

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 17/04

[12] 发明专利说明书

C12P 19/60 C12P 19/26

A61K 31/70 A61P 35/00

A61P 35/02 A61P 31/00



[21] ZL 专利号 01805207. X

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1162441C

[22] 申请日 2001.2.15 [21] 申请号 01805207. X

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 18 [33] EP [31] 00103540. 1

[86] 国际申请 PCT/EP2001/001660 2001.2.15

[87] 国际公布 WO2001/060832 英 2001.8.23

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.16

[71] 专利权人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 L·弗泰斯 K·埃利希

M·克瑙夫 J·温克

F·P·巴伯纳 E·A·鲍尔斯

E·A·卡什曼

审查员 于海江

[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 唐伟杰

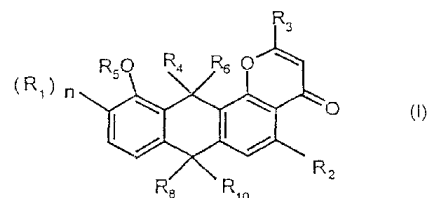
权利要求书 5 页 说明书 30 页

[54] 发明名称 Pluraflavin 和其衍生物,及它们的制备方法和用途

[57] 摘要

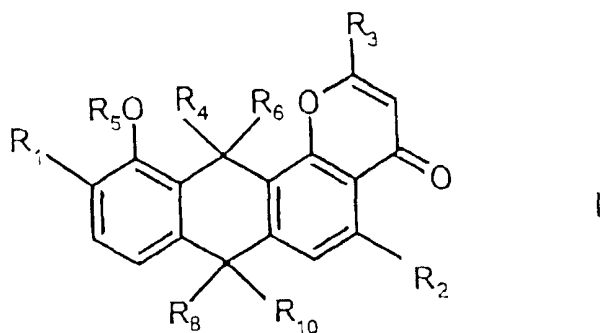
本发明涉及式(I)化合物和其生理可接受盐,其中 R_1 是糖; R_2 是 $-\text{CH}_2-\text{O}-(R_7)_m$ 、 R_7 代表糖,或 R_2 是 $-\text{COOH}$; R_3 是未取代的或被至少一个 OH 取代的、包含环氧化物的基团, C_1-C_6 烷基或 C_2-C_6 链烯基; R_5 是 H、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 链烯基或 C_2-C_6 炔基; R_4 、 R_6 、 R_8 和 R_{10} 彼此独立地是 H、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 链烯基、 C_2-C_6 炔基、 $-\text{X}_2\text{H}$ 或 $-\text{X}_2\text{R}_{12}$, 或 R_4 和 R_6 一起和/或 R_8 和 R_{10} 一起是 $=\text{X}_2$; X_2 是 O、NH、 $\text{N}-C_1-C_6$ 烷基、 $\text{N}-C_2-C_6$ 链烯基、 $\text{N}-C_2-C_6$ 炔基或 S; R_{12} 是 C

$1-C_6$ 链烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_2-C_6 炔基、芳基或酰基; 且 m 和 n 是 1 或 2。该化合物可以通过发酵从微生物放线菌目 (Actinomycetales) 的种 HAG 003959 (DSM 12931) 的培养物获得。因此,本发明涉及这些化合物的制备方法和其作为药物,例如抗肿瘤剂的用途。 $\therefore$



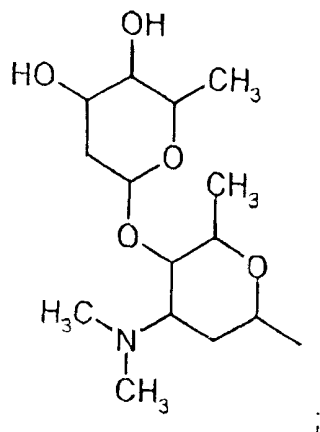
权利要求书

1. 所有立体化学形式和这些形式的任何比例混合物的式 I 化合物，以及其生理可接受盐或衍生物，

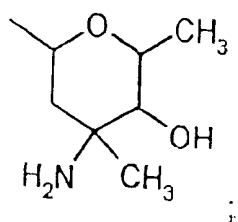


其中

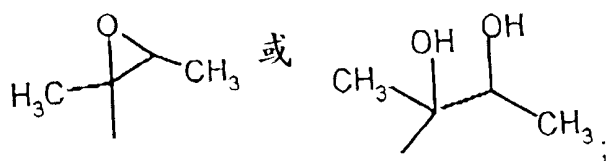
R_1 是



R_2 是 $-\text{CH}_2-\text{O}-(R_7)_m$ ，其中 R_7 是



R_3 是



R_5 选自 H 原子、 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 链烯基和 C_2 - C_6 炔基；

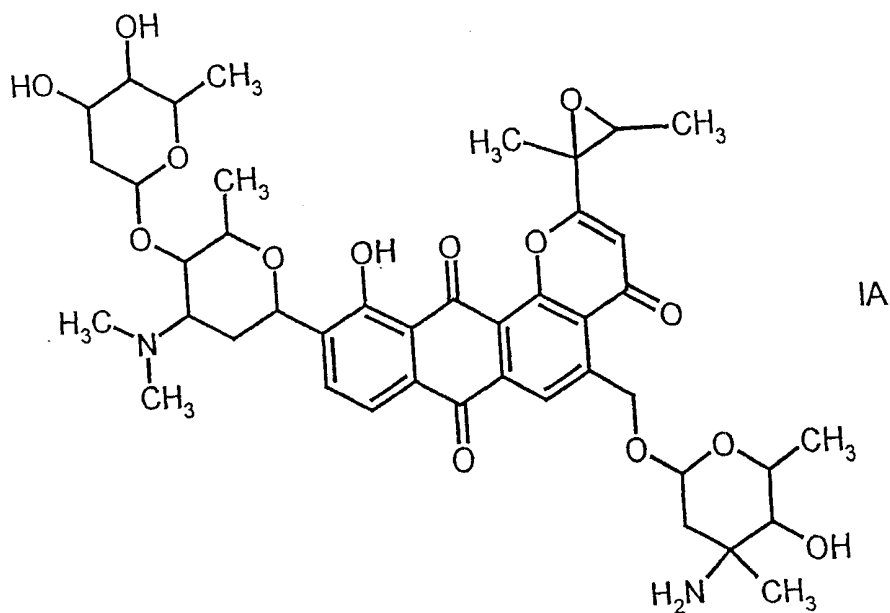
R_4 、 R_6 、 R_8 和 R_{10} 彼此独立地选自 H 原子， C_1 - C_6 烷基， C_2 - C_6 链烯基， C_2 - C_6 炔基， $-X_2H$ 基团，其中 H 直接与 X_2 的第一个原子键合，和 $-X_2R_{12}$ ，其中 R_{12} 直接与 X_2 的第一个原子键合，并且任选地 R_4 和 R_6 一起是双键连接的 $-X_2$ 基团，任选地 R_8 和 R_{10} 一起是双键连接的 $-X_2$ 基团，

其中所有的 X_2 均独立地选自氧原子、 $-NH$ 基团、 $-N$ - C_1 - C_6 烷基、 $-N$ - C_2 - C_6 链烯基、 $-N$ - C_2 - C_6 炔基和硫原子，

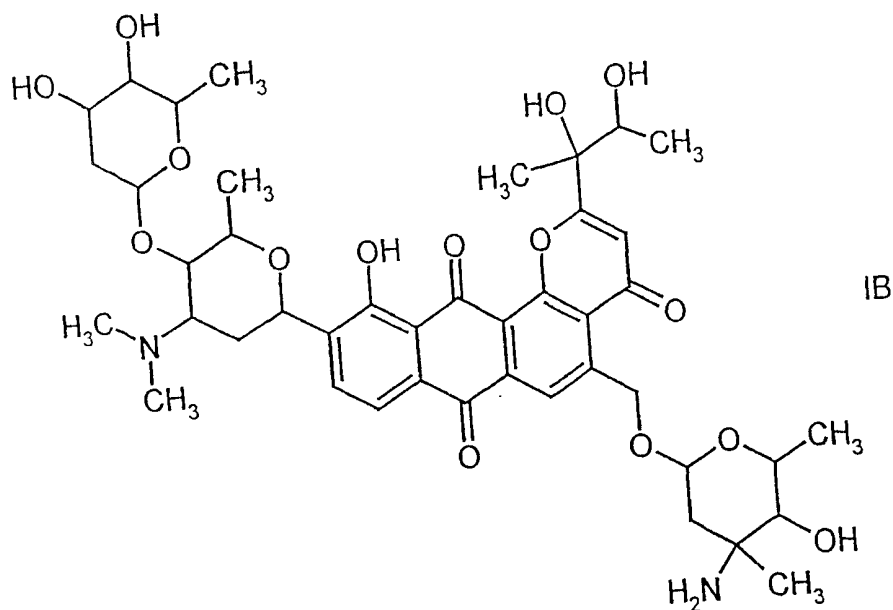
其中所有的 R_{12} 均独立地选自 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 链烯基、 C_2 - C_6 炔基、芳基和酰基；且

m 选自 1 和 2。

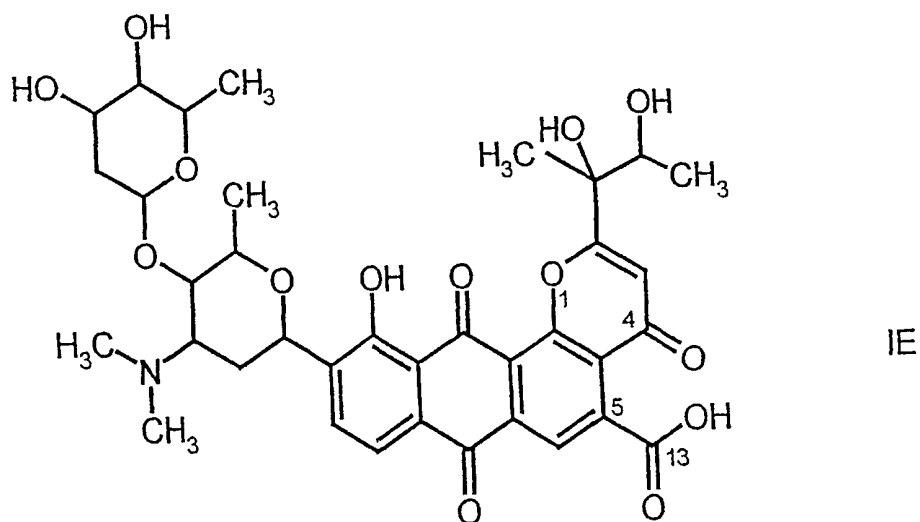
2. 具有式(IA)的根据权利要求 1 的所有立体化学形式和这些形式任何比例混合物的化合物，以及其生理可接受盐或衍生物



3. 具有式(IB)的根据权利要求1的所有立体化学形式和这些形式任何比例混合物的化合物, 以及其生理可接受盐或衍生物



4. 具有式(IE)的根据权利要求1的所有立体化学形式和这些形式任何比例混合物的化合物, 以及其生理可接受盐或衍生物



5. 组合物，其包含至少一种根据权利要求 1 的式(I)化合物、或生理可接受盐或衍生物，以及可接受载体。

6. 根据权利要求 5 的组合物，其中所述可接受载体是可药用载体。

7. 制备至少一种权利要求 1 的式(I)化合物或其生理可接受盐的方法，包括在适当条件在培养基中培养微生物放线菌目物种 HAG 003959, DSM 12931, 或其一种变体或突变株，直到培养基中存在至少一种式(I)化合物，随后分离该化合物。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述分离的化合物进一步转化成选自衍生物和生理可接受盐的至少一种化合物。

9. 根据权利要求 7 或 8 的方法，其中培养在有氧条件下在 18 至 35℃之间的温度下在 6 至 8 的 pH 下进行。

10. 根据权利要求 7 的方法，其中使用还原剂将式(I)化合物转化成衍生物。

11. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备细胞抑制剂中的用途。

12. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗结肠肿瘤的药物中的用途。

13. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗乳腺(乳房)肿瘤的药物中的用途。

14. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗肺肿瘤的药物中的用途。

15. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗前列腺肿瘤的药物中的用途。

16. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗白血病的药物中的用途。

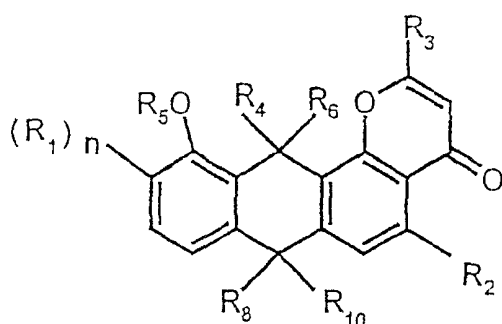
17. 根据权利要求 1 的式 (I) 化合物或其生理可接受盐或衍生物在制备治疗微生物感染的药物中的用途。

18. 放线菌目物种 (*Actinomycetales species*) HAG 003959 (DSM 12931) 。

Pluraflavin 和其衍生物, 及 它们的制备方法和用途

技术领域

本发明涉及式 I 新化合物



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_{10} 和 n 的定义如下。式 I 化合物抑制转录酶、具有抑制细胞的作用、并尤其适用于治疗肿瘤。式 I 化合物可以通过在培养基中培养放线菌目 (Actinomycetales) 物种 HAG 003959, DSM 12931 获得。因此, 本发明涉及制备式 I 化合物的方法、这些化合物在制备用于治疗恶性疾病和可以通过抑制转录酶治疗的疾病的药物中的用途、以及包含至少一种式 I 化合物的药物制剂。

背景技术

癌症是一种人类和动物疾病, 大多数情况下是致命的并通常是由内源性细胞的不受控制的生长引起的。癌症是用于指恶性肿瘤(癌)、赘生物(瘤或癌)的形成或白细胞的恶性变性和畸形成熟(白血病)的术语。癌或肿瘤细胞一般由内源性细胞转化形成。癌细胞的恶性化使其自身表现出自主性生长, 即其能够不受抑制的生长并且不会整合在器官系统中而是进行浸润, 破坏组织。恶性化的确定标志是在肿瘤细胞由血液或淋巴引起的扩散后远离肿瘤的转移性病灶的形成。癌症是最常造成人类死亡的原因之一, 因此极为需要用于消除或治疗恶性变性

的方法和药剂。

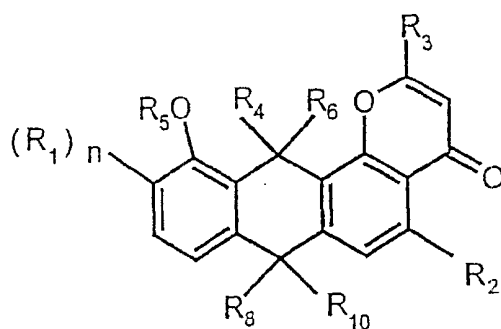
除了手术除去肿瘤的极端方法外，治疗恶性肿瘤的选择方案包括用 X 射线、 α -、 β -、 γ -射线放疗、免疫疗法和化疗。目前免疫疗法的使用仍受到限制。肿瘤的化疗应理解为是指施用细胞毒素(细胞抑制剂(cytostatics))以治疗肿瘤和通常在局部手术治疗或放射后治疗剩余的肿瘤细胞。这些物质特异地干扰细胞分裂的某些过程，以致具有高比例分裂细胞的组织如快速生长的肿瘤组织会有敏感反应。所用药剂有烷基化化合物如环磷酰胺(The Merck Index, 第 12 版, 第 463 页)、抗代谢物如氨甲蝶呤(The Merck Index, 第 12 版, 第 1025 页)、生物碱如长春新碱(The Merck Index, 第 12 版, 第 1704 页)、和抗生素如柔红霉素(The Merck Index, 第 12 版, 第 479 页)和阿霉素(The Merck Index, 第 12 版, 第 581-582 页)。然而，由于巨大的副作用，所有这些药剂均有显著的缺点，以致在许多情况下仅是延迟而非阻止患者死亡。而且，变性的(癌)细胞对所用药剂具有抗性；在此情况下，常规药物不再具有任何抑制细胞的作用，但由于副作用它们是有毒的。而且，已经发现，细胞抑制剂的组合和/或相继使用超过单个细胞抑制剂(单一治疗)的作用，因此多化疗中的相当多副作用可以不发生累加。鉴于所有这些原因，亟需新的化疗剂并在全球范围对其进行研究。

发明内容

令人惊奇的是，已经发现微生物菌株放线菌目(Actinomycetales)的种 HAG 003959(DSM 12931)能够产生极为有效的新的细胞抑制剂，其甚至在极低浓度时也能够抑制细胞的生长。下文此新化合物被称作 pluraflavin，它们与 pluraflavin 衍生物一起形成了本发明的部分主题。pluraflavin 是包含对醌型环骨架和多种糖结构单元的抗生素。它们通过插入核酸双链以及，如果适当的话，额外的烷基化来抑制转录。该环骨架首次被 S. Kondo 等在 Journal of Antibiotics, 第 30 卷第 1143-1145 页(1977)中描述为多色霉素的一部分。之后，在大量抗生素中发现了此环骨架；除了多色霉素和新多色霉素外，化合物 saptomycin (N. Abe 等, J. Antibiotics, 46, 1536-1549, 1993)、

ankinomycin (Y. Sato 等, J. Antibiotics 42, 149, 1989)、贵田霉素(N. Kanda 等, J. Antibiotics, 24, 599, 1971)、赫达霉素(U. Sequin 等, Tetrahedron, 34, 761, 1978)和 altromycin (G. M. Brill 等, J. Antibiotics, 43, 229-237, 1990)也已被描述为结构相关化合物。现有技术的物质通常具有如下缺点: 令人不满意的效果、高毒性和/或不希望的副作用。

因此, 本发明涉及式(I)化合物的所有立体化学形式和这些形式的任何比例混合物及它们的生理可接受盐,



其中

R_1 是糖基,

R_2 是 $-COOH$ 或 $-CH_2-O-(R_7)_m$, 其中 R_7 是糖基, 且

R_3 选自包含环氧化物的基团、 C_1-C_6 烷基、和 C_2-C_6 链烯基, 其中所述烷基和链烯基任选地被至少一个 OH 基团取代,

R_5 选自 H、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 链烯基和 C_2-C_6 炔基,

R_4 、 R_6 、 R_8 和 R_{10} 彼此独立地选自 H、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 链烯基、 C_2-C_6 炔基、 $-X_2H$ 和 $-X_2R_{12}$, 或

R_4 和 R_6 一起和/或 R_8 和 R_{10} 一起是 $=X_2$,

X_2 是 O、NH、 $N-C_1-C_6$ 烷基、 $N-C_2-C_6$ 链烯基、 $N-C_2-C_6$ 炔基或 S,

R_{12} 是 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 链烯基、 C_2-C_6 炔基、芳基或酰基, 且

m 和 n 彼此独立地是 1 或 2。

在式(I)中

C_1 - C_6 烷基是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基、乙基、异丙基、叔丁基和己基。

C_2 - C_6 链烯基是具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链链烯基，例如丙烯基、丁烯基和戊烯基。

C_2 - C_6 炔基是具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链链炔基，例如丙炔基、丁炔基和戊炔基。

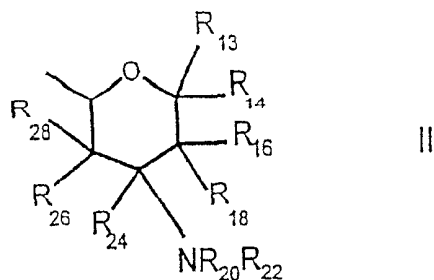
芳基是芳香环结构，例如苯基、苄基或 1-或 2-萘基。芳基可以任选地被例如卤素如氯、溴、氟、被具有 1-4 个碳原子的烷基如甲基、被羟基、被具有 1-4 个碳原子的烷氧基例如甲氧基、和/或被三氟甲基取代。

酰基可以是脂肪族或芳香族酰基。脂肪族酰基具有 1-7 个碳原子，优选 1-4 个碳原子，例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、己酰基、丙烯酰基、丁烯酰基、丙炔酰基，它还可以被例如卤素如氯、溴、氟、被氨基、和/或被具有 1-4 个碳原子的烷基氨基如甲基或乙基氨基基团取代。芳香族酰基可以例如是苯甲酰基或萘甲酰基，它还可以进一步被例如卤素如氯、溴、氟、被具有 1-4 个碳原子的烷基如甲基、被羟基、被氨基基团如例如乙基氨基、或被具有 1-7 个碳原子如 1-4 个碳原子的烷氧基如甲氧基取代。

糖 (R_1/R_7) 是单糖 ($n=1$) 或二糖 ($n=2$)，其中两个单糖通过糖苷键连接。单糖可以是己糖 ($C_6H_{12}O_6$)，例如己醛糖如 D-(+)-葡萄糖、D-(+)-甘露糖或 D-(+)-半乳糖。单糖可以是彼此独立地被 H、OH、 NH_2 、 NH (烷基)、 N (烷基) $_2$ 、烷基和烷氧基进行了单-、二-、或三-取代的，其中单糖的 H 和/或 OH 可以任选地被取代基代替。术语“糖”在本文中包括氨基糖。氨基糖是任选地按所述取代的单糖或二糖，其中该单糖或二糖的至少一个 OH-或 H-基团被氨基基团如 NH_2 、 NH (烷基)或 N (烷基) $_2$ 代替。

在一个实施方案中， m 是 1。

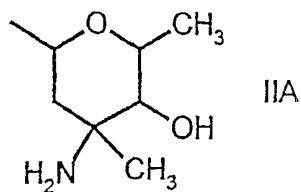
R_7 可以是式 (II) 的氨基糖基团



其中 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{16} 、 R_{18} 、 R_{20} 、 R_{22} 、 R_{24} 、 R_{26} 和 R_{28} 彼此独立地选自 H、OH、 NH_2 、NH 烷基、 $N(\text{烷基})_2$ 和烷氧基，其中烷基和烷氧基具有 1 至 4 个碳原子。

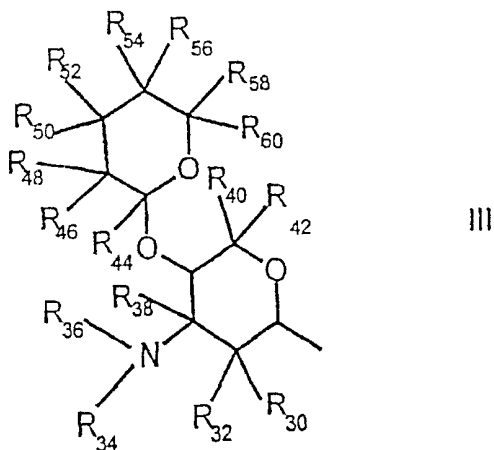
C_1 - C_4 烷基的例子有例如甲基、乙基、丙基、异丁基和丁基，尤其是甲基， C_1 - C_4 烷氧基的例子有例如甲氧基、乙氧基、异丙氧基或丁氧基，尤其是甲氧基。

R_7 可以是式 (IIA) 的氨基糖：



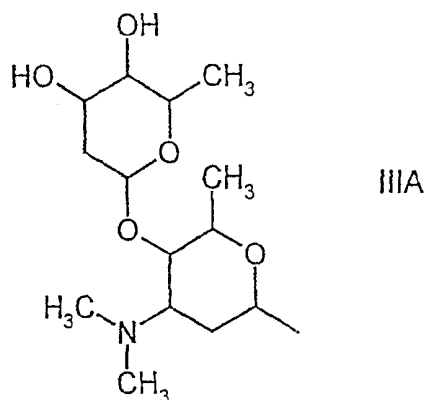
R_1 也可以是氨基糖。在一个实施方案中， n 是 2。

R_1 可以是式 (III) 的基团

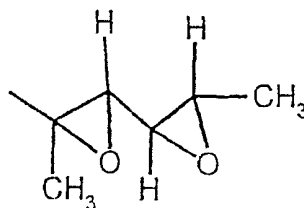
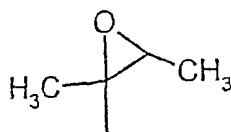


其中 R_{30} 至 R_{60} 彼此独立地是 H、OH、 NH_2 、NH 烷基、N(烷基)₂、或 O-烷基，其中烷基是 C_1 - C_4 基团如甲基、乙基、丙基、异丁基和丁基，尤其是甲基，O-烷基是 C_1 - C_4 烷氧基如甲氧基、乙氧基、异丙氧基或丁氧基，尤其是甲氧基。

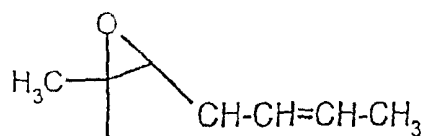
R_1 在一个实施方案中具有式 (IIIA)



R_3 可以是包含环氧化物的基团。该包含环氧化物的基团可以是具有 2 至 12 个碳原子如 2 至 6 个碳原子的直链或支链烷基或烯基，其包含一或两个环氧环（环氧环（oxiranes））。可能的例子是：

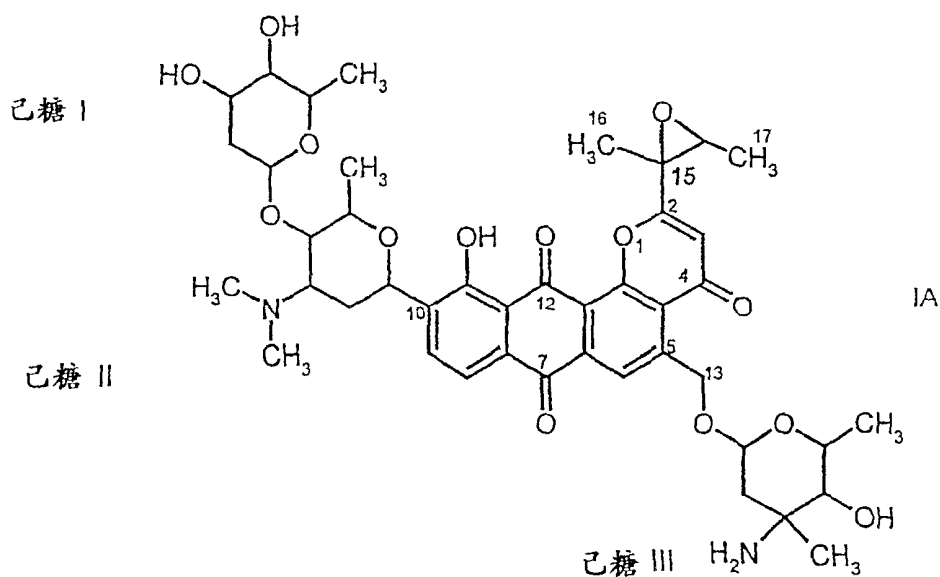


和

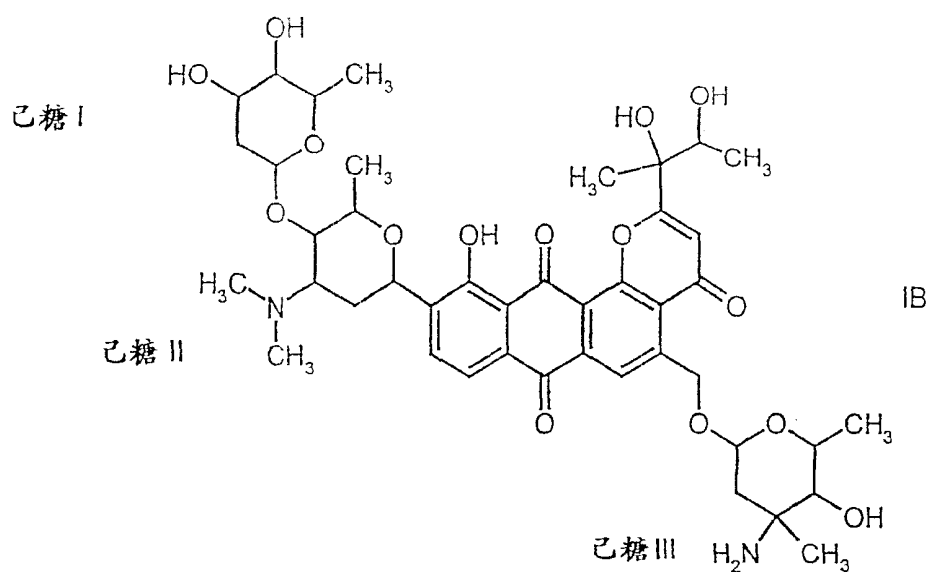


除了包含环氧化物的基团外, R_3 可以是具有 1 至 12 个碳原子如 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基例如甲基、乙基、异丙基、叔丁基、己基、及例如辛基、十二烷基, 或具有 2 至 12 个碳原子如 2 至 6 个碳原子的直链或支链链烯基如丙烯基、丁烯基、戊烯基及十二碳烯基, 其中这些烷基或链烯基还可以是单或多取代的, 例如二或三取代的, 如被羟基取代。

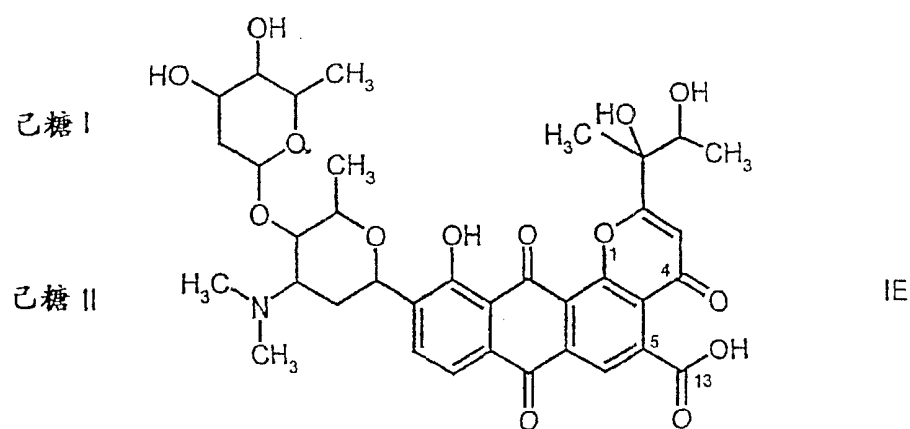
因此, 本发明涉及式 (IA) 的 pluraflavin A,



式 (IB) 的 pluraflavin B,



和式(IE)的 pluraflavin E



其中

己糖 I 是 2, 6-二脱氧己醛糖,

己糖 II 是 2, 3, 6-三脱氧-3-二甲基氨基己糖和, 且

己糖 III 是 2, 3, 6-三脱氧-3-氨基-3-甲基己醛糖;

其所有立体化学形式和这些形式的任何比例的混合物, 和它们的生理可接受盐。

在一个实施方案中, 这些化合物选自式(IA)、(IB)和(IE), 其中己糖 I 是 *oliose*,

己糖 II 是紫红霉胺(*rhodosamine*)且

己糖 III 是 3-表万古胺(3-*epi-vancosamine*)。

根据本发明, 式 I 化合物可以通过在适当条件下于培养基中培养(如发酵)放线菌目物种 HAG 003959 (DSM 12931)、或其变体或突变株, 直到该培养基中存在至少一种式(IA)、(IB)和/或(IE)的 *pluraflavin* 来获得。随后可以从培养基中分离出这些 *pluraflavin* 并对其进行纯化, 而且如果适当的话转化为化学衍生物和/或转化为它们的生理可接受盐。

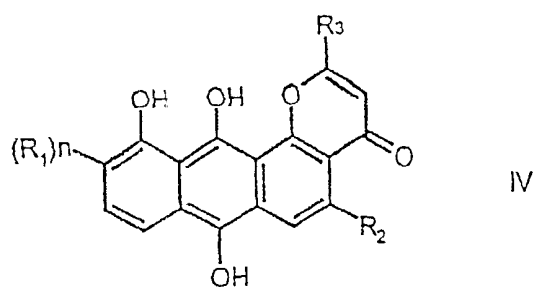
本发明还涉及制备式 I 化合物的方法, 其包含: 在适当条件下于培养基中培养(例如发酵)微生物放线菌目种 HAG 003959 (DSM 12931)、或其变体或突变株, 直到培养基中存在至少一种式(IA)、(IB)和/或(IE)的 *pluraflavin*; 从培养基中分离出这些 *pluraflavin* 中的至少一种; 和如果适当的话, 转化为化学衍生物和/或生理可接受盐。

在一个实施方案中, 菌株 HAG 003959 (DSM 12931)、其突变株和/或变体被培养在包含至少一种碳原子来源和至少一种氮原子来源及通常的无机盐的营养液(也称作培养基)中, 直到培养基中出现至少一种新的 *pluraflavin*; 随后可以从培养基中分离出这些 *pluraflavin*, 并且如果适当的话, 分离成单个活性成分。

培养可以在有氧条件下进行。培养可以在 18 至 35℃ 范围的温度和 6 至 8 范围的 pH 下进行。

在文献中, 已描述了大量用于醌的化学衍生的反应。因此, 本发明化合物的醌形式可以使用本身已知的化学反应来衍生。例如可以使用氢或使用金属氢化物如氢化铝或氢化硼催化还原成化合物的氢醌形式。再一个适当的例子是用羟胺或用其衍生物将醌转化成肟, 而肟又可以进一步被化学转化。

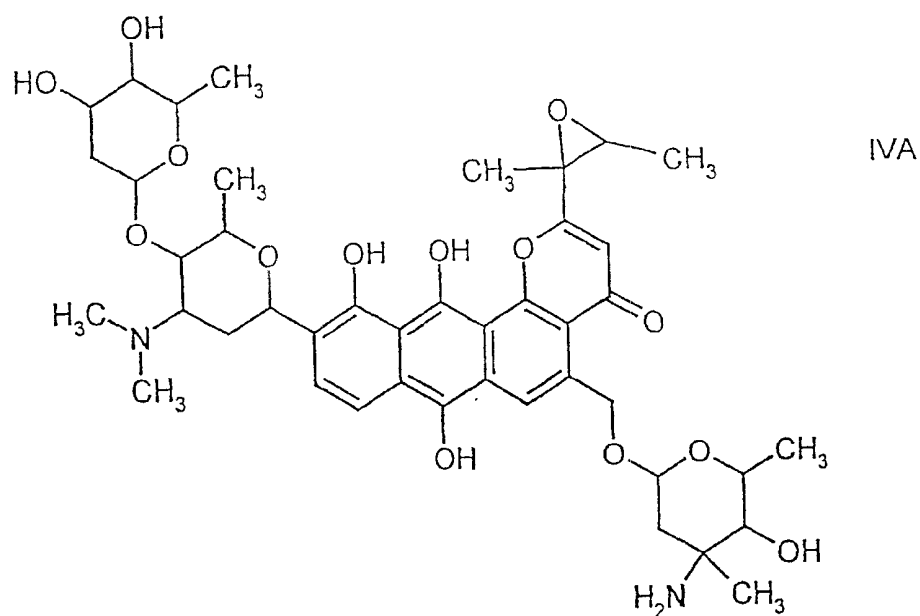
因此, 本发明涉及式(IV)的化合物的所有立体化学形式和这些形式的任何比例混合物; 和它的生理可接受盐:



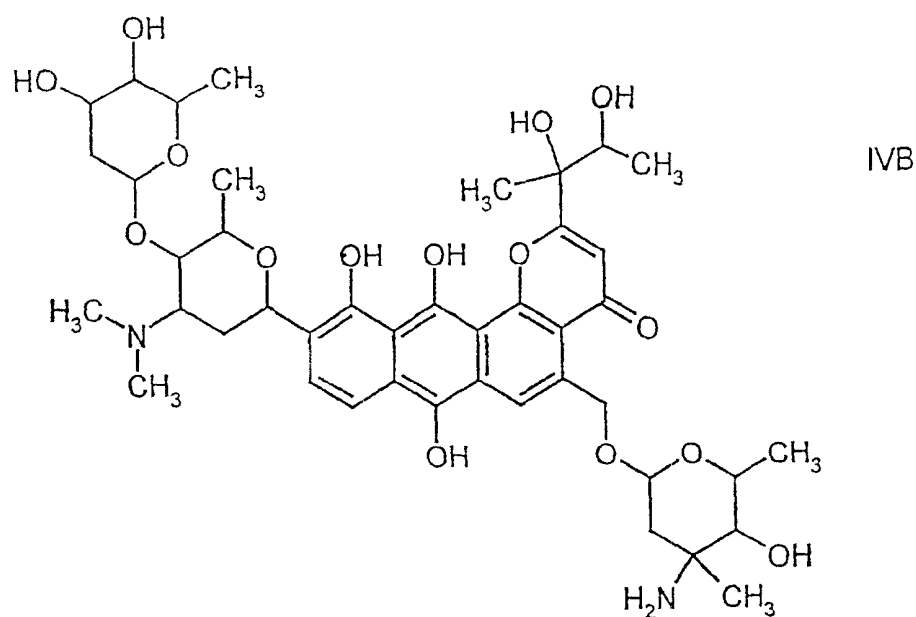
其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 n 的定义同上。

式 (IVA)、(IVB) 和 (IVE) (见下) 的 plurafavin 衍生物分别来源于式 (IA)、(IB) 和 (IE)，并且它们也形成本发明的一部分。

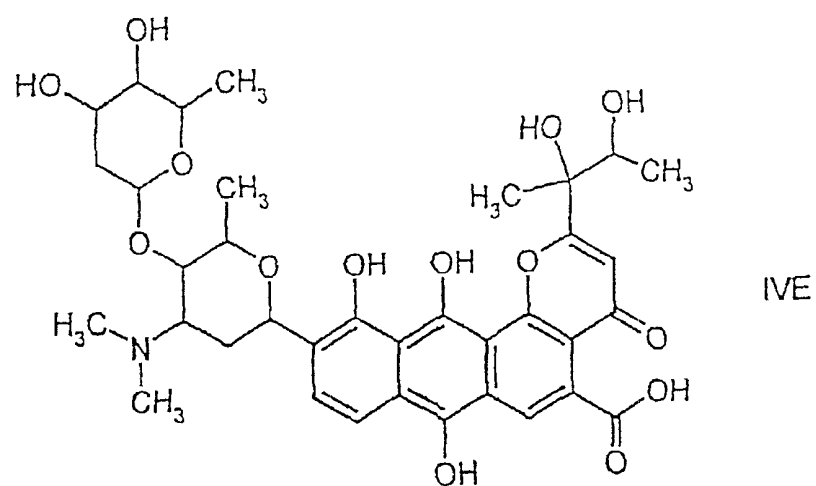
本发明还涉及：式 (IVA) 的化合物



式 (IVB) 的化合物：



和式(IVE)的化合物:



的所有立体化学形式和这些形式的任何比例混合物，以及它们的生理可接受盐。

以下，例如在至少一个实施方案中，对本发明进行详细描述。

根据本发明的 pluraflavin 是由放线菌目物种，在一个实施方案

中由放线菌目 HAG 003959 (DSM 12931) 制备的。放线菌目种 HAG 003959 (DSM 12931) 具有浅红色菌丝体并可以通过放线菌目所典型的分生孢子来鉴定。

微生物放线菌目种 HAG 003959 (DSM 12931) 的分类学检查产生如下确定该菌株的结果：通过气相色谱对重要脂肪酸进行的诊断性分析显示高比例的：

反异 15:0 脂肪酸，

异 16:0 脂肪酸(异棕榈酸)，

异 17:0 脂肪酸(异十七酸)，

反异 17:0 脂肪酸(反异十七酸)和

顺[9] 18:1 脂肪酸(油酸)；和较低浓度的其它脂肪酸。

该脂肪酸组成分布图使得放线菌目 HAG 003959 (DSM 12931) 在分类学上被指定为 *Saccharothrix* 属。

该微生物的分离菌根据布达佩斯条约的规定于 1999 年 7 月 16 日保藏在德意志微生物保藏中心 (Deutschen Sammlung von Mikorrorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D 38124 Braunschweig, 德国)，编号如下：放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931。

代替菌株放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931, 也可以使用可以合成至少一种根据本发明的 pluraflavin 化合物的其突变株和变体。这些突变株可以按本身已知的方式通过物理手段如用紫外线或 X 射线放射、或化学诱变剂如甲基磺酸乙酯 (EMS)、2-羟基-4-甲氧基二苯酮 (MOB) 或 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 来产生。

根据本发明的方法可以用于实验室规模(毫升至升范围)或工业规模(立方米规模)的发酵。除非另行指出，所有的百分数均是以重量为基础。对于液体，除非另行说明，混合比例是以体积为基础。

在一个实施方案中，用于有氧发酵的碳原子来源是可同化的糖和糖醇，如葡萄糖、乳糖、蔗糖或 D-甘露糖醇，和包含烃的天然产物如麦芽汁。用于培养的适当氮原子来源是：氨基酸、肽和蛋白质及它们

的降解产物如脲或胰蛋白脲、以及肉膏、酵母提取物、磨碎的种子如玉米、小麦、菜豆、大豆或棉花的种子、醇产物的蒸馏残余物、肉粉或酵母提取物、和铵盐和硝酸盐。包含在营养液中的无机盐可以例如是碱金属或碱土金属、铁、锌、钴和镁的氯化物、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐。

根据本发明的 pluraflavin 在如下培养基中形成，所述培养基包含约 0.1 至 5% (如 0.3 至 2%) 葡萄糖以及 0.2 至 5% (如 0.5 至 3%) 大豆粉和 0.05% 至 2% (如 0.2 至 1.0 g/l) 玉米浆和 0.05 至 1.0 g/l (如 0.1 至 0.5%) 碳酸钙和 0.05 至 1.0 g/l (如 0.1 至 1.0 g/l) 氯化钠。在所有情况下百分数均是以整个培养基的重量为基础。

在此培养基中，放线菌目种 HAG 003959 (DSM 12931) 产生 pluraflavin 的混合物。根据培养基的组成，至少一种根据本发明的 pluraflavin 的比例是可以改变的。而且，通过培养基的组成，可以控制各个 pluraflavin 的合成，以便微生物根本不产生其中的一种或多种 pluraflavin，或产生的量低于检测界限。

在一个实施方案中，该培养物包含一种可检测的 pluraflavin。在其它实施方案中，形成 pluraflavin A、B 或 E。

除了 pluraflavin A、B 和 E (分别是式 (IA)、(IB) 和 (IE) 的化合物)、其它相关化合物 (由于其不同的糖基化而与式 (IA)、(IB) 和 (IE) 所代表的化合物不同) 也可以在放线菌目种 HAG 003959 (DSM 12931) 的培养基中形成。因此，检测到作为副产物的具有 974 Da 分子量的其它 pluraflavin (pluraflavin C) 和 692.77 分子量的 pluraflavin A 降解产物 $C_{37}H_{44}N_2O_{11}$ 。在最后一化合物中，丢失己糖 I；在酸性条件下，2,6-二脱氧己醛糖可以从 pluraflavin A 上通过水解被切除。

有氧培养该培养物，即例如将其浸没在摇瓶或发酵罐中进行摇动或搅拌，如果适当的话引入空气或氧。该微生物的培养可以在约 18 至 35℃ 如约 25 至 32℃ (包括 27 至 30℃) 的温度范围中进行。pH 通常应在 6 至 8 如 6.5 至 7.5 的范围。在这些条件下，该微生物一般培养 24 至 300 个小时如 36 至 140 个小时。

培养有利地在几个阶段进行,即首先在液体营养培养基中制备至少一个预培养物,然后将它例如以 1:10 的体积比接种在实际的生产培养基即主培养基中。例如,可以通过将菌丝体接种在营养液中并允许其生长约 36 至 120 个小时如 48 至 96 个小时,获得该预培养物。菌丝体可以例如通过允许菌株在固体或液体营养培养基上如麦芽-酵母琼脂或燕麦粉琼脂上生长约 3 至 40 天如 4 至 10 天来获得。

发酵过程可以通过培养物的 pH 或菌丝体的体积、以及通过层析方法如薄层层析或高压液相色谱、或通过检测生物学活性来监测。在菌丝体和培养物的过滤物中均可以发现根据本发明的 pluraflavin。该分离方法如下,一般用来纯化根据本发明的 pluraflavin,例如纯化 pluraflavin A、B 和 E。

从培养基中分离和/或纯化根据本发明的 pluraflavin 可以在考虑这些天然产物的化学、物理和生物学性质的情况下通过已知方法进行。为了测试培养基中或各个分离阶段中 pluraflavin 的浓度,可以使用薄层层析(例如使用氯仿/甲烷/冰醋酸/水混合物(如 8:1:1:0.2 的比例)作为移动相在硅胶上进行的薄层层析)、或 HPLC。在薄层层析分离过程中,可以例如使用染色试剂如 α -萘酚/硫酸来进行检测,其中可以将形成的物质的量方便地与标准溶液比较。

根据本发明,pluraflavin 可以从菌丝体或培养基分离。一般地,菌丝体通过常规方法最先从培养基中分离出来,随后使用任选地水可互溶的有机溶剂从细胞材料中提取出 pluraflavin。有机溶剂相含有根据本发明的 pluraflavin;如果适当的话,在减压下对它们进行浓缩和进一步纯化,见下述。

如果适当,将培养物滤液与菌丝体提取物的浓缩物混合,用适当水不混溶的有机溶剂如正丁醇提取。然后分离有机相,适当地,在减压下浓缩。为了使目的产品脱脂,将浓缩物用本发明 pluraflavin 仅少量可溶的非极性溶剂如己烷、石油醚、二乙醚稀释。这造成 pluraflavin 沉淀,亲脂性杂质保持不溶,并通过常规固-液相分离除去。含有所有待分离 pluraflavin 的沉淀溶解于原体积 1/30 的水/

甲醇。将沉淀完全溶解,并冻干。冻干物(以下称作粗产品)包含 0.5-50 % pluraflavin, 用于进一步分离。

根据本发明的一或多种 pluraflavin 的进一步纯化通过在适当材料上,如在分子筛上,在正要载体如硅胶、氧化铝上,在离子交换树脂上或在吸附树脂上和/或反相介质(RP)上经层析进行。借助该层析,分离 pluraflavin. pluraflavin 的层析采用缓冲的水溶液或水溶液和有机溶液的混合物进行。

水溶液或有机溶液的混合物理解为浓度为 10 - 80 % 溶剂,如 40 - 60 % 溶剂的所有水互溶的有机溶剂如甲醇、丙醇和乙腈,或可与有机溶剂互溶的其它所有缓冲水溶液。可使用的缓冲剂可以是和如上所述的相同。

基于不同极性的 pluraflavin 的分离可以借助反相层析,如在 MCI® (吸附树脂,来自 Mitsubishi, 日本)或 Amberlit XAD® (TOSHAAS) 上,在其它疏水材料上,如在 RP - 8 或 RP - 18 相上进行。而且,分离可借助正相层析例如在硅胶、氧化铝等上进行。

pluraflavin 的层析可以使用缓冲的或酸化的含水溶液或含水溶液与乙醇或其它水可互溶有机溶剂的混合物进行。所有有机溶剂可以是丙醇和乙腈。

缓冲的或酸化的含水溶液应理解为是指例如水、磷酸缓冲液、乙酸铵、柠檬酸缓冲液,浓度从 1mM 至 0.5M, 以及甲酸、乙酸、三氟乙酸或本领域技术人员已知的所有商品酸,例如浓度从 0.01 至 3 % 如从 0.1%起。

层析可以使用起始于 100 % 的含水缓冲液并终止于 100 % 的溶剂的梯度进行;例如使用 10 - 50 % 的 2-丙醇或乙腈线性梯度。

或者,还可以在疏水相上进行凝胶层析或层析。

凝胶层析可以在聚丙烯酰胺或混合的聚合物凝胶上进行,例如 Biogel-P 2® (Biorad)、Fractogel TSK HW 40® (Merck, 德国或 Toso Haas, 美国)或在 Sephadex® (Pharmacia, Uppsala, 瑞典)上进行。

上述层析的顺序可以是反相的。

对于 pluraflavin, 另一个高效纯化步骤是结晶。pluraflavin 可以在有机溶剂中从溶液中和从水和有机溶剂的混合物中结晶。可以以本身已知的方式, 例如浓缩或冷却饱和的 pluraflavin 溶液, 进行结晶。

根据本发明的 pluraflavin 在固体状态和具有 3-8 的 pH 的溶液 (例如 pH4 至 6) 中是稳定的, 并且由此可以将它们并入常规药物制剂中。

式(I)的 pluraflavin 和其化学衍生物可以通过本领域已知的方法转化成相应的生理可接受盐。

式(I)化合物的生理可接受盐应理解为是指它们的有机和无机盐, 例如 Remington 氏药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) (第 17 版, 第 1418 页 (1985)) 中描述的那些。基于物理和化学稳定性及溶解性, 钠、钾和铵盐尤其是酸性基团的可能实施方案; 盐酸、硫酸、磷酸盐, 或羧酸或磺酸盐如乙酸、柠檬酸、苯甲酸、马来酸、延胡索酸、酒石酸和对甲苯磺酸的盐尤其是碱性基团的可能实施方案。

本发明还包括式(I)化合物的如下明显化学对应物 (本文又称作 '衍生物'), 它们具有轻微的化学差异, 即具有相同的活性或可以在温和条件下被转化成根据本发明的化合物。所述对应物包括例如根据本发明的化合物的酯和醚、络合物及还原产物。

酯和醚衍生物以及还原产物可以通过文献, 例如高等有机合成 (Advanced Organic Synthesis), 第 4 版, J. March, John Wiley & Sons, 1992 中的描述方法来制备。例如, 式(I)化合物的羧基基团 (式 IE, IVE) 和羟基基团可以被转化成酯基或醚基。这些酯包括例如 (C₁-C₄) 烷基酯。这些醚包括例如该羟基基团的缩醛和酮。

式(I)化合物的稳定络合物可以使用生理可接受无机阳离子如钙或镁形成。

本发明包括式(I)化合物的所有立体异构形式。式(IA)、(IB)和(IE)化合物的不对称中心在所有的情况下可以彼此独立地具有 S 构型或 R 构型。包含环氧化物的基团的环氧可以在任何位置; 例如并入碳原子

2'和 3'的环氧。本发明包括所有可能的对映体和非对映体，以及至少两种立体异构形式的任何比例混合物，例如对映体和/或非对映体的混合物。因此，本发明提供对映体纯形式、左旋和右旋对映体形式、R和 S 构型、外消旋物形式和两种对映体的任何比例混合物形式的对映体。如果有顺/反异构，本发明提供顺式形式和反式形式以及这些形式的任何比例混合物。

由于其有用的药理学性质，根据本发明的化合物适合用作人类药物和/或兽药。它们具有抗生素活性，以及抗细菌作用、抗真菌即抑制真菌（包括植物致病真菌）的作用、抗原生动物和抗寄生虫性质。

根据本发明的化合物可以用于癌症，例如用作化疗剂。由于其抑制细胞的性质，例如其有利的抗肿瘤活性和抗微生物作用，它们可以用作例如动物和人类中恶性变性的细胞抑制剂。

对于发展出对常规药剂具有抗性的肿瘤细胞，仅新药剂具有治疗上足够的作用。因此，根据本发明的式(I) pluraflavin 和其衍生物具有潜在的优良活性，甚至对于这些成问题的细胞类型也是如此。

本发明还涉及包含根据本发明的至少一种 pluraflavin 和/或其衍生物的药物制剂。pluraflavin 可以和至少一种适合的辅助剂或赋形剂一起在混合物中使用。用于人类的赋形剂可以是所有可药用赋形剂和/或辅助剂。

本发明还涉及制备根据本发明的药物的方法，包括使用药理学适合的和生理可接受的赋形剂以及如果适当的话还有适当的活性化合物、添加剂或辅助剂，将根据本发明的至少一种化合物制成适当的给药形式。

根据本发明的药物一般口服、局部或肠胃外给药，但也可以直肠给药。适合的固体或液体药物制剂形式有例如颗粒、粉末、片剂、包衣片剂、(微)胶囊、栓剂、糖浆、乳剂、悬浮液、气雾剂、滴剂或一次用量形式的针剂、和具有活性化合物缓释性质的制剂、在此制剂中赋形剂和添加剂和/或辅助剂，如崩解剂、粘合剂、包衣剂、溶胀剂、助流剂或润滑剂、调味剂、增甜剂或稳定剂是常规使用的。可以提及

的常用赋形剂或辅助剂有例如碳酸镁、二氧化钛、乳糖、甘露糖醇和其它糖、滑石、乳蛋白、明胶、淀粉、维生素、纤维素和其衍生物、动物或植物油、聚乙二醇和溶剂如无菌水、乙醇、甘油和多元醇。

如果适当的话，可以将剂量单位微囊化用于口服给药以延缓释放或延长释放经过一个相对长的时间，例如通过将特定的活性化合物包被在或植入适合的聚合物，蜡等内。

药物制剂可以以剂量单位制成和给药，每个单位包含一定剂量的根据本发明至少一种 pluraflavin 化合物和/或其化学衍生物作为活性成分。每天，对于固体剂量单位如片剂、胶囊和栓剂，该剂量可以高达约 200mg，但可以为约 0.1 至 100mg，而对于一次用量形式的针剂溶液可以高达约 200mg，但可以为约 0.1 至 100mg。

给药的日剂量取决于哺乳动物患者的体重、年龄、性别和情况。然而，可能也需要较高或较低的日剂量。日剂量可以通过以单剂量单位或几个较小剂量单位的形式一次给药，或以细分的剂量形式按预定的间隔几次给药。

本发明在以下实施例中进一步举例说明。除非另行说明，百分数以重量为基础。对于液体，混合比例以体积为基础。

以下是本发明的举例说明性实施例，但不是对本发明范围的限制。

实施例

实施例 1

制备放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931 的甘油培养物

在无菌 300ml Erlenmeyer 摇瓶的 100ml 营养液(麦芽提取物 2.0%、酵母提取物 0.2%、葡萄糖 1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.05%, pH 6.0) 中接种放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931 菌株，并在旋转摇床上 28℃、180rpm 解育 7 天。然后用 1.5ml 99%浓甘油稀释 1.5ml 该培养物，并贮存在-20℃。

实施例 2

在 Erlenmeyer 摇瓶中制备放线菌目 HAG 003959, DSM 12931 的培养

物或预培养物

含有 100ml 以下营养液的无菌 300ml Erlenmeyer 摇瓶: 15g 葡萄糖/l、15g 大豆粉/l、5g 玉米浆/l、2g/l CaCO_3 和 5g/l NaCl, 在其中接种生长在斜面管(相同的营养液, 但具有 2% 琼脂)上的培养物, 或接种 1ml 甘油培养物(见实施例 1), 然后在摇床上 180rpm 于 30℃ 解育。在约 120 小时后至少一种根据本发明的 pluraflavin 化合物达到最大产量。为了接种 10 和 200 l 发酵罐, 来自相同营养液的 48 至 96 小时老浸没培养物(接种量约 10%)是足够的。

实施例 3

制备 pluraflavin

在以下条件下操作 9 l 发酵罐:

营养培养基:	15g/l 葡萄糖;
	15g/l 大豆粉;
	5g/l 玉米浆, 固体;
	2g/l CaCO_3 ;
	5g/l NaCl;
	pH 7.0 (灭菌前)
发酵过程的时间:	92 小时
解育温度:	28℃
搅拌速度:	300 rpm
通气:	5 l min ⁻¹

通过反复添加乙醇的多元醇溶液(ethanolic polyol solution), 可以任选地抑制泡沫的形成。在约 70 至 96 小时达到最大产量。

实施例 4

从放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931 的培养溶液中分离 pluraflavin 的混合物

在放线菌目种 HAG 003959, DSM 12931 的发酵终止后, 根据实施例 3 获得的发酵罐培养液(90 升), 通过加入约 2% 助滤剂(例如

Celite®)进行过滤,然后用3升甲醇抽提细胞物质(0.6升)。通过过滤使含有活性化合物的甲醇溶液与菌丝体分开,然后在减压下浓缩。浓缩物与培养物滤过物(7升)加在制备的0.4升®MC1 GEL, CHP20P柱上。使用水中的0.1%乙酸至2-丙醇中的0.1%乙酸构成的梯度进行洗脱。将柱体流过物(每小时1.2升)收集在馏分中(每个0.25升),汇集含有pluraflavin的馏分(20至23)。在减压下浓缩并冻干,得到1.4g棕色粉末。

实施例 5

凝胶层析富集 pluraflavin

将根据实施例 4 获得的 1.4g 产物加载在容量 3.9 升装有 Fractogel® TSK HW-40 的柱(宽×高=10cm×50cm)上。移动相水/乙腈(1:1)以每分钟 50ml 的流速泵过柱,将柱体流过物收集在馏分(65ml)中。pluraflavin 主要在馏分 13 至 16 中。将它们汇集并在减压下脱去溶剂。产生 130mg pluraflavin 混合物。

实施例 6

在反相 RP-18 上分离 pluraflavin 成分

用®Nucleosil 100-7 C18 HD 装填容量 122ml (1.25cm (ID)×25 cm H)的制备型 HPLC 柱,将根据实施例 5 获得的 130 mg pluraflavin 混合物上样。使用 10% 乙腈和 0.1M 乙酸铵水溶液进行洗脱。流过柱体的速度是 50ml/分钟,并在所有的情况下收集 50ml 量的馏分。馏分 6 包含 pluraflavin E, pluraflavin C 在馏分 12 至 17 中, pluraflavin B 在馏分 25 至 27 中, pluraflavin A 在馏分 35 至 37 中。在减压下浓缩并冻干后,获得以下量:

pluraflavin A: 22 mg, ESI+ MS: 823 Da (M+H)⁺,

pluraflavin B: 18 mg, ESI+ MS: 841 Da (M+H)⁺,

pluraflavin C: 11 mg, ESI+ MS: 974 Da (M+H)⁺,

pluraflavin E: 5mg, ESI+ MS: 712 Da (M+H)⁺.

实施例 7

pluraflavin A 的最终纯化和向三氟乙酸盐形式的转化

根据实施例 6 获得的组分 35 至 37 在冻干后 (22 mg) 溶解在 10% 乙腈水溶液中, 用三氟乙酸调节 pH 至 2.8, 并加载在 250/10 LiChrospher RP-18e (5 μ m)®柱上。用在 11 至 22% 乙腈中的 0.05% 含水三氟乙酸进行洗脱。在减压下进行浓缩然后冻干, 得到 18mg pluraflavin A-三氟乙酸盐。

实施例 8

鉴定 pluraflavin A

外观: 深黄色物质, 溶于极性有机溶剂但仅少量溶于水。酸加成盐是可溶于水的。化合物在中性和弱酸性介质中是稳定的, 但在碱性和强酸性范围内是不稳定的。

UV-最大值: 在水/乙腈 (8:2) pH2 中 214, 243, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm, 和在水/乙腈 (6:4) pH7 中 214, 243, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm。

IR 带: 3424, 1680, 1600, 1464, 1427, 1300, 1203, 1131, 1066, 1009, 801, 721 cm^{-1} 。

通过高分辨率质谱, 对于 $(M+H)^+$ 发现以下分子量: 823.370631 Da, 相应于 pluraflavin A 的经验式 $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{14}$ 。通过 MS/MS 碎裂, 电子喷射离子化 (ESI, 正) 产生以下离子: 823, 693, 680, 550, 480, 390, 320, 144 和 131 Da。

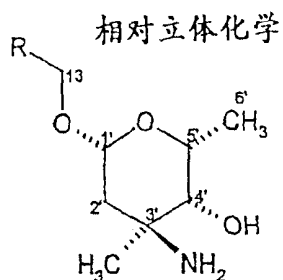
NMR 信号: 见表 1。

表 1: 在甲醇- d_4 和 DMSO- d_6 中 300°K 下 pluraflavin A 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移

位置	甲醇- d_4		DMSO- d_6	
	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)
2	168.39	-	165.62	-
3	111.95	6.37 s	110.39	6.27 s
4	180.25	-	177.56	-
4a	126.08	-	124.33	-
5	150.44	-	148.22	-
6	121.34	8.61 s	119.05	8.43 s
6a	138.34	-	136.28	-
7	182.68	-	181.12	-
7a	133.23	-	131.18	-
8	120.05	7.86 d	118.29	7.78 d
9	135.63	7.90 d	134.41	7.87 d
10	137.35	-	135.79	-
11	161.06	-	159.39	-
11-OH	-	-	-	13.38 s, brd
11a	118.14	-	116.43	-
12	189.12	-	187.39	-
12a	122.00	-	120.35	-
12b	157.66	-	155.50	-
13	70.83	5.38 d, 5.63 d	68.48	5.30 d, 5.51 d
14	61.17	-	59.35	-
15	63.69	3.41 q	61.61	3.48 q
16	20.24	1.92 s	19.32	1.86 s
17	13.69	1.27 d	12.93	1.22 d
1'	98.90	5.04 dd	96.57	5.06 d, brd
2'	37.24	2.05, 2.12	35.50	1.87, 1.95
3'	58.32	-	56.33	-
3'Me	24.57	1.50 s		1.35 s
3'NH ₂	-	-	-	8.16 s, brd
4'	71.15	3.27 s, brd	68.65	3.17 d
4'-OH	-	-	-	5.47 d
5'	70.44	4.00 q	68.19	4.01 q

位置	甲醇 -d ₄		DMSO-d ₆	
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)
6'	17.21	1.34 d	16.75	1.18 d
1''	70.23	5.51 t	68.21	5.44 brd
2''	28.00 brd	2.48 m, 2.91 m, brd		2.35 brd, 2.78 brd
3''	65.19	3.45 m, brd	62.19	3.43 brd
3''NMe	43.24 brd, 41.65 brd	3.05 brd, 3.05 brd	42.14, 39.25	2.89, 2.97
3''NH ⁺	-	-	-	8.78 brd
4''	75.13	4.32 s, brd	71.88	4.20 s, brd
5''	72.55	3.97 q, brd	70.22	3.75 q, brd
6''	18.09	1.40 d	17.54	1.28 d
1'''	101.39	5.24 m, brd	98.89	5.11 brd
2'''	33.40	2.05, 2.10	32.07	1.75, 1.92
3'''	66.61	4.12 m	64.17	3.96 m, brd
3'''-OH	-	-	-	4.70 s, brd
4'''	71.98	3.67	70.13	3.45 brd
4'''-OH	-	-	-	4.44 s, brd
5'''	69.52	4.16 q, brd	67.05	4.10 q, brd
6'''	17.51	1.28 d	16.94	1.10 d

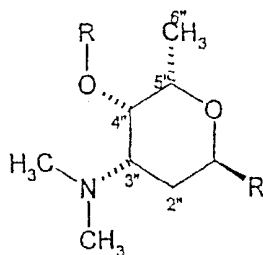
对于己醛糖 III, 观察到的 NOE 与手性中性 1'、3'、4'、5' 的相对 SRSS 或 RSRR 立体化学一致 (见 H-III)。这相应于万古胺的 C-3 差向异构体。



H-III. 己糖 III 的相对立体化学

对于己糖 II, 所观察到的 NOE 效应利于手性中心 1'', 3'', 4'', 5'' 的相对立体化学 RSSS 或 SRRR (见 H-II)。

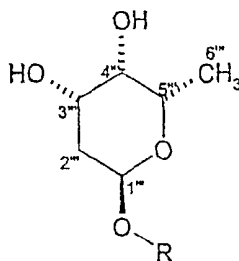
相对立体化学



H-II. 己糖 II 的相对立体化学

对于不对称碳原子 1''', 3''', 4''', 5''', 相同的相对立体化学 (RSSS, SRRR) 与检测到的己糖 I 的 NOE 是一致的 (见 H-I)。

相对立体化学



H-I. 己糖 I 的相对立体化学

实施例 9

pluraflavin B 的鉴定

外观: 深黄色物质, 溶于极性有机溶剂但仅少量溶于水。酸加成盐是可溶于水的。化合物在中性和弱酸性介质中是稳定的, 但在碱性范围内是不稳定的。

UV-最大值: 在水/乙腈(8:2) pH2 中 214, 243, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm, 和在水/乙腈(6:4) pH7 中 214, 243, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm。

pluraflavin B 具有经验式 $C_{43}H_{56}N_2O_{15}$, 分子量为 840.9 Da.

NMR 信号: 见表 2.

表 2: 与 pluraflavin A 相比, 在甲醇- d_4 中 300°K 下 pluraflavin B 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移

位置	Pluraflavin B (甲醇 - d_4)		Pluraflavin A (甲醇 - d_4)	
	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)
2	176.38	-	168.39	-
3	111.10	6.73 s	111.95	6.37 s
4	181.26	-	180.25	-
4a	125.96	-	126.08	-
5	150.43	-	150.44	-
6	121.03	8.52 s	121.34	8.61 s
6a	138.12	-	138.34	-
7	182.66	-	182.68	-
7a	133.16	-	133.23	-
8	120.04	7.81 d	120.05	7.86 d
9	135.52	7.83 d	135.63	7.90 d
10	137.44	-	137.35	-
11	161.02	-	161.06	-
11-OH	-	-	-	-
11a	118.01	-	118.14	-
12	189.24	-	189.12	-
12a	121.89	-	122.00	-
12b	157.41	-	157.66	-

位置	Pluraflavin B (甲醇 -d ₄)		Pluraflavin A (甲醇 -d ₄)	
	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)
13	70.83	5.36 d, 5.60 d	70.83	5.38 d, 5.63 d
14	77.67	-	61.17	-
15	72.61	4.40 q	63.69	3.41 q
16	23.90	1.67 s	20.24	1.92 s
17	17.00	1.35 d	13.69	1.27 d
1'	98.87	5.05 dd	98.90	5.04 dd
2'	37.20	2.09 m	37.24	2.05, 2.12
3'	58.39	-	58.32	-
3'Me	24.45	1.51 s	24.57	1.50 s
3'NH ₂	-	-	-	-
4'	71.08	3.29 s, brd	71.15	3.27 s, brd
4'-OH	-	-	-	-
5'	70.42	4.01 q	70.44	4.00 q
6'	17.19	1.33 d	17.21	1.34 d
1''	70.13	5.48 t	70.23	5.51 t
2''	27.74	2.50 m, 2.88 m	28.00 brd	2.48 m, 2.91 m, brd
3''	65.14	3.46 m	65.19	3.45 m, brd
3''NMe	43.30, 41.40	3.01 s, 3.12 s	43.24 brd, 41.65 brd	3.05 brd, 3.05 brd
3''NH ⁺	-	-	-	-
4''	75.02	4.32 s, brd	75.13	4.32 s, brd
5''	72.61	3.97 q, brd	72.55	3.97 q, brd
6''	18.15	1.39 d	18.09	1.40 d
1'''	101.38	5.24 m, brd	101.39	5.24 m, brd
2'''	33.42	2.07 m	33.40	2.05, 2.10
3'''	66.59	4.13 m	66.61	4.12 m
3'''-OH	-	-	-	-
4'''	71.97	3.67 brd	71.98	3.67
4'''-OH	-	-	-	-
5'''	69.52	4.16 q, brd	69.52	4.16 q, brd
6'''	17.49	1.27 d	17.51	1.28 d

实施例 10

pluraflavin E 的最终纯化

根据实施例 6 获得的馏分 6 在冻干后 (5mg) 溶解于水中的 10% 乙腈中, 用三氟乙酸调节 pH 为 2.8, 并加载在 250/10 LiChrospher RP-18e (5 μ m)®柱上。用 0.05% 含水三氟乙酸以 11% 至 22% 乙腈的梯度模式进行洗脱。在减压下浓缩然后干燥, 得到 2.7 mg pluraflavin E 三氟乙酸盐。

实施例 11

pluraflavin E 的鉴定

外观: 深黄色物质, 溶于极性有机溶剂但仅少量溶于水。酸加成盐是可溶于水的。化合物在中性和微酸性介质中是稳定的, 但在碱性和强酸性范围内是不稳定的。

UV-最大值: 在水/乙腈 (8:2) pH2 中 213, 244, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm, 和在水/乙腈 (6:4) pH7 中 213, 244, 270 (Sh), 290 (Sh), 426 nm。

通过质谱, 对于 (M+H)⁺ 发现以下分子量: 712 Da, 相应于 pluraflavin E 的经验式 C₃₆H₄₁NO₁₄。

NMR 信号: 见表 3。

表 3: 在甲醇- d_4 中 300°K 下 pluraflavin E 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移

位置	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)
2	176.48	-
3	110.30	6.69 s
4	178.39	-
4a	124.69	-
5	149.56	-
6	121.17	7.92 s
6a	138.95	-
7	182.40	-
7a	133.21	-
8	119.82	7.60 d
9	135.61	7.74 d
10	137.04	-
11	161.33	-
11-OH	-	-
11a	118.04	-
12	189.21	-
12a	121.59	-
12b	156.86	-
13	175.28	-
14	77.69	-
15	72.61	4.35 q
16	23.78	1.62 s
17	17.09	1.31 d
1''	70.34	5.46 dd
2''	27.35	2.86 m, 2.44 m
3''	64.88	3.50 m
3''NMe	42.5 brd	3.08
3''NH ⁺	-	-
4''	75.22	4.30 s, brd
5''	72.29	3.87 q, brd
6''	18.25	1.35 d
1'''	101.40	5.23 m
2'''	33.43	2.08 m, 2.06 m
3'''	66.61	4.12 m

位置	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)
3"-OH	-	-
4"	72.03	3.67 s, brd
4"-OH	-	-
5"	69.50	4.17 q, brd
6"	17.52	1.28 d

实施例 12

(a) 细胞抑制活性的检测

为了确定细胞抑制活性, 使用从美国典型培养物保藏中心的细胞株(保藏号 ATCC CRL-1548, Jo No. 223 和 228)获得的大鼠肝细胞。将该细胞株保持在含有 10%胎牛血清[GIBCO BRL No. 10270-106]和 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 青霉素-链霉素[GIBCO BRL No. 15140-114]的" MEM (EAGLE) with Glutamax"培养基[GIBCO BRL No. 4109-028]中。使用 96 孔微量滴定板[Greiner, No. 15140-114]。每孔最初加上 140 μl 培养营养液, 并在各种情况下接种 215,000 个细胞。然后 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下孵育这些板 20-24 小时。然后按相应的顺序移入预先制备的 pluraflavin 系列稀释物(具有 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.7813、0.3906、0.195、0.094、0.047 和 0 μM 浓度)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 气氛下再孵育 22 小时后, 然后对液体培养基通气。剩下的细胞用 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ RPMI 1640 [GIBCO BRL No. 32404-014]和 20 $\mu\text{l}/\text{孔}$ Cell Titer 96 Aqueous [PROMEGA No. G5430]染色。按上述, 加入并孵育 2 小时后直接测量 590 nm 的光吸收。从光吸收的改变计算细胞抑制作用。

pluraflavin A 的 $\text{IC}_{50} \leq 50 \text{ nM}$;

pluraflavin B 的 $\text{IC}_{50} \leq 50 \text{ nM}$;

(b) pluraflavin A 和 flavopiridol 对于所选肿瘤细胞系的抗增殖作用

在溶解时通过活性线粒体中脱氢酶切割四唑环，MTT，一种水溶性四唑盐，会被转化成不溶性紫色甲脒。死细胞不能引起此改变。该方法被用于对增殖进行定量，以便确定潜在的化疗化合物的活性。

所有的细胞都维持在含有 10% 加热灭活的胎牛血清、青霉素/链霉素并补加有 L-谷氨酰胺的 RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中。将细胞以下列密度接种在 96 孔组织培养板中：

胸	2500 个细胞/孔
前列腺	2500 个细胞/孔
结肠	1000 个细胞/孔
肺	1000 个细胞/孔

37℃、5% CO₂ 下使细胞过夜贴壁。将 pluraflavin A 稀释在培养基中，具有以下最终浓度：50.0, 16.67, 5.56, 1.85, 0.617, 0.206, 0.069, 0.023 μM。将 flavopiridol 稀释为：2.0, 0.667, 0.222, 0.074, 0.025, 0.008, 0.003, 0.001 μM。两种化合物均在所有的浓度下测试三次。用新鲜培养基洗涤细胞并将化合物以 100 μl 终体积加入细胞中。使细胞与化合物一起 37℃、5% CO₂ 下孵育近 72 小时。在期望的时间点上，向每孔加入 25 μl MTT (10 mg/ml, 在 HBSS 中)。37℃ 孵育板子 2-4 小时。除去 MTT 和培养基，向每孔加入 200 μl DMSO。在 570 nm 下读取数值。结果如下：

细胞	pluraflavin A IC ₅₀	flavopiridol IC ₅₀
胸	< 23 nM	90 nM
前列腺	10 nM	80 nM
结肠	0.35 nM	30 nM
肺	3.0 nM	90 nM

在软琼脂分析中，对白血病细胞测试 pluraflavin A 和 flavopiridol。IC₅₀ 结果是：60 nM (pluraflavin A) 和 0.5、0.6 μM (flavopiridol)。