

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310105292.7

[51] Int. Cl.

C07C 237/22 (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1296347C

[22] 申请日 2003.12.8

[21] 申请号 200310105292.7

[73] 专利权人 中国科学院海洋研究所

地址 266071 山东省青岛市南海路 7 号

共同专利权人 哈特马特·拉赤

阿甄达·皮·马斯克

[72] 发明人 秦 松 李富超

阿甄达·皮·马斯克

哈特马特·拉赤

[56] 参考文献

CN1132756A 1996.10.9 C07K5/06

WO02060858A 2002.8.8 C07C229/12

CN1037539A 1989.11.29 C12P21/02

审查员 王加松

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司

代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 2 页

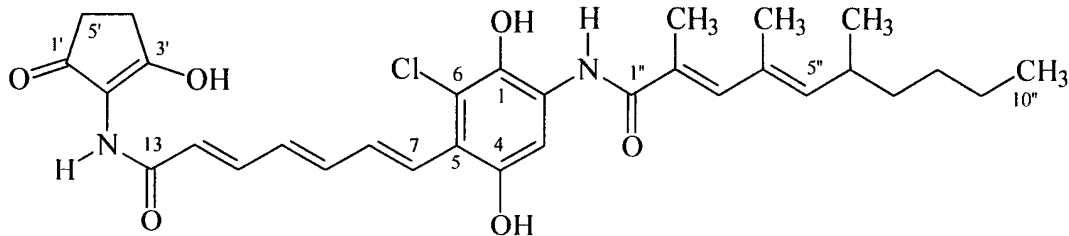
[54] 发明名称

新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物及其制备方法和应用

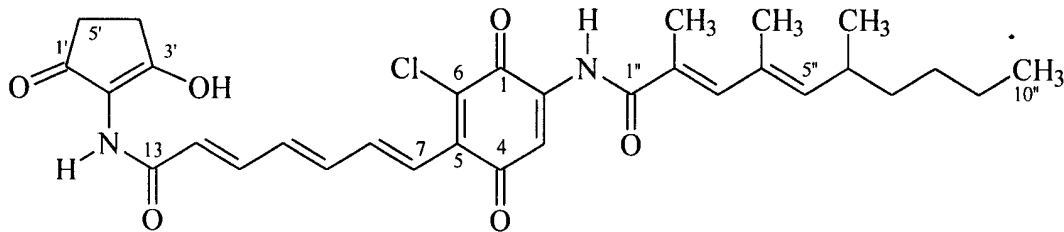
[57] 摘要

本发明属医药技术领域，具体公开一种新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物及其制备方法和应用。它是将海洋链霉菌 *Streptomyces* sp.，经发酵积累粗提物，利用硅胶层析等多种层析方法分离得到，命名为 chinikomycin A 和 B。体外抗肿瘤活性实验证明：本发明化合物对包括肺癌细胞系 LXFA 629L 和 LXFL 529L，乳腺癌细胞系 MAXF 401NL，黑色素瘤细胞系 MEXF 462NL，肾肿瘤细胞系 RXF 944L 和子宫癌细胞系 UXF 1138L 等人体肿瘤细胞有抑制作用。本发明能对开发利用我国丰富的海洋微生物资源提供可借鉴的模式。

1. 一种新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物，其特征在于：具体化学结构如下：



命名为 chinikomycin A，或



命名为 chinikomycin B。

2. 一种新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法，其特征在于按如下步骤操作：

(1) 固体培养：将海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. 接种于 M^{2+} 固体培养基，25~40℃ 培养 3~4 天，直至长出白色的孢子；

其中： M^{2+} 固体培养基：大麦提取物 10g，酵母粉 4g，葡萄糖 4g，天然海水 500ml，自来水 500ml，琼脂粉 14g，调整 pH 为 7.4；

(2) 摇床培养：接种所述白色孢子丝到鱼粉液体培养基，25~40℃ 温度下进行摇床培养，转速为 90~130rpm，培养 3~4 天后，收获发酵液；

(3) 萃取：发酵液用有机溶剂浸提 3~4 次，浓缩蒸干，得到膏状粗提物；

(4) 纯化：粗提物用环己烷浸提，溶解部分为提取物 I，不溶解部分为提取物 II；然后分别进行如下操作：

1) 提取物 I 经硅胶层析柱, 用环己烷和乙酸乙酯梯度洗脱, 得到含有化合物 chinikomycin A 的组分, 再用环己烷洗 2~3 次, 获得黄色活性化合物 chinikomycin A;

2) 提取物 II 经硅胶柱层析, 二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 得到含有活性化合物的组分, 再用环己烷和二氯甲烷洗涤 2~3 次, 得到黄色粉末状不溶物质, 经过制备型薄层层析, 于 $R_f=0.58$ 处得到红色化合物 chinikomycin B, 并回收 $R_f=0.34$ 处黄色化合物 chinikomycin A。

3. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 纯化步骤 (4) 中所得产物 chinikomycin A 可被氧化为产物 chinikomycin B, 即将产物 chinikomycin A 用二氯甲烷溶解, 缓缓加入氧化银, 搅拌, 反应直至溶液颜色由黄色完全变为红色, 蒸干溶剂后, 再用二氯甲烷溶解, 弃去沉淀不溶物, 溶解部分经过制备型薄层层析, 回收 $R_f=0.58$ 处的红色化合物, 即为 chinikomycin B。

4. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 其中纯化步骤(4)中所得产物 chinikomycin B 可还原为 chinikomycin A, 即: 将产物 chinikomycin B 用二氯甲烷溶解, 再缓缓加入连二亚硫酸钠溶液, 振荡至溶液颜色由红色变为黄色, 利用薄层层析分析, $R_f=0.34$ 处反应产物, 即为化合物 chinikomycin A。

5. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 所述浸提发酵液用有机溶剂为乙酸乙酯或甲醇; 按体积百分比计, 二氯甲烷/环己烷洗涤用量比例为 15/85 ~ 40/60。

6. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 用二氯甲烷/甲醇, 环己烷/乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱方式按体积百分比计为 100/0~0/100。

7. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 二氯甲烷和甲醇在体积百分比为 100/0 ~ 90/10 梯度下的洗脱为佳, 环己烷和乙酸乙酯在体积百分比为 50/50 ~ 0/100 梯度下的洗脱为佳。

8. 按权利要求 2 所述新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的制备方法, 其特征在于: 所述制备型薄层层析所用展开剂为二氯甲烷/甲醇, 体积用量比例为 95/5 ~ 90/10。

9. 一种按权利要求 1 所述的新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物的应用, 其特征在于: 作为制备抗肿瘤、抗菌、抗病毒药物。

新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明属医药技术领域，具体地说是一种新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物及其制备方法和应用。

背景技术

自二十世纪三十年代青霉素被发现以来，微生物成为活性先导化合物的重要来源。但是近年来，从土壤微生物中分离到新结构活性化合物的概率大幅度下降，例如目前通常从两万多株土壤微生物中才能筛选到一株能产生新结构活性化合物的菌株。再如，在所有已知的微生物次级代谢产物中，绝大部分来自土壤中的放线菌 Actinomycetes，特别是其中的链霉菌属 *Streptomyces*；然而目前的研究现状是：在 90% 的有生物活性的链霉菌中，人们很难找到新的化合物，尤其是新骨架化合物，而且这个可能性还在直线下降（文献 1: Fencial, W., Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource, *Chem. Rev.*, 1993, 93: 1673-1683）。

在耐药菌广泛出现后，尤其是近年来由于环境恶化和人口流动造成抗药性产生周期日趋缩短的问题，加之耐受药物的种类日益增多，使得人们对新型抗生素的需求比以往任何时候都更加迫切。随着恶性肿瘤发病率的不断提高，对新型抗肿瘤抗生素的需求也日益迫切。二十世纪人们将目光转向蕴藏着丰富微生物资源的海洋，海洋生态环境的特殊性和多样性，决定了海洋微生物种类及其次级代谢产物的多样性，从海洋微生物发现具有抗肿瘤和抑菌作用的先导化合物，成为发现新生物活性物质的一条解决途径。分别来自意大利撒丁岛和日本相模湾的两株海洋微生物所贡献的头孢霉素 C 和小诺（相模）霉素，充分说明了海洋微生物在产生活性先导化合物方面的潜力。特别是近年来欧美、日本等发达国家加大了对海洋微生物活性物质研究的投入力度，取得了显著进展（文献 2: Marwick, J.D., et al., Bioprocess Intensification for Production of Novel Marine Bacterial Antibiotics Through Bioreactor Operation and Design, *Marine Biotechnology*, 1999, 1(5): 495-507; 文献 3: Jensen, P.R., et al., Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, 48: 559-584）。

同陆地放线菌产生抗生素相似，海洋微生物中的海洋放线菌也是新型抗生素的重要来源。从海洋链霉菌 *Streptomyces siوياensis* SA-1758 中分离到的结构新颖、含硫和氮的生物碱 altemicidin，具有单萜骨架，显示强体外抗 L1210 淋巴瘤和 IMC 癌细胞活性， IC_{50} 分别为 0.84 和 0.82 $\mu\text{g/ml}$ ，但它对小鼠也有毒性 ($LD_{50}=0.3\mu\text{g/ml}$)。(文献 4: Takahashi, A., et al., Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance I, Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties, *J. Antibiot.*, 1989, 42 (11): 1556-1561; 文献 5: Takahashi, A., et al., Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance II, Structure determination, *J. Antibiot.*, 1989, 42 (11): 1562-1566)。分离自珊瑚 *Pacifigotgio* sp. 体表的链霉菌 PG-19，从中得到两个八元环内酯 octalactins A 和 B，octalactins A 在体外对 B16-F10 黑色素瘤细胞及人结肠癌 HCT-116 细胞有显著细胞毒性 (IC_{50} 分别为 $7.2\times 10^{-3}\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$)，而 octalactins B 无细胞毒性，这说明环氧结构是必需的活性基团。(文献 6: Fenical, W., and Jensen, P.R., In *Marine Biotechnology, Volume 1: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*; Attaway, D.H., Zaborsky, O.R., Eds.; Plenum Press: New York, 1993; pp 419-457)。

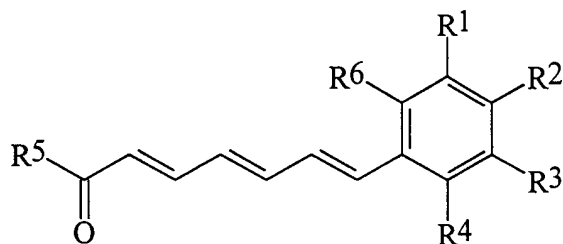
Zeeck 等 (文献 7: Zeeck, A., et al., The Structure of Manumycin, I. Characterization, Structure Elucidation and Biological Activity, *J. Antibiot.* 1987, 11: 1530-1540) 从一株链霉菌 *Streptomyces. parvulus* 中分离得到抗生素 manumycin ($C_{31}H_{38}N_2O_7$)，它对革兰氏阳性细菌以及真菌有很强的抑制作用。本发明所涉及的化合物 chinikomycin 的新颖碳骨架结构迄今为止，尚未发现有专利或文献报道。

发明内容

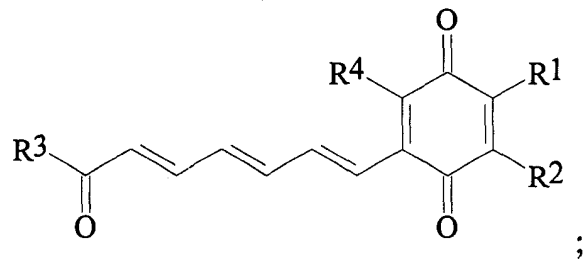
本发明目的在于提供一种新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物及其制备方法和应用。

为了实现上述目的，本发明的技术方案如下：

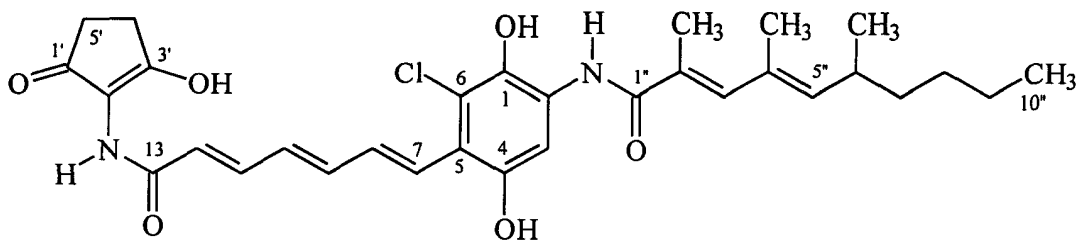
新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物，有如下化学结构：



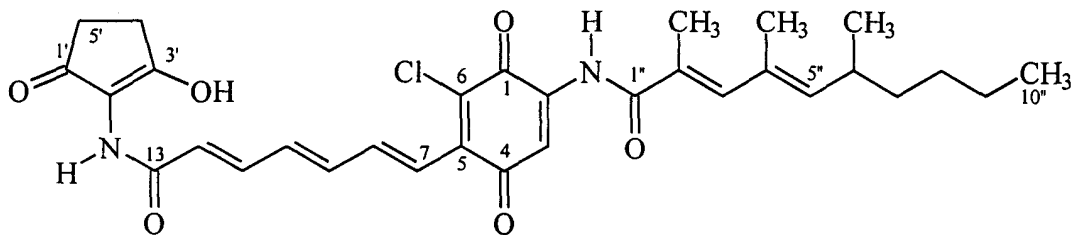
或



式中， R^1 ， R^2 ， R^3 ， R^4 ， R^5 ， R^6 为氢、羟基、烃基、芳基、芳烃基、卤代烃基、酰基、烷氧基、醛基、卤素、氨基、烃氨基、酰胺基、硫、巯基、磺酸基或羧酸基；其中化学结构可以为：



命名为 chinikomycin A；或



命名为 chinikomycin B。

其制备方法如下：

(1) 固体培养：将海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. 接种于 M^{2+} 固体培养基，25~40℃ 培养 3~4 天，直至长出白色的孢子；

(2) 摇床培养：接种所述白色孢子丝到鱼粉液体培养基，25~40℃ 温度下进行摇床培养，转速为 90~130rpm，培养 3~4 天后，收获发酵液；

(3) 萃取：发酵液用有机溶剂浸提 3~4 次，浓缩蒸干，得到膏状粗提物；

(4) 纯化：粗提物用环己烷浸提，溶解部分为提取物 I，不溶解部分为提取物 II；然后分别进行如下操作：

1) 提取物 I 经硅胶层析柱，用环己烷和乙酸乙酯梯度洗脱，得到含有化合物 chinikomycin A 的组分，再用环己烷洗 2~3 次，获得黄色活性化合

物 chinikomycin A;

2) 提取物 II 经硅胶柱层析, 二氯甲烷和甲醇梯度洗脱, 得到含有活性化合物的组分, 再用环己烷和二氯甲烷洗涤 2~3 次, 得到黄色粉末状不溶物质, 经过制备型薄层层析(Preparative Thin Layer Chromatography, PTLC), 于 $R_f=0.58$ 处得到红色化合物 chinikomycin B, 并回收 $R_f=0.34$ 处黄色化合物 chinikomycin A;

其中: 本发明采用纯化步骤(4)中所得产物 chinikomycin A 可被氧化为产物 chinikomycin B, 即将产物 chinikomycin A 用二氯甲烷溶解, 缓缓加入氧化银, 搅拌, 反应直至溶液颜色由黄色完全变为红色, 蒸干溶剂后, 再用二氯甲烷溶解, 弃去沉淀不溶物, 溶解部分经过制备型薄层层析(PTLC), 回收 $R_f=0.58$ 处的红色化合物, 即为 chinikomycin B;

另外, 采用纯化步骤(4)中所得产物 chinikomycin B 可还原为 chinikomycin A, 即: 将产物 chinikomycin B 用二氯甲烷溶解, 再缓缓加入连二亚硫酸钠溶液, 振荡至溶液颜色由红色变为黄色, 利用薄层层析(Thin Layer Chromatography, TLC)分析, $R_f=0.34$ 处反应产物, 即为黄色化合物 chinikomycin A;

本发明所述浸提发酵液用有机溶剂可以为乙酸乙酯或甲醇; 按体积百分比计, 二氯甲烷/环己烷洗涤用量比例为 15/85~40/60; 用二氯甲烷/甲醇, 环己烷/乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱方式按体积百分比计为 100/0~0/100; 二氯甲烷和甲醇在 100/0~90/10 梯度下的洗脱为佳, 环己烷和乙酸乙酯在 50/50~0/100 梯度下的洗脱为佳; 所述制备型薄层层析(PTLC)所用展开剂为二氯甲烷/甲醇, 体积用量比例为 95/5~90/10。

本发明新碳骨架抗肿瘤抗生素化合物可应用于制备抗肿瘤、抗菌、抗病毒药物。

本发明具有如下优点:

1. 本发明所涉及的化合物 chinikomycin 的碳骨架为新颖结构, 迄今为止, 尚未发现有专利或文献报道。

2. 本发明充分利用我国尚未深入研究开发的丰富的海洋微生物资源, 寻找到一种化学结构新颖的化合物, 它具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒活性, 对包括肺癌细胞系 LXFA 629L 和 LXFL 529L, 乳腺癌细胞系 MAXF 401NL, 黑色素瘤细胞系 MEXF 462NL, 肾肿瘤细胞系 RXF 944L 和子宫癌细胞系 UXF 1138L 等人体肿瘤细胞有抑制作用; 为临床提供了新型药物或先导化合物。

附图说明

图1为本发明新碳骨架抗肿瘤抗生素 chinikomycin A, B 的炔酰胺侧链 (Ia) 的 HMBC (\rightarrow) 和 NOESY (\leftrightarrow) 效应。

图2为本发明新碳骨架抗肿瘤抗生素 chinikomycin A (Ib), B (Ic) 碳骨架结构的 HMBC (\rightarrow) 和 $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY (\leftrightarrow) 效应。

图3为本发明新碳骨架抗肿瘤抗生素 chinikomycin A, B 的制备流程图。

具体实施方式

下面结合具体实施例详述本发明。

实施例 1

制备新碳骨架抗肿瘤抗生素 chinikomycin A 和 B (制备流程图参见图3)。

(1) 样品采集: 从青岛近海采集海泥样品, 在实验室中利用高氏一号培养基 (可溶性淀粉 20g, 硝酸钾 1g, 磷酸二氢钾 0.5g, 硫酸镁 0.5g, 氯化钠 0.5g, 硫酸亚铁 0.01g, 重铬酸钾 0.1g, 琼脂粉 18g, 天然海水 500ml, 自来水 500ml, 调整 pH 为 7.2) 进行梯度稀释划线培养, 纯化得到一株海洋链霉菌 *Streptomyces* sp.;

(2) 固体培养: 将所述海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. 接种于 M^{2+} 固体培养基 (大麦提取物 10g, 酵母粉 4g, 葡萄糖 4g, 天然海水 500ml, 自来水 500ml, 琼脂粉 14g, 调整 pH 为 7.4), 28°C 培养 3 天, 直至长出白色的孢子;

(3) 摇床培养: 从所述 M^{2+} 固体培养基上挑取白色孢子丝接种到 60 个 1000ml 的 Erlenmeyer 三角瓶中, 每个三角瓶中含有已灭菌的 250ml 鱼粉液体培养基 (鱼粉 5g, 小麦粉 10g, 酵母粉 1g, 葡萄糖 21g, 硫酸镁 0.5g, 氯化钠 1g, 氯化钙 0.5g, 微量元素溶液 10ml, 天然海水 500ml, 自来水 500ml, 调整 pH 为 6.4), 35°C 下回旋式摇床培养, 转速为 120rpm, 4 天后, 收获发酵液;

其中: 微量元素溶液成分: 硫酸亚铁 10.2g, 氯化钴 0.04g, 氯化钙 0.04g, 氯化锰 0.04g, 硫酸锌 0.08g, 硼酸钠 0.08g, 钼酸钠 0.74g, 溶解于 500ml 蒸馏水;

(4) 有机溶剂萃取: 发酵液通过板式过滤器分开菌液与菌泥, 分别用乙酸乙酯浸提 4 次, 合并有机溶剂相, 旋转蒸发器旋转浓缩蒸干, 得到膏状粗提物 14g;

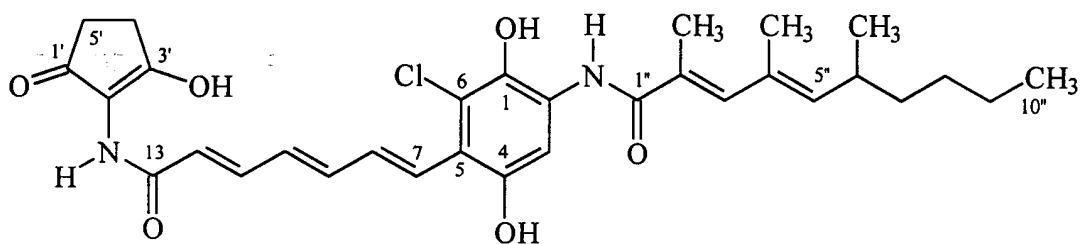
(5) 分离纯化: 用 250ml 环己烷浸提粗提物, 溶解部分为提取物 I, 不溶解部分为提取物 II; 然后分别作如下操作:

1) 提取物 I 经硅胶柱层析, 用环己烷和乙酸乙酯梯度 (100/0~0/100) 洗脱, 在环己烷与乙酸乙酯 (50/50~0/100) 梯度下, 得到含有化合物 chinikomycin A 的组分, 用 50ml 环己烷洗涤两次, 获得产物 chinikomycin A (100mg);

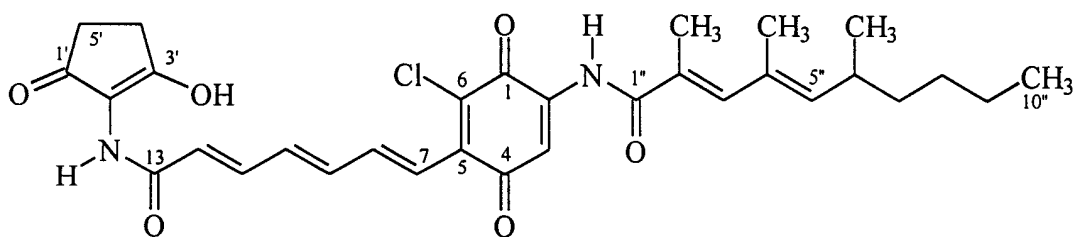
2) 提取物 II 经硅胶柱层析, 二氯甲烷与甲醇梯度 (100/0~0/100) 洗脱,

100%二氯甲烷洗脱得到组分 a (80mg), 二氯甲烷与甲醇 (99.5/0.5 ~ 98/2) 梯度下得到组分 b (325mg), 二氯甲烷与甲醇 (95/5 ~ 90/10) 梯度下得到组分 c (414mg), 取所述组分 b 用含有 25%二氯甲烷的环己烷 25ml 洗涤两次, 得到黄色粉末状不溶物质, 经过制备型薄层层析(PTLC, 层析板为 20 × 20 cm, 展开剂为 95%二氯甲烷与 5%甲醇), 于 $R_f=0.34$ 处得到产物 chinikomycin A (50mg), 于 $R_f=0.58$ 处得到红色化合物 chinikomycin B (3.5mg);

chinikomycin A 化学结构如下:



chinikomycin B 的化学结构如下:



所述 chinikomycin A 和 B 的物理常数、核磁共振氢谱数据、核磁共振碳谱数据分别参见表 1~3。

表 1 所述 chinikomycin A 和 chinikomycin B 的物理常数

	chinikomycin A	chinikomycin B
Properties	黄褐色粉末固体	红色固体
R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/5\%$ MeOH)	0.34	0.58
Molecular formula	$\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{ClN}_2\text{O}_6$	$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_6$
EI HRMS	568.2326 (calc. 568.197629) 615 ($[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^{+1}$, 5), 613	566.2290 (calc. 566.181979)
(+) -ES-MS	($[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^{+1}$, 25), 615 ($[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$, 32), 613 ($[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$, 100)	611 ($[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^{+1}$)
(-) -ES-MS	569 ($[\text{M}-\text{H}]^{-1}$, 52), 567 ($[\text{M}-\text{H}]^{-1}$, 100)	568 ($[\text{M}-\text{H}]^{-1}$, 29), 566 ($[\text{M}-\text{H}]^{-1}$, 100)
IR (KBr) ν cm^{-1}	3425, 2965, 2924, 2851, 1657, 1620, 1538, 1501, 1383, 1319, 1228, 1173, 1084, 1008, 873, 662, 546	3425, 2963, 2923, 2857, 1655, 1620, 1502, 1457, 1382, 1318, 1297, 1233, 1173, 1121, 1083, 1035, 1008, 874, 851, 653, 546
UV/VIS (MeOH) : λ_{max} ($\lg \epsilon$)	260 (4.46), 335 (s, 4.46), 395 (4.62)	261 (4.68), 344 (4.72), 500 (3.98)

表 2 所述 chinikomycin A 和 chinikomycin B 的核磁共振氢谱数据

(δ values, $J = [\text{Hz}]$)

H No.	A ^a	B ^b
3-H	7.47 (s)	7.60 (s)
7-H	6.97 (d, 15.5)	6.83 (d, 15.6)
8-H	7.45 (dd, 15.5, 11.1)	7.80 (dd, 15.6, 10.0)
9-H	6.86 (dd, 15.1, 11.1)	6.73 (dd, 14.8, 10.1)
10-H	6.49 (dd, 14.6, 11.2)	6.68 (dd, 14.8, 10.3)
11-H	7.26 (dd, 15.1, 11.2)	7.37 (dd, 14.8, 10.3)
12-H	6.51 (d, 14.6)	6.28 (d, 14.8)
CONH	9.86 (s)	8.13 (s)
Ar-NH	9.12 (s)	8.60 (s)
1-OH	9.06 (s)	
4-OH	10.04 (s)	
4'-H ₂	2.53 (m)	2.56 (s, br)
5'-H ₂	2.53 (m)	2.62 (s, br)
3'-OH	13.90 (s, br)	13.64 (s, br)
3''-H	6.82 (s)	6.86 (s)
5''-H	5.36 (d, 9.5)	5.40 (d, 9.7)
6''-H	2.51 (m)	2.45 (m)
7''-H ₂	1.4 ~ 1.2 (m)	1.4 ~ 1.2 (m)
8''-H ₂	1.4 ~ 1.2 (m)	1.4 ~ 1.2 (m)
9''-H ₂	1.4 ~ 1.2 (m)	1.4 ~ 1.2 (m)
10''-H ₃	0.88 (t, 6.8)	0.86 (t, 7.0)
2''-Me	2.03 (s)	2.08 (s)
4''-Me	1.82 (s)	1.83 (s)
6''-Me	0.96 (d, 6.8)	0.97 (d, 6.5)

^aDMSO-*d*₆, ^bCDCl₃

表 3 所述 chinikomycin A 和 chinikomycin B 的核磁共振碳谱数据

(δ values)

C No.	A ^a	B ^b	C No.	A ^a	B ^b
1	136.8	176.3	4'	no	32.1
2	128.6	137.7	5'	no	25.6
3	107.6	114.7	1''	168.3	168.3
4	150.3	185.2	2''	128.5	127.6
5	117.0	138.4	3''	138.7	141.8
6	122.2	135.0	4''	130.0	129.9
7	130.4	127.3	5''	141.6	144.2
8	132.8	144.3	6''	32.1	32.9
9	143.0	141.5	7''	36.4	37.0
10	129.8	136.3	8''	29.2	29.7
11	142.6	142.8	9''	22.2	22.8
12	121.0	123.7	10''	13.9	14.0
13	166.1	165.2	2''-Me	14.1	14.1
1'	no	197.5	5''-Me	16.3	16.4
2'	114.9	115.1	6''-Me	20.6	20.6
3'	no	174.6			

no = not observed, ^aDMSO-*d*₆, ^bCDCl₃

实施例 2

由 chinikomycin A 氧化为 chinikomycin B:

取 20mg 的产物 chinikomycin A, 加入到反应瓶中, 用 50ml 二氯甲烷

溶解（本实施例为刚好溶解），缓缓加入约 1g 氧化银（它相对于溶液中的 chinikomycin A 是过量的），搅拌，反应约 3 小时，溶液颜色由黄色完全变为红色，旋转蒸干，用 6ml 二氯甲烷溶解（本实施例为充分溶解），弃去沉淀不溶物，溶解部分进行制备型薄层层析（PTLC），以 95%二氯甲烷/5%甲醇为展开剂，回收 $R_f=0.58$ 处的红色化合物 7mg，通过核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、质谱、红外光谱和紫外光谱分析，确定了该化合物的化学结构，为 chinikomycin B。

实施例 3

由 chinikomycin B 还原为 chinikomycin A:

在试管中，加入 0.5mg 的 chinikomycin B，用 2ml 二氯甲烷溶解，再缓缓加入 1ml 0.1N 连二亚硫酸钠溶液，振荡直至溶液颜色由红色变为黄色，利用薄层层析（TLC）分析， $R_f=0.34$ 处黄色化合物即是 chinikomycin A。

对化合物 chinikomycin A 和 chinikomycin B 做二维核磁共振波谱分析，进一步验证了化合物 chinikomycin A 和 chinikomycin B 的结构，其炔酰胺侧链的 HMBC (\rightarrow) 和 NOESY (\leftrightarrow) 效应参见图 1，碳骨架的 HMBC (\rightarrow) 和 H,H COSY (\leftrightarrow) 效应参见图 2。

实施例 4

chinikomycinA 和 chinikomycin B 的抗肿瘤活性实验:

抗肿瘤活性实验由德国 BIOLEADS 生物公司进行测定，选用人体肿瘤细胞系（Human Cancer Cell Lines），包括肺癌细胞系 LXFA 629L 和 LXFL 529L (lung carcinoma cell)，乳腺癌细胞系 MAXF 401NL (breast cancer cell)，黑色素瘤细胞系 MEXF 462NL (melanoma cell)，肾肿瘤细胞系 RXF 944L (renal carcinoma cell) 和子宫癌细胞系 UXF 1138L (uterus cancer cell)。实验结果表明：chinikomycin A 和 B 的有效浓度 IC_{70} 分别为 5.6 $\mu\text{g/ml}$ 和 5.9 $\mu\text{g/ml}$ ，表现出抗肿瘤活性。

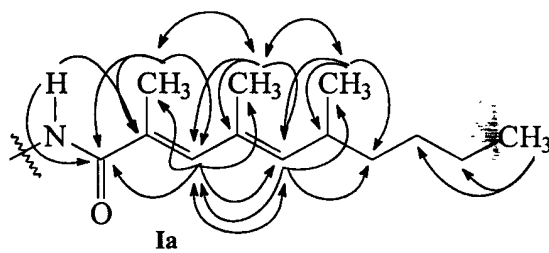


图 1

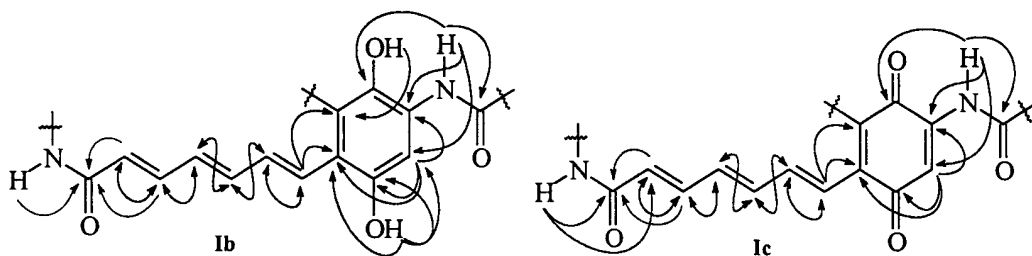


图 2

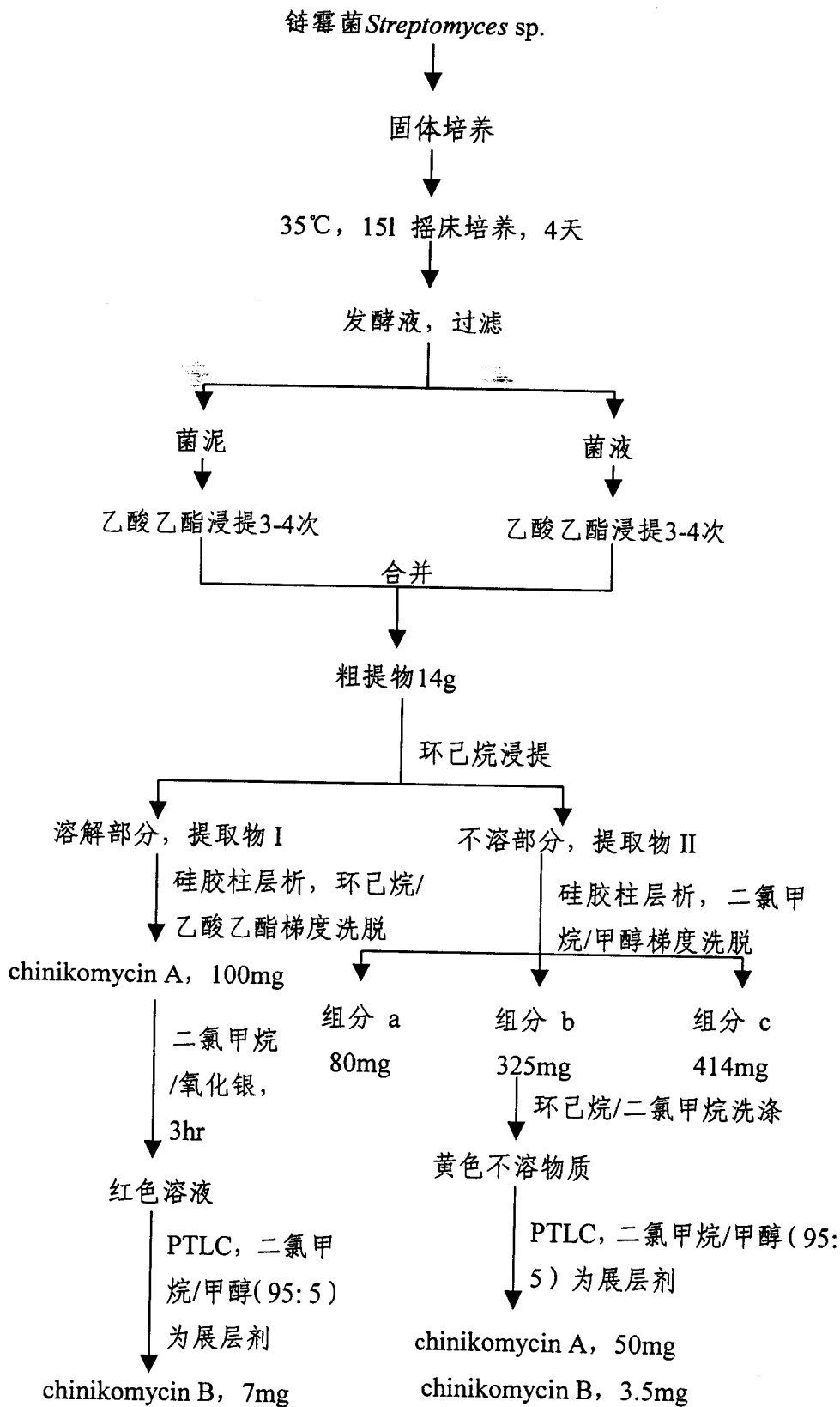


图 3