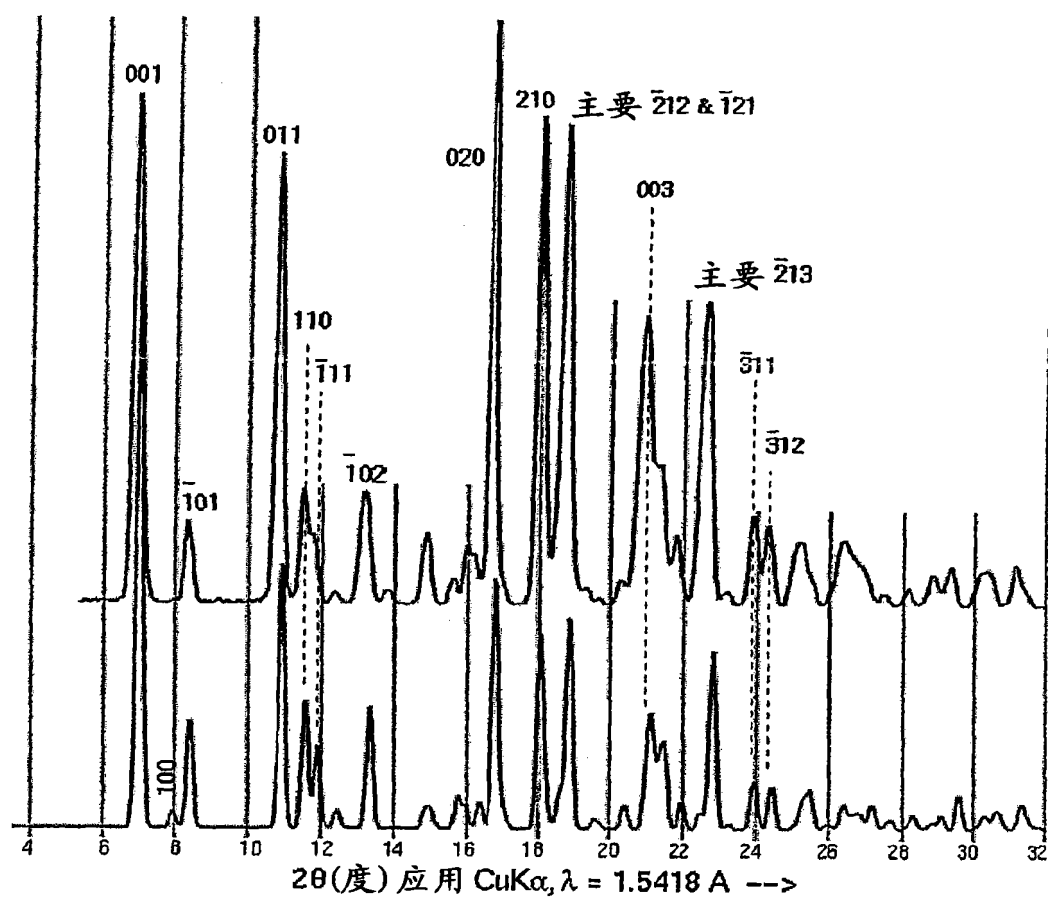


图 7

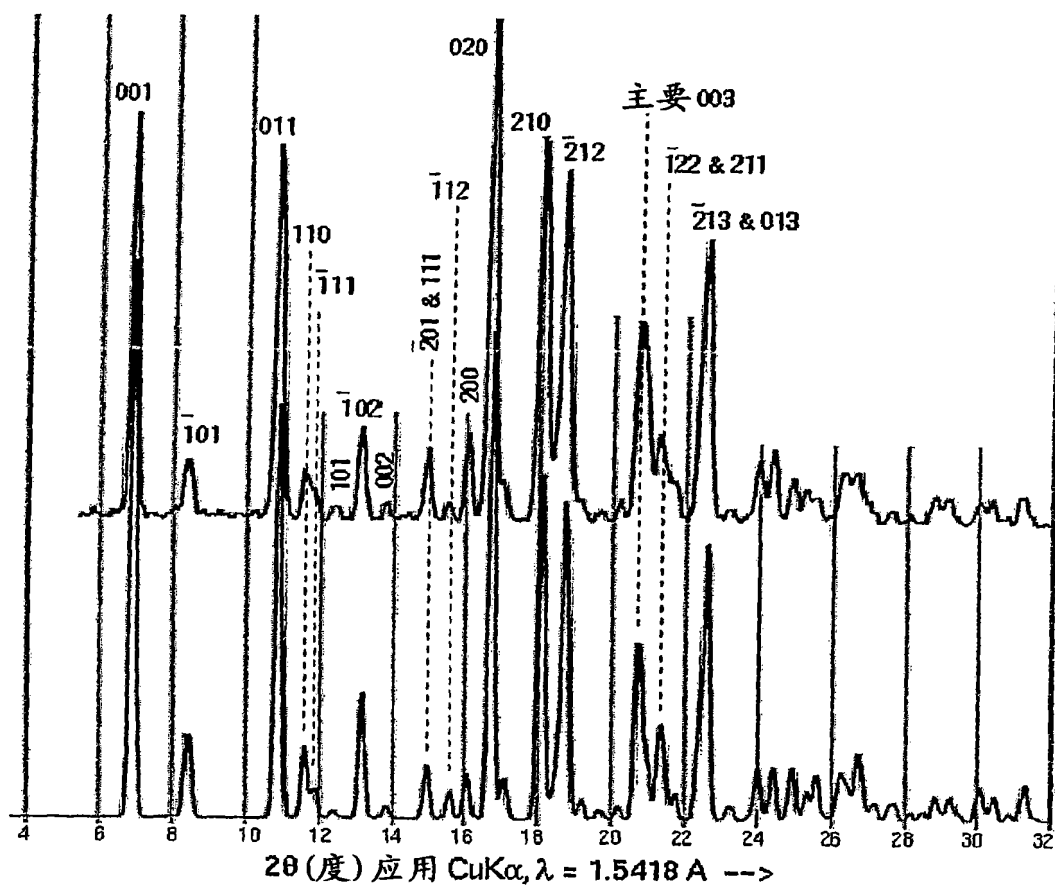


图 8

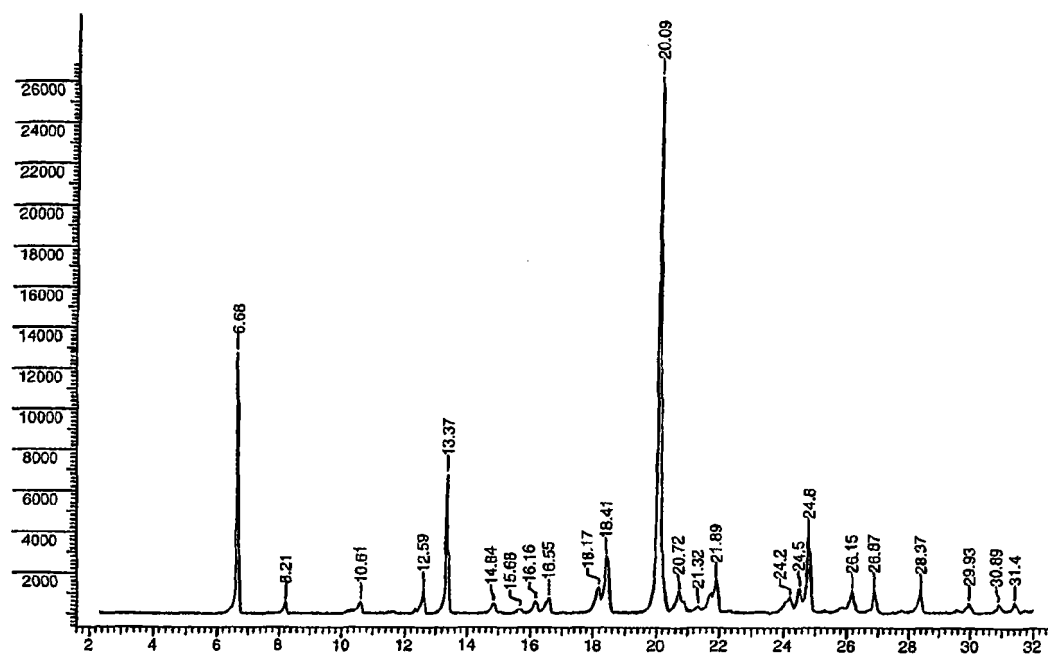


图 9

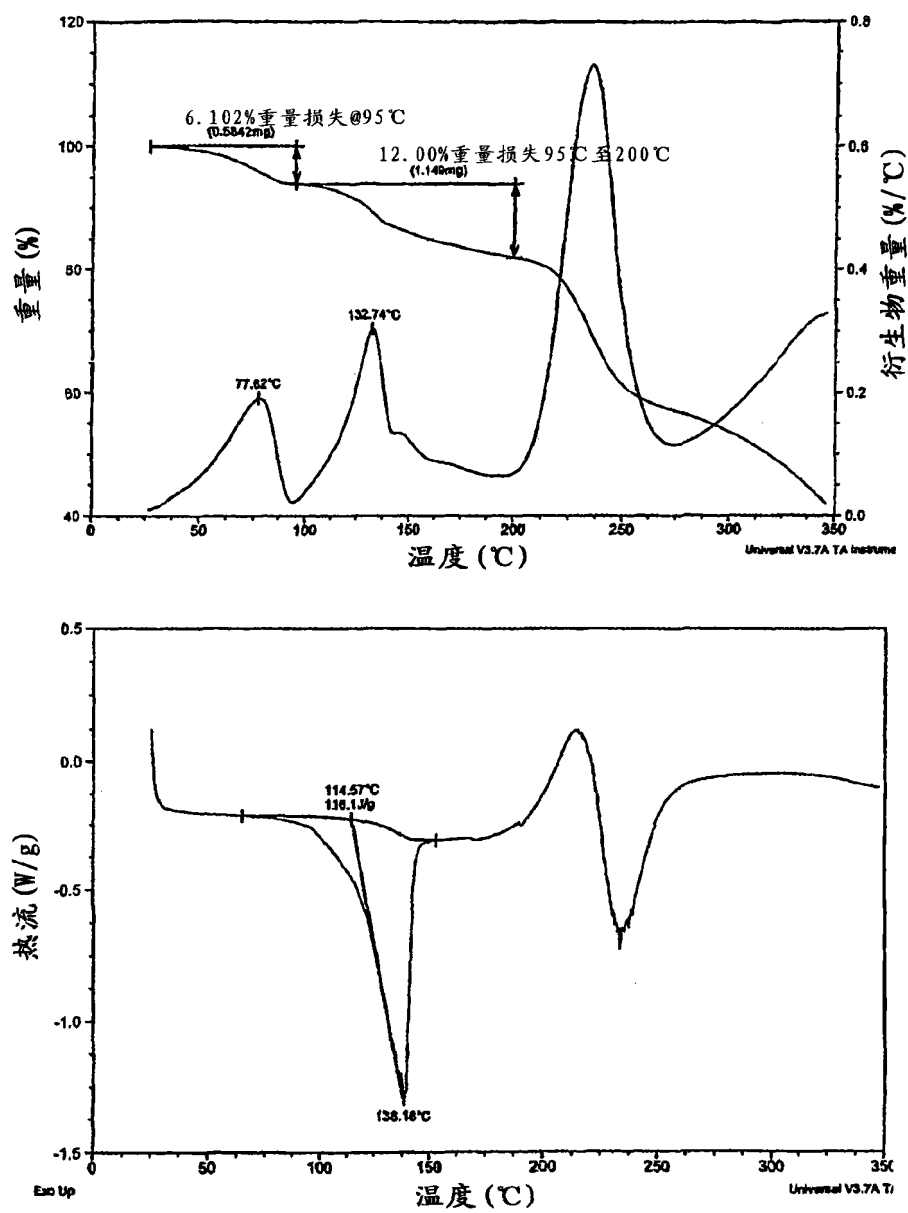


图 10

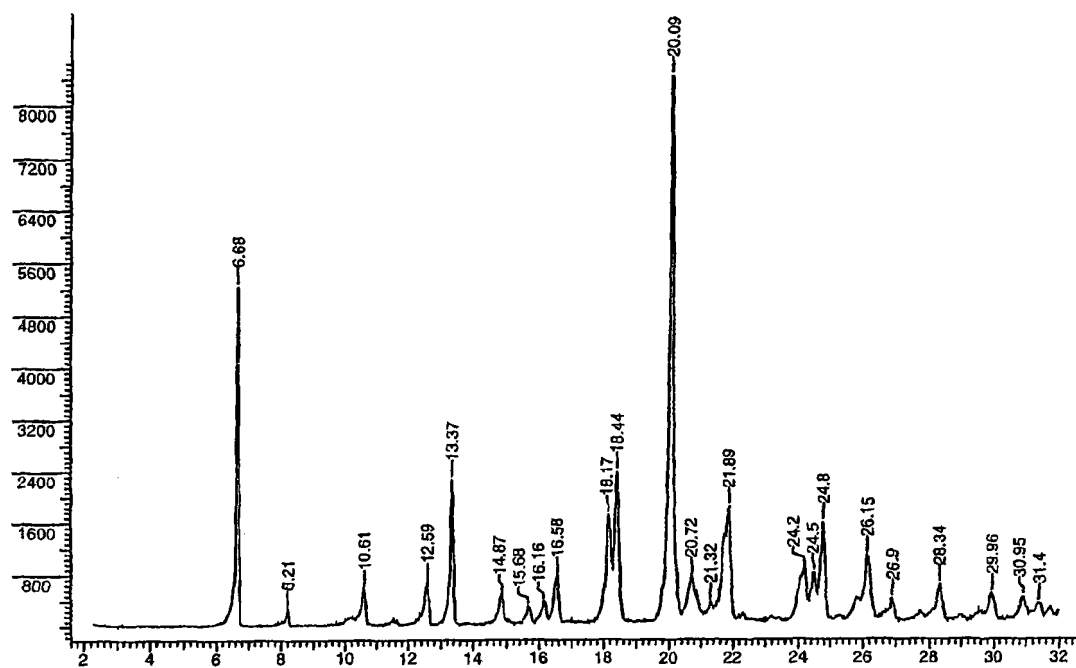


图 11

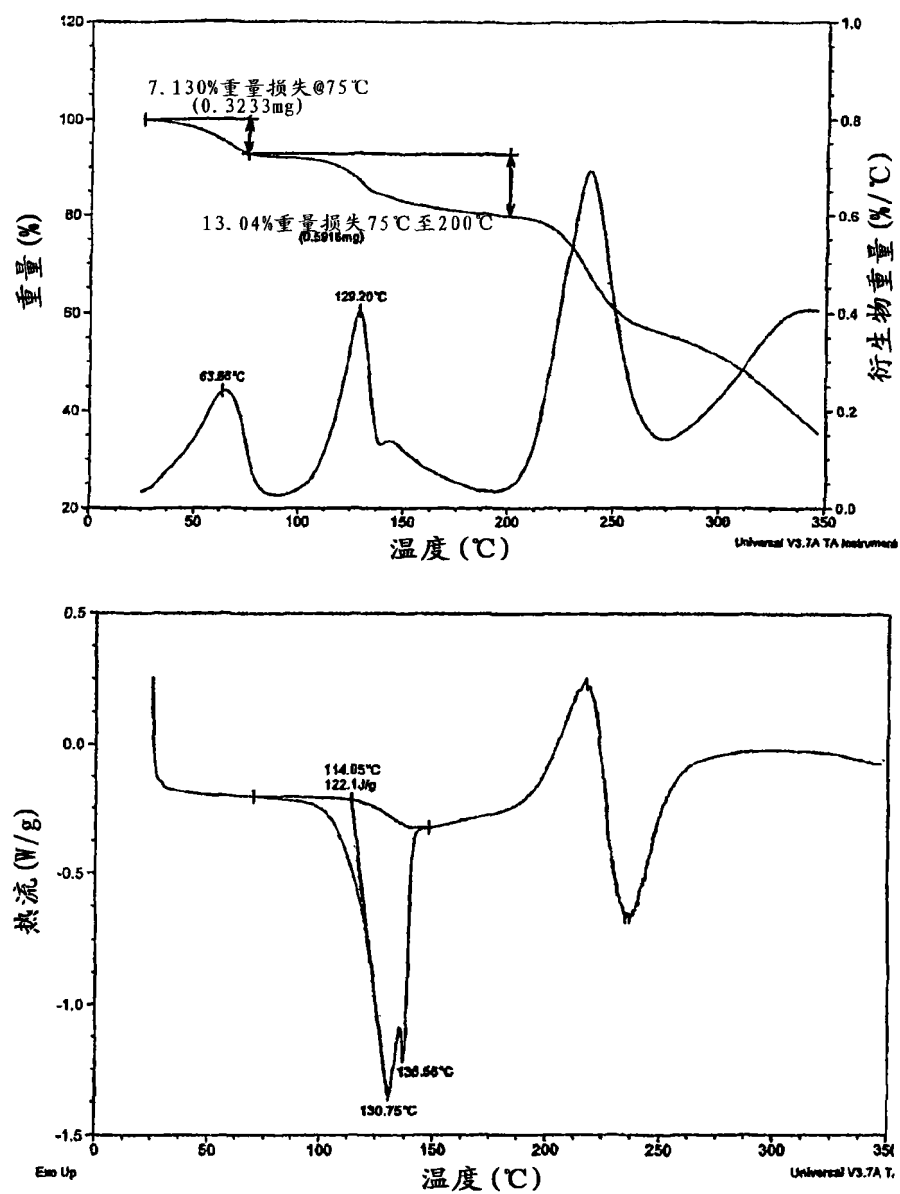


图 12

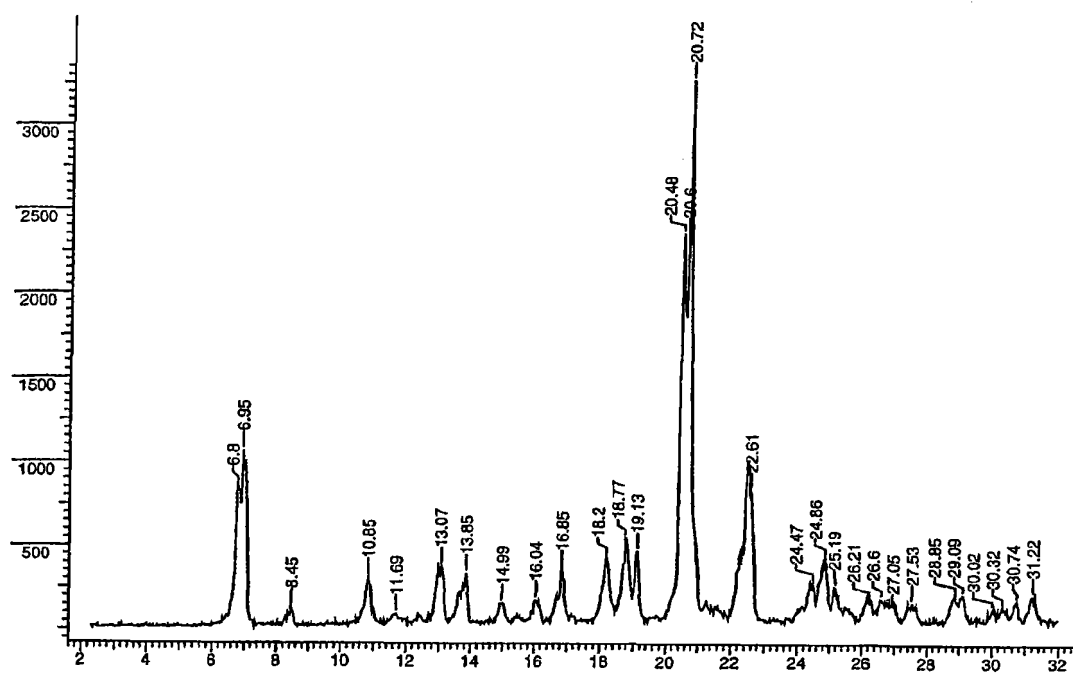


图 13

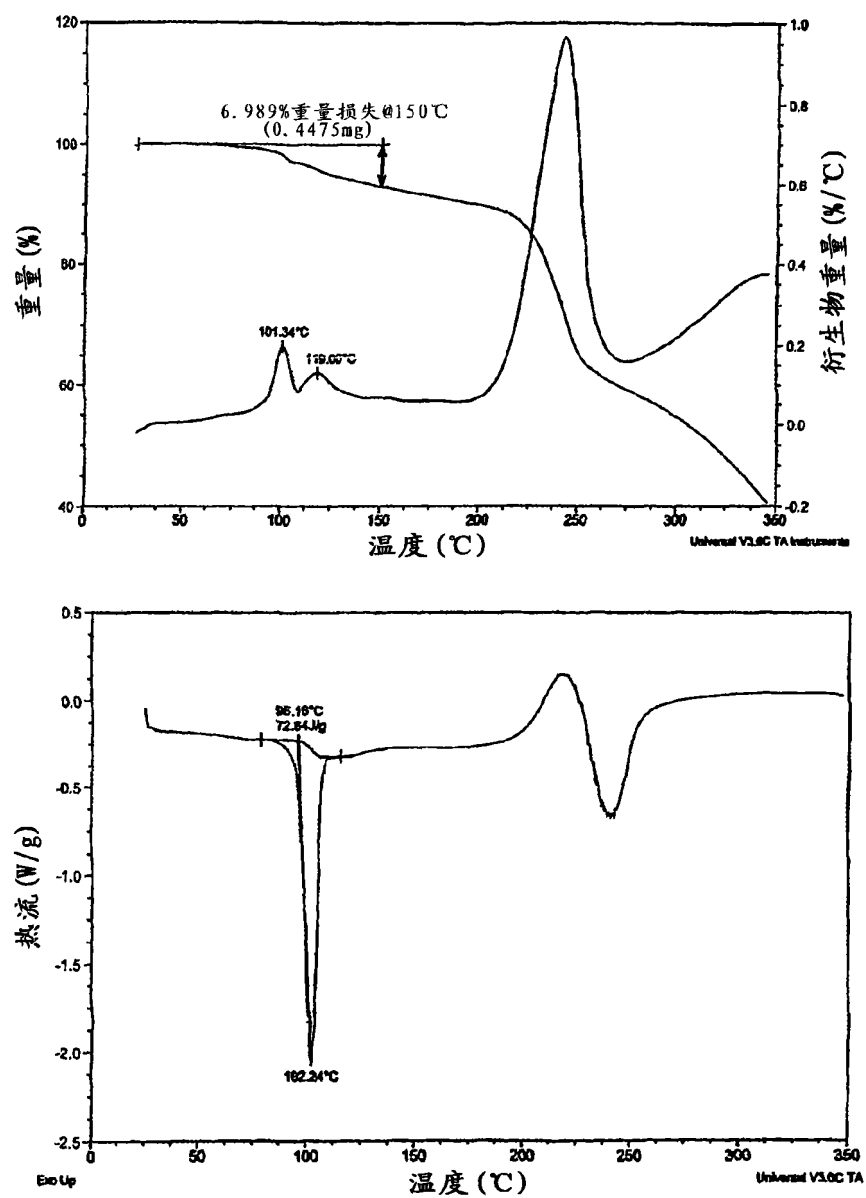


图 14

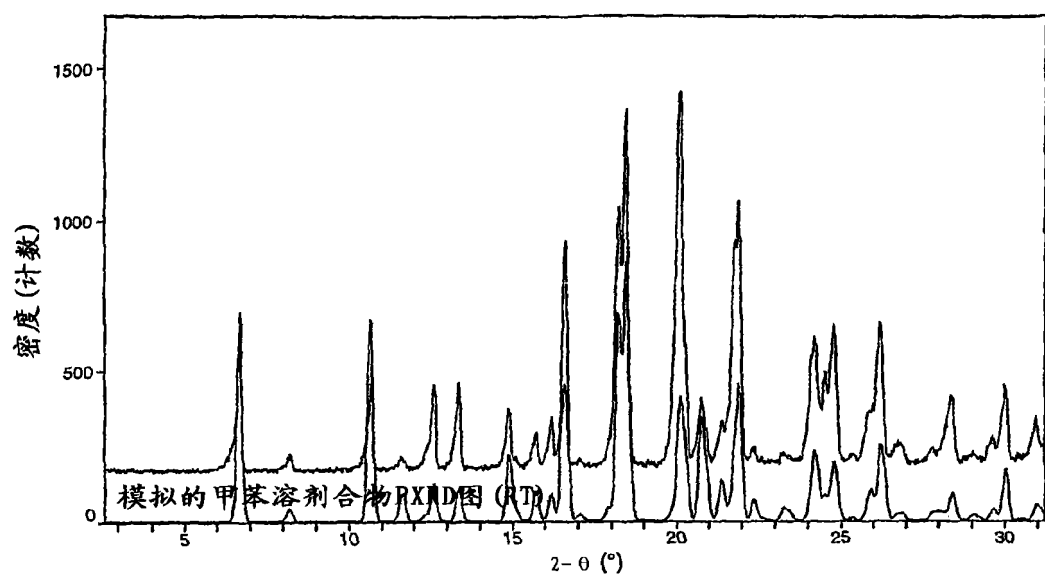


图 15

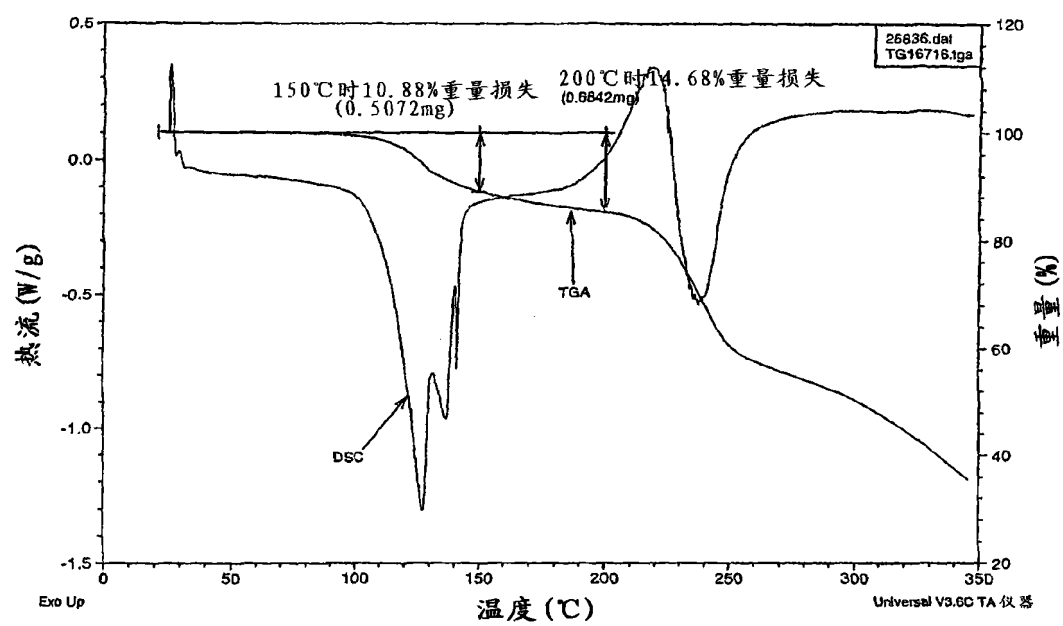


图 16