[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610161459.5

[51] Int. Cl.
C07D 473/34 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12R 1/47 (2006.01)
C07H 7/06 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 101200467A

[51] Int. Cl. (续)
C07H 19/167 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.15

[21] 申请号 200610161459.5

[71] 申请人 徐州师范大学

地址 221116 江苏省徐州市铜山新区上海路 29 号

共同申请人 何放亭

[72] 发明人 何放亭 蒋继宏 冯友建

[74] 专利代理机构 徐州市三联专利事务所

代理人 周爱芳

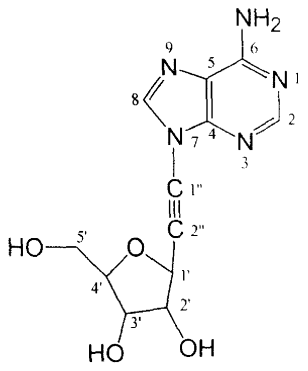
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种链霉菌产生的新化合物及其制备方法

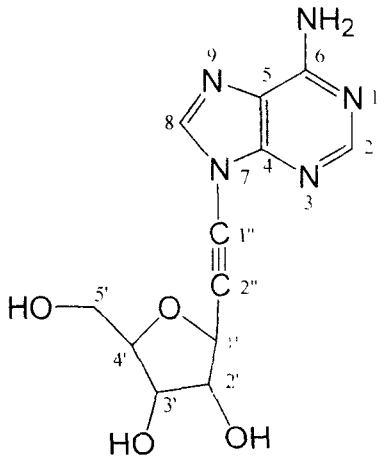
[57] 摘要

本发明公开了一种链霉菌产生的新化合物及其制备方法，用小白链霉菌徐州变种 CGMCC1815 (Streptomyces albulus var. xuzhouensis) 作生产菌。该链霉菌在含有无机盐及维生素的培养基里进行液体发酵，获得链霉菌菌丝体、发酵上清液和各种代谢产物。 对发酵后的发酵上清液和菌丝用氯仿或乙醇萃取，通过提取分离和纯化等方法，得到结构式如上新化合物。 该新化合物具有抗肿瘤活性。



2-(6-氨基-嘌呤-9-基乙炔基)-5-羟甲基四氢呋喃-3,4-二醇

1.一种链霉菌发酵产生的新化合物，其结构式（A）如下：



2-（6-氨基-嘌啉-9-基乙炔基）-5-羟甲基四氢呋喃-3,4- 二醇

(A)

2. 一种权利要求 1 所述的新化合物的制备方法，包括菌种的发酵和产物的分离提纯，其特征在于，生产菌是小白链霉菌徐州变种(Streptomyces albulus var. xuzhouensis)CGMCC No. 1815，将该菌在含无机盐及维生素的培养基上进行液体发酵，获得含发酵产物的发酵液，发酵液经浓缩后用正丁醇或氯仿或乙酸乙酯萃取发酵产物，萃取物通过硅胶层析法、凝胶层析法，纯化得到成品；所述的发酵产物为 2-(6-氨基-嘌啉-9-基乙炔基)-5-羟甲基四氢呋喃-3，4 二醇。

3. 根据权利要求 2 所述的新化合物的制备方法，其特征在于，所述的发酵液经过滤后上大孔树脂，用丙酮洗脱，分离得含新化合物的混合物。

4、 根据权利要求 2 所述的新化合物的制备方法，其特征在于，所述的发酵方法包括菌种的活化、摇瓶培养和液体发酵培养，获得发酵产物。

5、 根据权利要求 2 或 4 所述的新化合物的制备方法，其特征在于小白链霉菌徐州变种 CGMCC1815 的种子培养基成份为葡萄糖 0.5-1.5%， 牛肉膏 0 .2-1%，黄豆饼粉 1-2%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.2-0.6%，K_2HPO_4 0.001-0.004%， $MgSO_4$ 0.001-0.006%, Fe_2SO_4 0.001-0.005%； pH6.5-8.5， 28℃振荡培养 36-72 小时。

6、根据权利要求 2 或 4 所述的新化合物的制备方法，其特征在于，所述的液体发酵培养基成份为：玉米粉 1-3%，黄豆饼粉 1-4%，葡萄糖 1-5%，$(NH_4)_2SO_4$0.1-0.8%，$K_2HPO_4$0.001-0.006%, $MgSO_4$ 0.002-0.007%，Fe_2SO_4 0.001-

0.005%,水 1000 ml,条件是在 pH 6.5-7.5, 28℃下培养 36-96 小时。

7、权利要求 1 所述的新化合物的应用，其特征在于，该新化合物具有抗肿瘤活性，可用于抗肿瘤药物。

一种链霉菌产生的新化合物及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种链霉菌产生的新化合物及其制备方法和应用。

背景技术

众所周知，癌症已经严重地威胁人类健康和生命，据 WHO 统计，全球每年因癌症死亡的人数已经超过 600 万，新增癌症患者高达 1000 多万，并有逐年上升趋势。目前，紫杉醇已成为治疗癌症公认的首先药物，由于紫杉醇的独特疗效和产量低，使其价格极为昂贵，曾高达 500 万美元/公斤。

微生物作为一类重要的天然药用资源，为人类的健康做出了巨大的贡献。现已研究开发和利用持续了半个多世纪，但新发现的药用微生物及其活性化合物的数量仍在稳步增长，近年来，随着分子生物学和人类基因组研究的飞速发展，人们设计了许多特异性的针对人体各种疾病的新药筛选模型，使得从微生物中筛选新的药用生物活性物质的研究又迎来了一个新的春天，必将发挥越来越重要的作用。

1928 年, 英国学者 A1Fleming 发现青霉素及其在细菌性感染疾病的治疗方面应用发展是人类制药历史上具有划时代意义的里程碑。此后，美国著名土壤微生物学家 Selman A. Waksman 在 20 世纪 40 年代先后发现了链霉素等放线菌产生的抗生素。青霉素和链霉素的发现，极大地推动了抗生素研究的发展和新抗生素的发现，使抗生素在抗感染药物的治疗中发挥了主导性的作用，奠定了现代抗生素制药工业发展的基础。

在近几十年内, 抗生素的研究又有了飞速的发展，相继发现了氯霉素、金霉素、土霉素、四环素、新霉素和红霉素等抗菌素。已找到的抗生素有数千种，其中具有临床效果并已利用发酵法大量生产和广泛应用的多达百余种。

一个好的抗生素应具有较广的抗菌谱外，还应具有较好的选择性，不产生过敏和耐药性，有高度的稳定性，收率高，成本低，适于工业生产。目前生产和应用的抗生素还不能完全满足以上要求，寻找新的抗生素仍然是很重要的任务。（张致平.微生物药物学.化学工业出版社,2003.）现在以抗肿瘤、抗病毒、抗真菌、抗原虫、广谱和抗耐药菌的抗生素为主要研究方向，已成功地建立了用

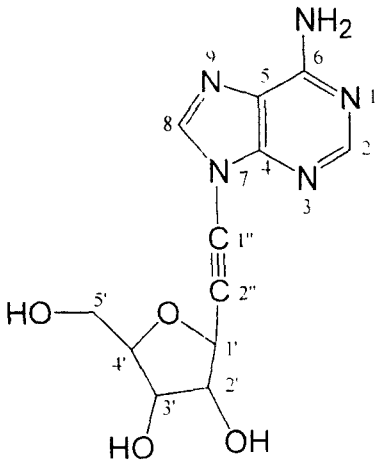
于治疗艾滋病，抗老年性痴呆症，消除肥胖症，控制糖尿病并发白内障，抑制前列腺肿大的抗生素的筛选模型，估计近年内可取得一系列成功。因此,现在利用发酵技术生产的“抗生素”可以把微生物代谢产生的对人类疾病的预防和治疗有用的物质都包括进去。

发明内容

本发明的目的是提供一种链霉菌产生的新化合物及其制备方法和应用

本发明的技术方案如下：

一种链霉菌发酵产生的新化合物，其结构式（A）如下：



2-（6-氨基-嘌啉-9-基乙炔基）-5-羟甲基四氢呋喃-3.4-二醇

（A）

一种链霉菌产生的新化合物的制备方法，包括菌种的发酵和产物的分离提纯，生产菌是小白链霉菌徐州变种，拉丁文名称 Streptomyces albulus var. xuzhouensis，是徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室提供保存在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），编号为 CGMCC No. 1815。将该菌在含无机盐及维生素的培养基上进行液体发酵，获得含发酵产物的发酵液，发酵液经浓缩后用正丁醇或氯仿或乙酸乙酯萃取发酵产物，通过硅胶层析法、凝胶层析法，纯化得到成品。

所述的发酵产物为 2-(6-氨基-嘌啉-9-基乙炔基)-5-羟甲基四氢呋喃-3，4 二醇。该发酵产物在小白链霉菌发酵液中。

具体步骤如下：

1）.产生菌

生产菌来源：小白链霉菌徐州变种，拉丁文名称 Streptomyces albulus var.

xuzhouensis，是徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室提供保存在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC），编号为 CGMCC No.1815。

种子培养：培养基成分：葡萄糖 0.5-1.5%，牛肉膏 0 .2-1%，黄豆饼粉 1-2 %， 0.2-0.6%$(NH_4)_2SO_4$， 0.001-0.004%K_2HPO_4， 0.001-0.006%$MgSO_4$, 0.001-0.005% Fe_2SO_4，pH6.5-8.5， 28℃振荡培养 36-72 小时。

2). 液体发酵

发酵培养：培养基成分：玉米粉 1-3%，黄豆饼粉 1-4%，葡萄糖 1-5%，$(NH_4)_2SO_4$ 0.1-0.8%，K_2HPO_4 0.001-0.006%， $MgSO_4$ 0.002-0.007%，， Fe2S04 0.001 -0.005%，水 1000 ml;条件是 pH6.5-7.5，28℃培养 36-96 小时。

3). 发酵产物的分离提纯：

将发酵液用旋转蒸发器浓缩 10-20 倍，用正丁醇或氯仿或乙酸乙酯萃取 2-3 次，合并萃取液后浓缩得含有新化合物（A）的混合物。

发酵产物在发酵液中经过滤后用大孔树脂分离得新化合物。具体方法是：将过滤后发酵液加入到大孔树脂上，加压让含有新化合物的物质吸附到大孔树脂上，其他从大孔树脂上流出，然后用不同比例的乙醇洗脱，即得到含有新化合物的混合物。将含有新化合物的混合物经硅胶柱和 LH20 凝胶株分离纯化得新化合物（A）

该新化合物抗肿瘤活性测定

(1) 用 MTT 法测定该新化合物对对肺癌细胞 NCI-H460 的抑制活性 IC50 为 29.6ng/ml。

(2) 用 MTT 法测定该新化合物对对胃癌细胞 SGC7901 的抑制活性 IC50 为 12 ng/ml。

具体实施方式

实施例 1 链霉菌产生的新化合物及其制备方法和应用

种子培养：培养基成分：葡萄糖 1%，牛肉膏 0.5%，黄豆饼粉 1%，0.4%$(NH_4)_2SO_4$，0.002%K_2HPO_4，0.003%$MgSO_4$，. 0.003% Fe_2SO_4，pH6.5-8.5， 28℃振荡培养 36-72 小时。.

在发酵罐中用发酵培养基发酵小白链霉菌徐州变种 CGMCC1815 得含 2-(6-

氨基-嘌啉-9-基乙炔基)-5-羟甲基四氢呋喃-3，4 二醇的发酵液，该发酵培养基成分：3%玉米粉， 2%黄豆饼粉， 2%葡萄糖， 0.4%(NH4)2SO4， 0.002%k2HPO4, 0.003%MgSO4， 0.003% Fe2SO4, 水 1000ml; pH 7.2，28℃培养 72 小时。放罐体积为 15 升，先将发酵液进行浓缩，再进行酸化处理，用盐酸调至 pH=4.0-5.5, 用氯仿萃取，浓缩后用石油醚/氯仿=9：4（体积比）进行硅胶柱层析，收集洗脱液，对各洗脱组分进行抗肺癌细胞 NCI-H460 活性测定，确定活性最大组分。将上述抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大组分上 LH20 凝胶柱，用甲醇和氯仿 5：1 的比例进行洗脱，得抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大化合物。根据波谱技术（1H-NMR，13C-NMR,质谱等）对所得抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大化合物进行结构鉴定，确定为新化合物（A)。

实施例 2

①将链酶菌发酵培养的发酵液离心后，取上清液，过大孔树脂柱，用丙酮洗脱得粗提物 。

②将所得粗提物，上硅胶层析柱，用乙酸乙酯和甲醇进行梯度洗脱，收集洗脱液，对各洗脱组分进行抗肺癌细胞 NCI-H460 活性测定，确定活性最大组分。

③将上述抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大组分上 LH20 凝胶柱，用甲醇和氯仿 5：1 的比例进行洗脱，得抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大化合物。

④根据波谱技术（1H-NMR，13C-NMR,质谱等）对所得抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大化合物进行结构鉴定，确定为新化合物（A)。

实施例 3

①将链酶菌发酵培养的发酵液离心后，取上清液，用旋转蒸发器浓缩，用氯仿萃取，得氯仿萃取物。

②将所得氯仿萃取物，上硅胶层析柱，用氯仿和甲醇进行梯度洗脱，收集洗脱液，对各洗脱组分进行抗肺癌细胞 NCI-H460 活性测定，确定活性最大组分。

③将上述抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大组分上 LH20 凝胶柱，用甲醇和氯仿 5：1 的比例进行洗脱，得抗肺癌细胞 NCI-H460 活性最大化合物。

④根据波谱技术（1H-NMR，13C-NMR,质谱等）对所得抗肺癌细胞 NCI-H460

活性最大化合物进行结构鉴定，确定为新化合物（A）。

实施例 4 链霉菌产生的新化合物的应用

用 MTT 法测定该新化合物（A）对对肺癌细胞 NCI-H460 的抑制活性 IC50 为 29.6ng/ml。

用 MTT 法测定该新化合物对对胃癌细胞 SGC7901 的抑制活性 IC50 为 12 ng/ml

附：新化合物（A）结构表征：

质谱（ESI）m/z：288（M–3），270（M–3–H_2O）

^{1}NMR（δ_{ppm}）：3.58 (1H, m, J = 4, $C_{5'}$-H) ; 3.66 (1H, m, J = 4.5, $C_{5'}$-H); 3.94 (1H, q, J = 3.6, $C_{4'}$-H); 4.11 (1H, q, J = 4, $C_{3'}$-H); 4.38 (1H, q, J = 5.6, $C_{2'}$-H); 5.17 (1H, d, J = 5.2, OH); 5.19 (1H, d, J = 5.6 , OH); 5.44 (1H, d, J = 6, OH); 6.06 (1H, d, J = 5.6, $C_{1'}$-H); 6.89 (2H, b, NH_2); 8.23 (1H, s, C_8-H); 8.44 (1H, s, C_2-H)

^{13}NMR（δ_{ppm}）: 61.39 ($C_{5'}$); 70.37 ($C_{3'}$); 74.42 ($C_{2'}$); 83.15 ($C_{2''}$); 85.64 ($C_{4'}$); 87.97 ($C_{1'}$); 101.43 ($_{1''}$); 115.48 (C_5); 132.55 (C_8); 150.31 (C_4); 153.71 (C_2); 157.20 (C_6)

附图 1 新化合物（A）核磁共振氢谱

附图 2 新化合物（A）核磁共振氢谱（重水交换）

附图 3 新化合物（A）核磁共振碳谱

附图 4 新化合物（A）核磁共振碳－氢相关谱 。

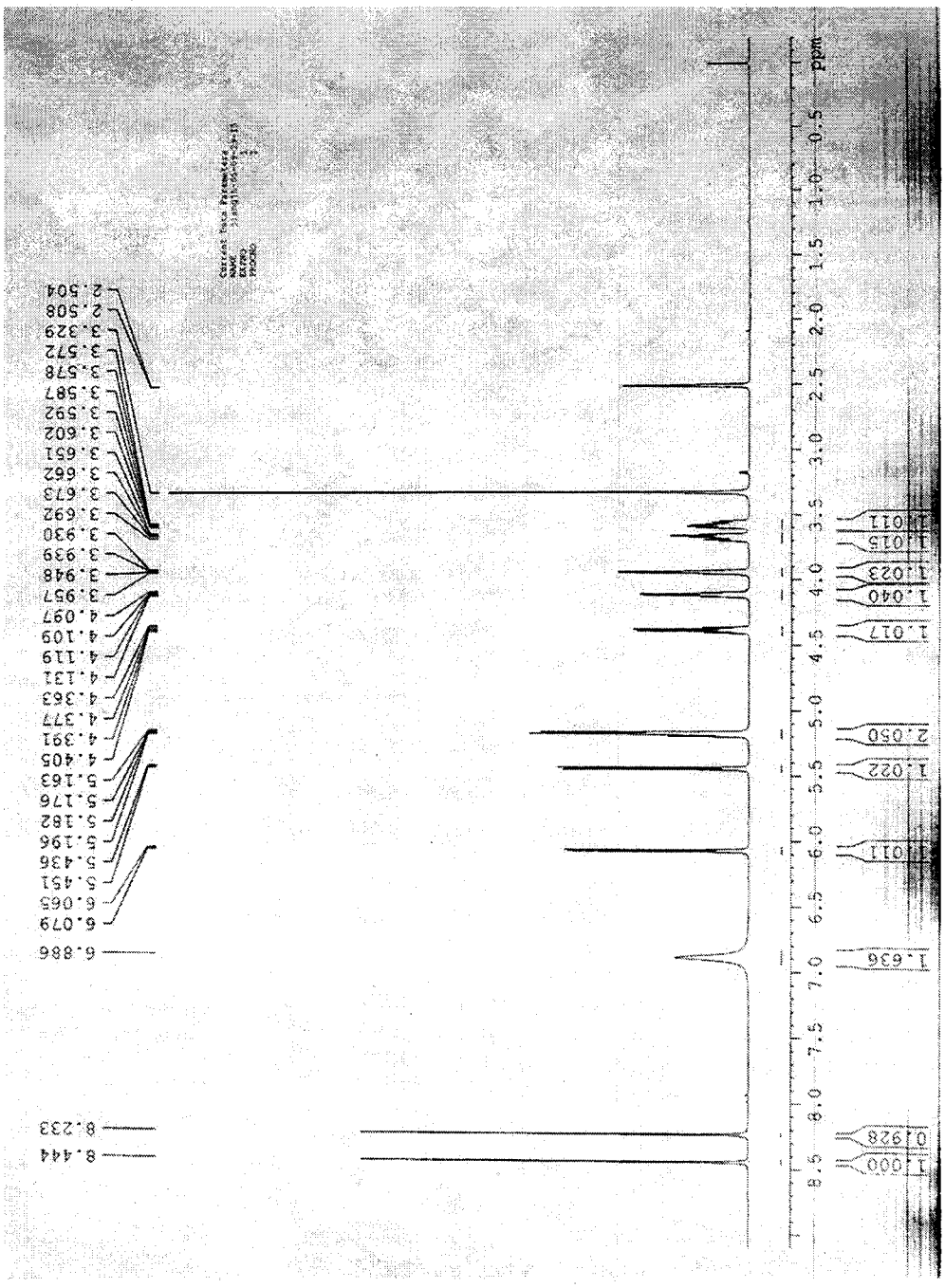


图 1 新化合物（A）核磁共振氢谱

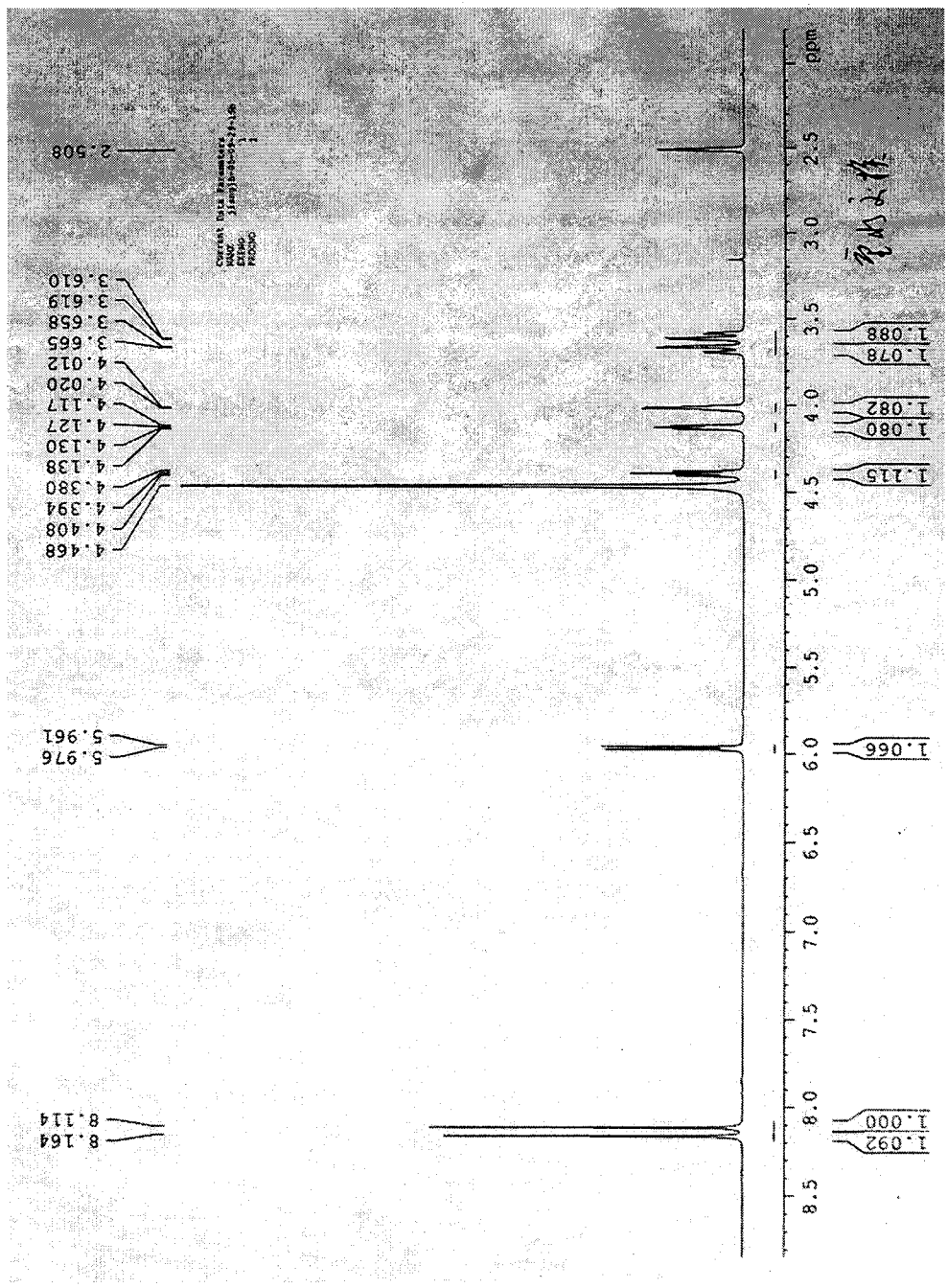


图 2 新化合物（A）核磁共振氢谱（重水交换）

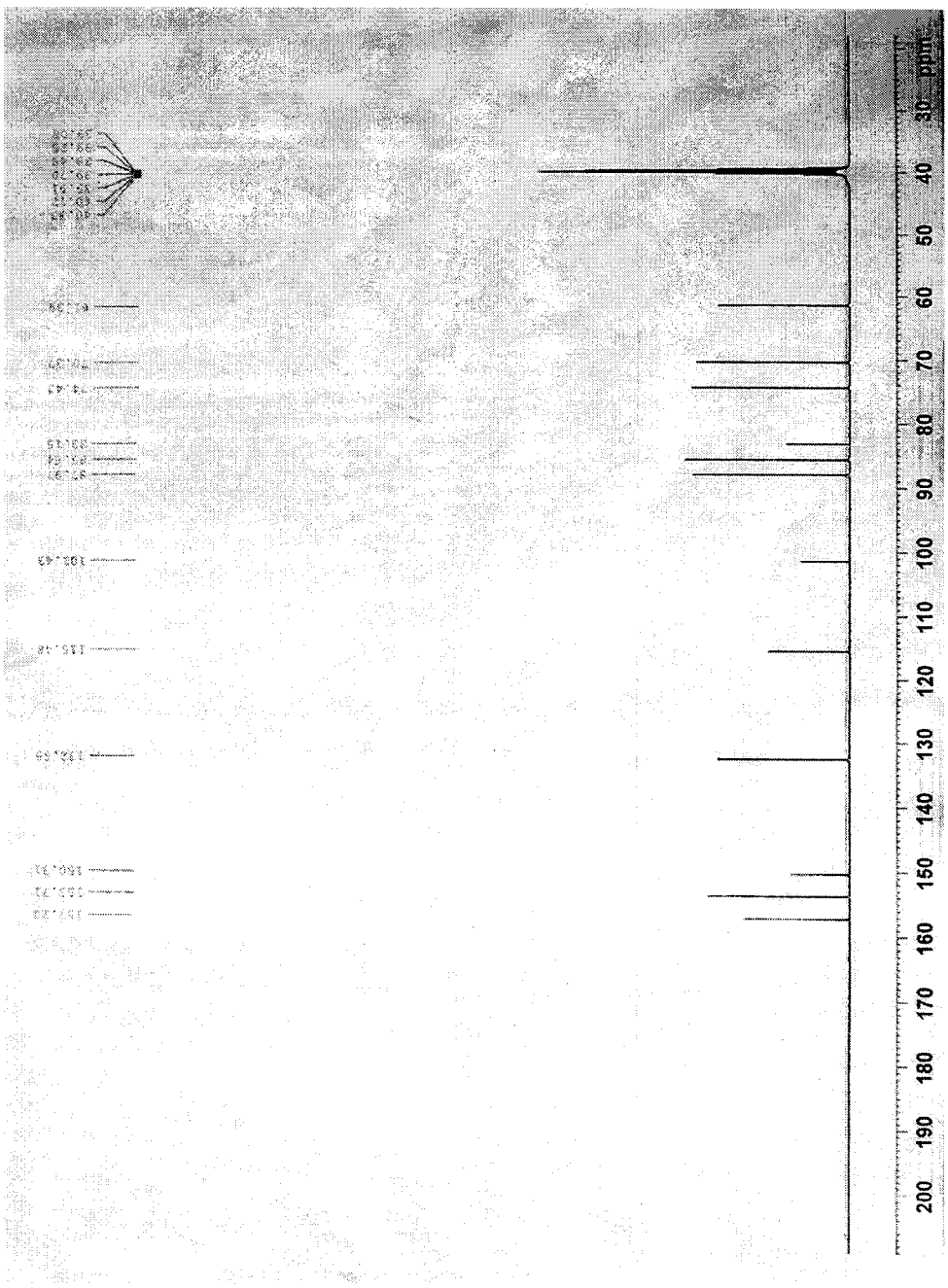


图 3 新化合物（A）核磁共振碳谱

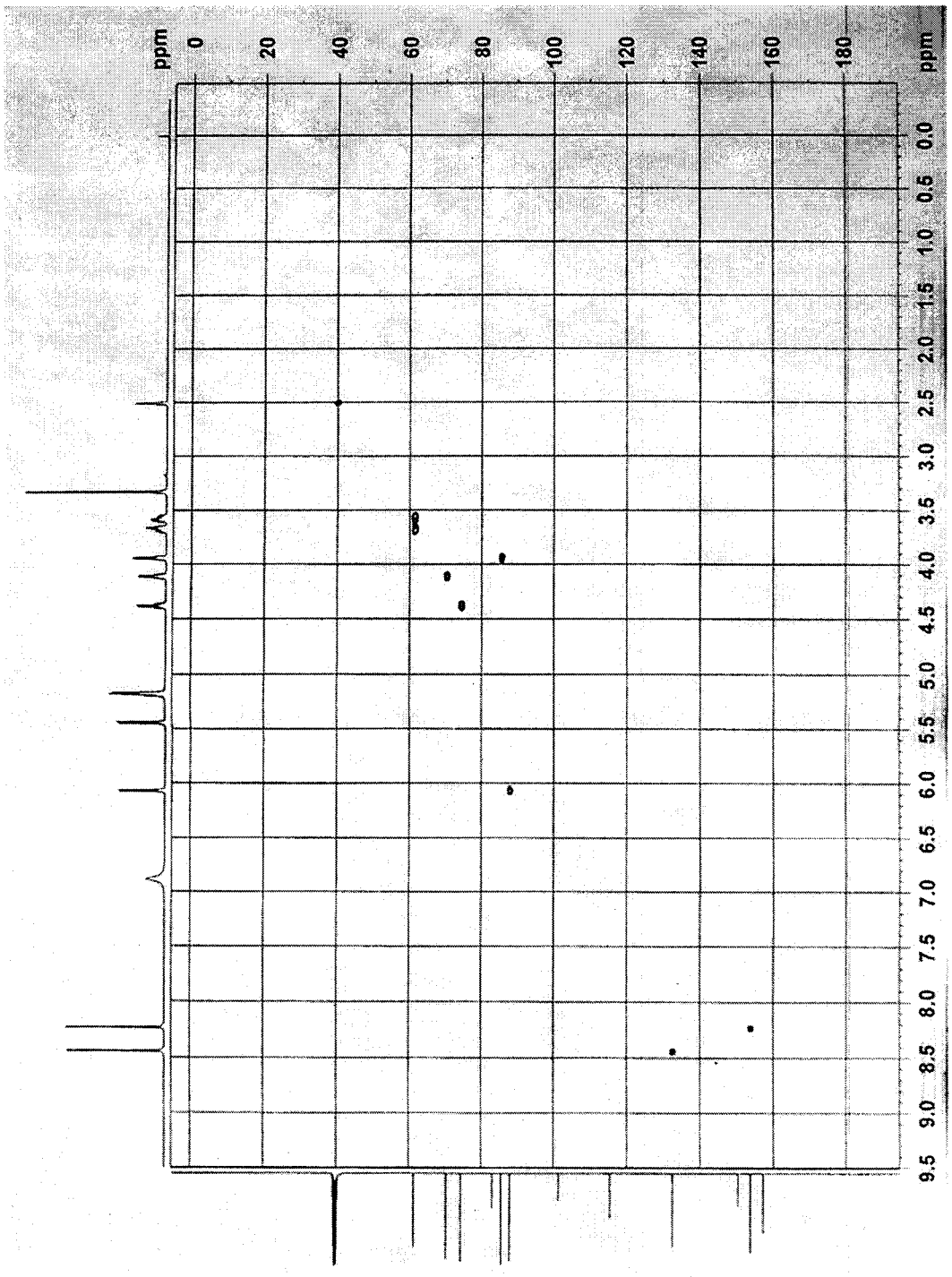


图 4 新化合物（A）核磁共振碳一氢相关谱