



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101501063 B

(45) 授权公告日 2014.03.12

(21) 申请号 200780029855.5

(22) 申请日 2007.08.10

(30) 优先权数据

PA200601055 2006.08.11 DK

60/837,426 2006.08.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.02.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2007/050441 2007.08.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/017734 EN 2008.02.14

(73) 专利权人 北方抗生素有限公司

地址 芬兰赫尔辛基

(72) 发明人 马尔蒂·瓦拉 蒂莫·瓦拉

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51) Int. Cl.

C07K 7/62 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件

Thomas C J et al.. Kinetics of the interaction of endotoxin with polymyxin B and its analogs: a surface plasmon resonance analysis. 《FEBS Letters》. 1999, 第 445 卷第 423 页第 2 段.

Weinstein J et al.. Selective chemical modifications of Polymyxin B. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》. 1998, 第 8 卷第 3391-3396 页.

Sakura N et al.. The Contribution of the N-Terminal Structure of Polymyxin B Peptides to Antimicrobial and Lipopolysaccharide Binding Activity. 《Bull. Chem. Soc. Jpn》. 2004, 第 77 卷第 1915 - 1924 页.

Tsubery H et al.. N-terminal modifications of Polymyxin B nonapeptide and their effect on antibacterial activity. 《Peptides》. 2001, 第 22 卷第 1679 页 3.5 节, 表 1, 表 4.

审查员 管冰

权利要求书3页 说明书33页

序列表32页

(54) 发明名称

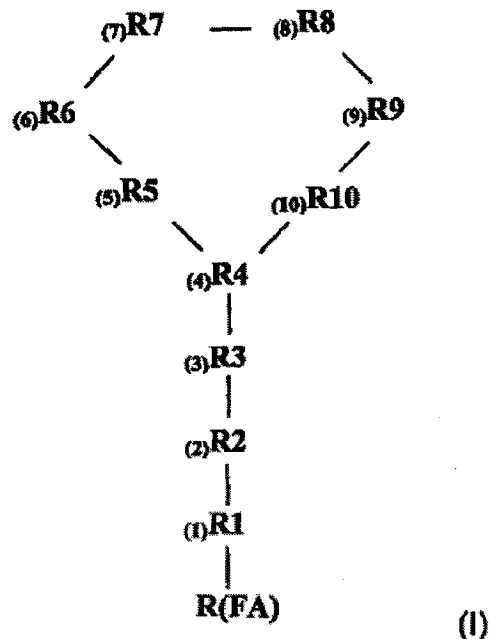
多粘菌素衍生物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及多粘菌素衍生物,其中 R1、R2 和 R3 是任选的,R1、R2、R3、R5、R8 和 R9 是阳离子氨基酸残基或中性氨基酸残基,其被选择成使得在生理 pH 下正电荷总数至少是 2 但不超过 3;本发明还涉及包含至少两种这样的衍生物的组合产品。本发明还涉及通过向受试者施用治疗有效量的本发明衍生物来治疗、减轻或改善所述受试者中由革兰氏阴性菌所造成的感染的方法;本发明还涉及通过同时或以任意顺序依次向受试者施用治疗有效量的抗菌剂和本发明衍生物来使得革兰氏阴性菌对所述抗菌剂致敏的方法;本发明还涉及用于开发新抗生素的方法;用于降低肾毒性的

方法,用于改善天然多粘菌素和八肽菌素的药代动力学特性的方法;以及用于使得具有临床重要性的细菌对血清中存在的宿主防御机制补体致敏的方法。最后,本发明涉及制备此类多粘菌素衍生物的方法。

1. 通式 (I) 的多粘菌素衍生物或其可药用盐,



其中

R1-R10 选自 SEQ ID NO :9-22 和 SEQ ID NO :24, 和

R(FA) 选自辛酰基 (OA)、癸酰基 (DA) 和 6- 甲基庚酰基 (MHA),

其前提为当 R(FA) 直接与 R4 相连时, R(FA) 是癸酰基 ; 并且

其中通式 (I) 中的氨基酸残基被选择成使得在生理 pH 下正电荷总数是 3, 以及侧链部分 R(FA)-R1-R2-R3 的正电荷总数不超过 1, 由此所述多粘菌素衍生物仍具有针对革兰氏阴性菌的抗菌活性, 和 / 或具有使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的能力。

2. 根据权利要求 1 的衍生物, 其中 R1-R10 选自 SEQ ID NO :9-20。

3. 根据权利要求 2 的衍生物, 其选自 OA-SEQ ID NO. 10、DA-SEQ ID NO. 10、OA-SEQ ID NO. 11、OA-SEQ ID NO. 12、DA-SEQ ID NO. 13、OA-SEQ ID NO. 13、MHA-SEQ ID NO. 13、MHA-SEQ ID NO. 14、OA-SEQ ID NO. 15、OA-SEQ ID NO. 16、OA-SEQ ID NO. 17、OA-SEQ ID NO. 18、OA-SEQ ID NO. 19、OA-SEQ ID NO. 20 和 DA-SEQ ID NO. 9。

4. 包含两种或更多种权利要求 1 至 3 中任一项所述衍生物的组合产品。

5. 包含至少一种权利要求 1 至 3 中任一项所述衍生物以及至少一种可药用载体和 / 或赋形剂的药物组合物。

6. 根据权利要求 5 的药物组合物, 其另外包含抗菌剂。

7. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述衍生物或者根据权利要求 4 的组合产品在制备用于治疗、减轻或改善受试者中由革兰氏阴性菌造成的感染的药物中的用途。

8. 根据权利要求 7 的用途, 其中所述革兰氏阴性菌选自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

9. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述衍生物或根据权利要求 4 的组合产品在制备用于使

得革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的药物中的用途,所述药物与治疗有效量的所述抗菌剂同时或依次施用。

10. 根据权利要求 9 的用途,其中所述抗菌剂选自大环内酯类药物、酮内酯类、林可酰胺类、链阳性菌素类、利福霉素类、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类、糖肽抗生素、氟喹诺酮类、杆菌肽、四环素衍生物、 β 内酰胺抗生素类、新生霉素和截短侧耳素类。

11. 根据权利要求 10 的用途,其中所述抗菌剂选自克拉霉素、阿奇霉素、红霉素、克林霉素、链阳性菌素组合奎奴普丁-达福普汀、利福平、利福布汀、利福拉齐、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类利奈唑胺、万古霉素、dalbavancin、telavancin、oritavancin、莫西沙星和三甲氧苄氨嘧啶。

12. 根据权利要求 9 的用途,其中所述抗菌剂选自叶酸合成抑制剂、去甲酰酶抑制剂和细菌流出泵抑制剂。

13. 根据权利要求 10-12 中任一的用途,其中所述抗菌剂选自克拉霉素、阿奇霉素、红霉素、克林霉素、链阳性菌素组合奎奴普丁-达福普汀、利福平、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类利奈唑胺、万古霉素、氟喹诺酮类莫西沙星以及叶酸合成抑制剂三甲氧苄氨嘧啶。

14. 根据权利要求 9 的用途,其中所述革兰氏阴性菌选自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

15. 根据权利要求 1-3 中任一项的衍生物在制备使具有临床重要性的革兰氏阴性菌对血清中存在的宿主防御机制补体致敏的药物中的用途。

16. 根据权利要求 15 的用途,其中所述革兰氏阴性菌选自:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

17. 根据权利要求 1-3 中任一项的衍生物在制备使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的药物中的用途。

18. 根据权利要求 17 的用途,其中所述革兰氏阴性菌选自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

19. 根据权利要求 17 的用途,其中所述抗菌剂选自:大环内酯类药物、酮内酯类、林可酰胺类、链阳性菌素类、利福霉素类、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类糖肽抗生素、氟喹诺酮类、杆菌肽、四环素衍生物、 β 内酰胺抗生素、新生霉素和截短侧耳素类。

20. 根据权利要求 19 的用途,其中所述抗菌剂选自克拉霉素、阿奇霉素、红霉素、克林霉素、链阳性菌素组合奎奴普丁-达福普汀、利福平、利福布汀、利福拉齐、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类利奈唑胺、万古霉素、dalbavancin、telavancin、oritavancin、莫西沙星

和三甲氧苄氨嘧啶。

21. 根据权利要求 17 的用途,其中所述抗菌剂选自叶酸合成抑制剂、去甲酰酶抑制剂和细菌流出泵抑制剂。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项的用途,其中所述抗菌剂选自:克拉霉素、阿奇霉素、红霉素、克林霉素、链阳性菌素组合奎奴普丁-达福普汀、利福平、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类利奈唑胺、万古霉素、氟喹诺酮类莫西沙星以及叶酸合成抑制剂三甲氧苄氨嘧啶。

23. 用于制备权利要求 1 所限定的式 (I) 的多粘菌素衍生物的方法,其包括修饰具有 4 至 6 个带正电残基的天然或合成多粘菌素或八肽菌素化合物或其衍生物,以获得具有 3 个带正电残基并且其中侧链部分 $R(FA)-R1-R2-R3$ 的正电荷总数不超过 1 的根据权利要求 1 的式 (I) 多粘菌素衍生物,所述修饰通过用中性残基或用共价键替换 1 至 3 个所述带正电残基或者通过将 1 至 3 个所述带正电残基转化成中性残基来进行。

24. 根据权利要求 23 的方法,其包括以全合成方法来实施所述方法。

25. 根据权利要求 23 的方法,其包括以半合成方法来实施所述方法。

26. 根据权利要求 24 的方法,其包括下述步骤:

(a) 切割天然或合成的多粘菌素或八肽菌素化合物或其衍生物以除去所述多粘菌素化合物的侧链,并回收所述化合物的环部分,和

(b) 将步骤 (a) 中获得的环部分与合成制备的侧链相偶联,以获得根据权利要求 1 的式 (I) 的多粘菌素衍生物。

27. 权利要求 26 的方法,其包括以酶促方式进行步骤 (a) 中的切割。

28. 权利要求 26 的方法,其包括以化学方式进行步骤 (a) 中的切割。

29. 权利要求 26 的方法,其包括使用化学处理和酶促处理的组合进行步骤 (a) 中的切割。

多粘菌素衍生物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及多粘菌素衍生物及其在治疗由革兰氏阴性菌引起的感染中的用途。所述多粘菌素衍生物可具有抗菌效果,或者可使细菌致敏,以增强其他抗菌剂的效果。

背景技术

[0002] 脓毒症每年使超过 215000 名美国人丧生。估计每年有 750000 名美国人感染重症脓毒症,其中 29%死亡。脓毒症死亡占美国所有死亡人数中的 9%。在美国,脓毒症造成的死亡人数与心肌感染相同,甚至比交通事故还多。

[0003] 每年有两百万至三百万美国人发生医院感染,其中 10%发展成为脓毒症。这些患者中超过 90000 名死于在医院感染的脓毒症。

[0004] 根据 2000 年的 OECD 健康报告,在欧盟,重症监护室(ICU)中重症脓毒症和脓毒性休克(重症脓毒症合并低血压)每年夺走多达 135000 条生命。在英国,隶属于 NHS 组织的急症护理医院中每年 100000 名患上医院感染的患者中有 5000 名死于脓毒症。

[0005] 由于易患脓毒症患者(例如老人、早产儿以及癌症患者)数量的增长,尤其是因为许多严重疾病比以前更容易治疗,因此死亡人数逐年增加。同样,侵入性医疗装置和积极性方法的使用也有所增加。

[0006] 革兰氏阴性菌所造成的脓毒症性感染超过总数的 40%,许多革兰氏阴性菌具有极高的多重抗药性。对革兰氏阴性菌的治疗比革兰氏阳性菌更有挑战性,因为它们具有独特的结构——作为其最外层结构的外膜。位于外膜的脂多糖分子抑制许多抗菌剂向其最终靶标所处的细胞深处扩散。1972-1991 年间超过 95%从自然界中分离或化学合成的新型抗菌素对革兰氏阴性菌缺乏活性(Vaara 1993)。

[0007] 多粘菌素是由多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)菌株及相关生物所产生的一组密切相关的抗生素物质。这些阳离子药物是分子量约为 1000 的相对简单的肽。多粘菌素(例如多粘菌素 B)是十肽抗生素,即它们由 10 个氨酰基残基组成。它们具有杀菌性,对革兰氏阴性菌(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、波美不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)等的其他物种)尤其有效。但是,多粘菌素具有严重的副作用,包括肾毒性和神经毒性。因此,由于其高全身毒性,这些药物作为治疗剂的用途十分有限。

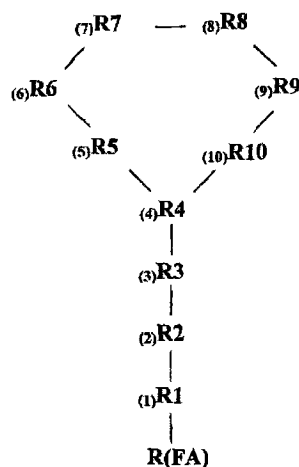
[0008] 多粘菌素已经用于治疗由这些细菌所造成的严重感染,但是由于其毒性,在上世纪 70 年代当开发了更新、耐受更好的抗生素时,它们大多被弃用。尽管它们具有毒性,最近革兰氏阴性菌多重抗药性菌株的出现使得多粘菌素治疗性应用成为最后的手段,并且因为许多较低毒性的抗生素对所述细菌的特定菌株已丧失效力,所以多粘菌素的应用已经再次出现增长。

[0009] 因此,现在多粘菌素再次成为治疗工具,尽管由于其毒性而规模极为有限。但是,其全身(即非局部)应用大多仅限于治疗由绿脓假单胞菌(*Ps. aeruginosa*)和波美不动杆菌(*A. baumannii*)的多重抗药性菌株以及由具有卡巴培南抗性的肠细菌所造成的危及生

命的感染。

[0010] 多粘菌素由环状七肽部分和线性部分组成,所述线性部分由三肽部分和与所述三肽的 N 端氨基酸残基之 α 氨基相连的疏水脂肪酸尾组成,其可以由以下通式表示:

[0011]



[0012] 其中,R1-R3 代表三肽侧链部分;R4-R10 代表七肽环部分,R(FA) 代表与所述三肽的 N 端氨基酸残基之 α 氨基相连的疏水脂肪酸尾。

[0013] 多粘菌素组包含下列多粘菌素:A1、A2、B1-B6、C、D1、D2、E1、E2、F、K1、K2、M、P1、P2、S 和 T(Storm 等 1977;Srinivasa 和 Ramachandran 1979)。所有多粘菌素都是多阳离子的,并且除带有 4 个正电荷的多粘菌素 D、F 和 S 以外均带有 5 个正电荷。值得注意的是,缺乏脂肪酸部分 R(FA) 但带有 R1-R10 的修饰多粘菌素与其所来源的天然多粘菌素相比具有一个额外的正电荷,这是由于所述衍生物 N 端的游离 α 氨基。因此,例如,这样的多粘菌素 B 或多粘菌素 E 衍生物带有总共 6 个正电荷。

[0014] 临床使用的多粘菌素 B 和多粘菌素 E 彼此仅在残基 R6 存在差异,它在多粘菌素 B 中是 D- 苯丙氨酰残基,而在多粘菌素 E 中则是 D- 亮氨酰残基。

[0015] 环杆菌素 (circulin)A 和 B 也归类为多粘菌素 (Storm 等 1977)。它们与其他多粘菌素的差异仅在于 R7 位带有异亮氨酰残基,而其他多粘菌素在所述位置带有苏氨酰或亮氨酰残基。一些多粘菌素结构的总结可参见表 1。

[0016] 表 1

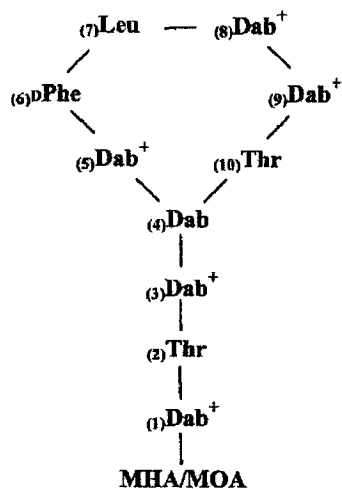
[0017] 选定的多粘菌素和八肽菌素及其选定衍生物的结构

[0018]

化合物	R(FA)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
多粘菌素B	MO(H)A-	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素E	MO(H)A-	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素E甲磺酸盐	MO(H)A-	sm-Dab-	Thr-	sm-Dab-	*Dab-	Sm-Dab-	D Leu-	Leu-	sm-Dab-	sm-Dab-	*Thr
多粘菌素A	MO(H)A-	Dab-	Thr-	D Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Thr-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素M	MOA	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Thr-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素D	MO(H)A-	Dab-	Thr-	D Ser-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Thr-	Dab-	Dab-	*Thr
环杆菌素A	MOA	Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Ile-	Dab-	Dab-	*Thr
八肽菌素A	OHMDA	—	—	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab-	Dab-	*Leu
脱酰基多粘菌素B (DAC)		Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素B九肽 (PMEN)			Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Leu-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
脱酰基多粘菌素B (DAPB)		Dab-	Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素B九肽 (PMBN)			Thr-	Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素B八肽 (PMB0)				Dab-	*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr
多粘菌素B七肽 (PMHP)					*Dab-	Dab-	D Phe-	Leu-	Dab-	Dab-	*Thr

[0019] 多粘菌素 B 由下式表示：

[0020]



[0021] 市售多粘菌素 B 是混合物，其中 R-FA 主要是 6-甲基辛酰基 (6-MOA, 在多粘菌素 B1 中)，但也可以是相关的脂肪酰基如 6-甲基庚酰基 (6-MHA, 在多粘菌素 B2 中)、辛酰基 (在多粘菌素 B3 中) 或庚酰基 (多粘菌素 B4 中) (Sakura 等 2004)。所有这些变体针对革兰氏阴性菌 (例如大肠杆菌) 均同样有效 (Sakura 等 2004)。十分类似的是，在多粘菌素 E1 (粘杆菌素 A) 中和环杆菌素 A 中，R-FA 是 6-MOA，而在多粘菌素 E2 (粘杆菌素 B) 中和环杆菌素 B 中，R-FA 是 6-MHA。许多研究人员已将多种疏水部分 (包括多种脂肪酰残基) 附着到多粘菌素衍生物和类似物的 N 端，并显示所得衍生物具有强有力的抗菌活性 (Chihara 等 1973, Sakura 等 2004 和美国专利公开 2006004185 中)。甚至，带有 9-芴甲氧羰基大疏水残基作为 R-FA 的衍生物在抑制大肠杆菌和其他革兰氏阴性菌生长方面几乎与多粘菌素 B 一样有效 (Tsubery 等 2001)。

[0022] 就生物活性而言,七肽环结构是必要的(Storm 等 1997)。具有八肽环的衍生物作为抗生素的活性显著降低。

[0023] 已经对多粘菌素和多种多粘菌素样合成分子进行了多种修饰,它们其中某些限制仍保留其生物学活性。所述修饰包括但不限于在侧链上的修饰,以及其中固有的疏水氨基酸残基(例如 DPhe 或 Leu)被替换为另一种疏水氨基酸残基或者其中阳离子 Dab 被替换为另一种带阳离子氨酰残基(例如 Lys、Arg 或鸟氨酸残基)的分子(Storm 等 1997, Tsubery 等 2000a, Tsubery 等 2002, US 专利公开 2004082505, Sakura 等 2004, US 专利公开 2006004185)。

[0024] 产生具有至少部分微生物学活性的化合物的修饰包括但不限于烷酰基酯,其中苏氨酰残基的 OH 基与烷酰基(例如丙酰基和丁酰基)形成酯(美国专利 3450687)。

[0025] 八肽菌素与多粘菌素 E(粘杆菌素)其他各处均相同,只是共价键取代了残基 R1-R2(表 1)。在本发明中,R 的位置根据天然多粘菌素中的位置编号,因此,八肽菌素的侧链中惟一的氨酰残基被定义为 R3。因此,八肽菌素是八肽,而所有天然多粘菌素都是十肽,并且它们仅带有 4 个正电荷。多种八肽菌素(A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1)中的 R-FA 残基包括:3-OH-8-甲基癸酸、3-OH-8-甲基壬酸和 β -OH-6-甲基辛酸。带有 6-18 个碳原子的脂肪酰残基的衍生物具有抗大肠杆菌的强抗菌活性(Storm 等 1977)。

[0026] 多粘菌素在革兰氏阴性菌中的第一靶标是其外膜(outer memberane, OM),它是抗许多毒性剂(包括大(M_w 大于 700d)抗生素和疏水抗生素)的有效透过性屏障。通过与暴露于 OM 外表面的脂多糖(LPS)的结合,多粘菌素破坏 OM 的结构和功能,结果多粘菌素本身及许多其他毒剂可透过 OM(即使其成为可透过的)(Nikaido 和 Vaara 1985, Vaara 1992, Nikaido 2003)。多粘菌素的最终和致死靶标(杀菌靶标)被认为是细菌的细胞质膜(内膜)。

[0027] 已经进行了许多努力来降低多粘菌素的毒性。用甲醛和亚硫酸氢钠处理多粘菌素 E(粘杆菌素(colistin))产生甲磺酸粘杆菌素,其中 5 个二氨基丁酸残基的游离氨基被甲磺基基团取代(表 1)。该制备物由单-、二-、三-、四-和五-取代的化合物的不确定混合物组成。甲磺酸化的制备物在新溶解于水时,起初缺乏母体分子的抗菌活性和毒性,但是当所述化合物在溶液中、血液中或者组织中开始分解时,产生较少取代的衍生物和游离的粘杆菌素,恢复了部分抗菌活性和毒性。另外,市售的药物制剂中最初的甲磺酸化程度各有不同。已经有许多其他封闭所有游离氨基的方法被公开。其实例包括但不限于与氨基酸形成不稳定的希夫碱(Storm 等 1977)。

[0028] 1973 年,通过酶促处理多粘菌素 E 获得的并且缺乏 R-FA 和 R1 的多粘菌素 E 九肽(PMEN,粘杆菌素九肽,表 1)在小鼠的急性毒性测定(推测由于直接神经肌肉阻断而立即死亡)中显示出比母体化合物更低的毒性(Chihara 等 1973)。但是,它也缺乏抗菌活性,如对其抑制细菌生长的能力所进行测量的(Chirara 等 1973)。

[0029] 另一方面,Vaara 和 Vaara 显示,多粘菌素 B 九肽(PMBN,表 1)保留了透过革兰氏阴性菌 OM 的能力(Vaara 和 Vaara 1983a, b, c;美国专利 4, 510, 132;Vaara 1992)。因此,即使它缺乏直接的抗菌能力(即抑制细菌生长的能力),它也能够使细菌对多种抗菌剂(例如疏水抗生素和大抗生素以及一些其他毒剂)致敏(即使其敏感或者如所称的使其易感)。

[0030] PMBN 也使细菌对作为对抗侵入物的第一道防御系统而存在于新鲜人血清中的人

补体系统的抗菌活性致敏 (Vaara 和 Vaara 1983a, Vaara 等 1984, Vaara 1992)。另外,它使细菌对血清补体和人多形核白细胞的联合杀菌活性致敏 (Rose 等 1999)。

[0031] PMBN 类似于 PMEN, 在小鼠的急性毒性测定中比未修饰多粘菌素 B 的毒性更低。在其他的毒理学测定中, 一些标准证明 PMBN 具有比其母体化合物更低的毒性, 但是此多粘菌素衍生物仍然被判定为对临床应用来说肾毒性过高 (Vaara 1992)。

[0032] PMBN 带有 5 个正电荷。接下来的研究表明, 正如所预期的那样, 也带有 5 个正电荷的 PMEN 以及都带有 6 个正电荷的脱酰基多粘菌素 B 和脱酰基多粘菌素 E 都是能使得细菌对其他抗生素致敏的有力药剂 (Viljanen 等 1991, Vaara 1992)。另外, 显示出结构上进一步简化的衍生物多粘菌素 B 八肽 (PMB0) 保留了非常有效的穿透活性, 而多粘菌素 B 七肽 (PMBH) 活性较低 (Kimura 等 1992)。PMBN、PMEN 和 PMB0 带有 5 个正电荷, 而 PMBH 仅带有 4 个正电荷。此差异可解释 PMBH 较弱的活性。

[0033] Ofek、Tsubery 和 Friedkin 小组最近描述了与吸引多形核白细胞的趋化肽 (例如 fMLF) 相连的多粘菌素样肽 (美国专利公开 2004082505, Tsubery 等 2005)。他们描述了均带 4 个正电荷的肽 fMLF-PMBN、MLF-PMBN、fMLF-PMEN、fMLF-PMB0 和 MLF-PMB0, 它们使得革兰氏阴性菌对抗生素致敏, 尽管没有公开与浓度逐渐增加的所述化合物进行的比较研究 (Tsubery 等 2005)。

[0034] 为了研究多粘菌素的结构和功能特性, 一些研究工作公开了带少于 4 个正电荷的多粘菌素衍生物等。

[0035] Teuber (1970) 描述了用醋酸酐处理多粘菌素 B, 产生含有多粘菌素 B 及其单 -、二 -、三 -、四 - 和五 -N- 乙酰化形式的制备物。Teuber 还分离了每个组, 并使用琼脂扩散测定非定量地报告了五 - 乙酰化和四 - 乙酰化形式缺乏停止鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 生长的能力, 而二 - 和单乙酰化形式具有此能力。三乙酰化形式具有部分此能力。

[0036] Srinivasa 和 Ramachandran (1978) 分离了部分甲酰化的多粘菌素 B 衍生物, 并显示二甲酰基衍生物和三甲酰基衍生物抑制绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的生长。他们未公开所述化合物使细菌对抗生素致敏的能力。另外, 1980 年, 他们显示, 三甲酰基多粘菌素 B 在残基 R1 和 R3 上的游离氨基以及二甲酰基多粘菌素 B 在残基 R1、R3 和 R5 上的游离氨基对于生长抑制是必要的, 而 R8 和 R9 上的游离氨基则不是必要的 (Srinivasa 和 Ramachandran, 1980a)。

[0037] Sakura 等 (2004) 公开了缩短的多粘菌素 B 衍生物辛酰基多粘菌素 B 七肽。将辛酰基残基附着到多粘菌素 B 七肽的 R4 残基 N 端产生仅带 3 个正电荷的化合物。Sakura 等发现了辛酰基多粘菌素 B 七肽仅在非常高浓度 (128 μ g/ml) 时抑制细菌生长, 而其他衍生物 (例如都带有 4 个电荷的辛酰基多粘菌素 B 八肽和辛酰基多粘菌素 B 九肽) 是抑制细菌生长的强力药剂。

[0038] 美国专利公开 2006004185 最近公开了某些可用于合成新型肽抗生素的多粘菌素衍生物和中间产物。所述抗菌化合物带有 4 或 5 个正电荷。

[0039] 对于有效治疗细菌感染 (特别是多抗性革兰氏阴性菌造成的感染) 仍然有着迫切的需求。

发明内容

[0040] 本发明涉及多粘菌素衍生物,其中在生理 pH 下正电荷总数至少为 2 但不超过 3,其前提为当 R(FA)-R1-R2-R3 构成天然多粘菌素 B 侧链时 R8 和 R9 不全是甲酰化的,并且当 R4-R10 构成天然多粘菌素 B 环结构时 R4 不直接与辛酰基相连。更特别的,本发明涉及这样的衍生物,其中 R1-R10 选自 SEQ ID NO :9-26,更优选选自 SEQ ID NO :9-20。

[0041] 本发明还涉及包含两种或更多种本发明衍生物的组合产品,并涉及包含此类衍生物或其组合以及可药用载体和赋形剂的药物组合物。

[0042] 另外,本发明涉及治疗、减轻或改善个体中由革兰氏阴性菌所造成的感染的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的本发明衍生物或组合,其中所述细菌可选自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

[0043] 在另一个实施方案中,本发明涉及使得革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的方法,所述方法包括同时或以任意顺序依次施用治疗有效量的所述抗菌剂和本发明衍生物,其中所述抗菌剂可选自:克拉霉素、阿奇霉素、红霉素和其他大环内酯类药物、酮内酯类、克林霉素和其他林可酰胺类、链阳性菌素类、利福平、利福布汀、利福拉齐及其他利福霉素类、夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类、万古霉素、dalbavancin、telavancin、oritavancin 及其他糖肽抗生素、氟喹诺酮类、杆菌肽、四环素衍生物、 β 内酰胺抗生素、新生霉素、截短侧耳素类、叶酸合成抑制剂、去甲酰酶抑制剂和细菌流出泵抑制剂。

[0044] 本发明还提供了开发新抗生素的方法;用于降低天然多粘菌素、八肽菌素及其衍生物的毒性的方法;用于改善天然多粘菌素、八肽菌素及其衍生物的药物代谢动力学特性的方法;以及用于使得在临床上具有重要性的细菌对血清中存在的宿主防御机制补体致敏的方法。

[0045] 本发明还提供了本发明多粘菌素衍生物在制备用于治疗革兰氏阴性菌(例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)) 所引起的感染的药剂中的用途;在制备用于使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的药剂中的用途;以及在制备用于使革兰氏阴性菌对存在于血清中的宿主防御机制补体致敏的药剂中的用途。

[0046] 最后,本发明还涉及用于制备本发明多粘菌素衍生物的方法,所述方法包括通过用中性残基或共价键替换 1 至 4 个所述带正电残基或者通过将 1 至 4 个所述带正电残基转变成中性残基来修饰带有 4 至 6 个带正电残基的天然或合成的多粘菌素或八肽菌素或其衍生物,以获得带有 2 或 3 个正电残基的式 (I) 的多粘菌素衍生物。

[0047] 定义

[0048] 本文所用的“生理 pH”指高于 7.0 并低于 7.6 的 pH 值,例如在 7.1 至 7.5 范围内的 pH 值,如 7.2 至 7.4 范围内的 pH 值。

[0049] 本文所用的“正电荷”指在上述生理 pH 下的正电荷。

[0050] 本文所用的“阳离子”分子指含有一个或多个正电荷的分子。

[0051] 本文所用的“氨基酸残基”指 L- 或 D- 构型的任何天然的、非天然的或经修饰的氨基酸残基。

[0052] 本文所用的“等价残基”旨在包括对例如氨基酸进行的导致产生非天然氨基酸或其衍生物但保留所替代残基的结构和 / 或功能能力的明显修饰。

[0053] 本文所用的“天然多粘菌素”指多粘菌素类和环杆菌素类。

[0054] 对于本发明的目的,“多粘菌素衍生物”指天然多粘菌素或八肽菌素的合成的或半合成衍生物,其具有环状七肽 (或七肽环) 部分 R4-R10 和与 N 端氨酰基残基 R4 相连的侧链。所述侧链可由 R(FA)- 三氨酰基 (R1-R3)、R(FA)- 二氨酰基 (R2-R3)、R(FA)- 单氨酰基 (R3) 组成,或者仅由 R(FA) 组成。

[0055] 本文所使用的“化合物”包括所述化合物的所有立体化学异构体。

[0056] 本文所使用的“致敏活性”或“致敏能力”旨在包括任何提高细菌对抗菌剂的敏感性、使细菌对抗菌剂敏感或易感的能力。

[0057] 缩写

[0058] 脂肪酸 :FA, 脂肪酰残基 ;6-MOA 和 MOA, 6- 甲基辛酰基 ;6-MHA 和 MHA, 6- 甲基庚酰基残基 ;MO(H)A, 多粘菌素 B 中 6- 甲基辛酰基、6- 甲基庚酰基残基和相关脂肪酰残基的混合物 ;OHMDA, 3-OH-8- 甲基癸酸 ;

[0059] 氨基酸 :Dab, α , γ - 二氨基 - 正丁酰基残基 ;fDab, N- γ - 甲酰基 - 二氨基 - 正丁酰基残基 ;acDab, N- γ - 乙酰二氨基 - 正丁酰基残基 ;Abu, α - 氨基丁酰基残基 ;Thr, 苏氨酰基残基 ;Ser, 丝氨酰基残基 ;Phe, 苯丙氨酰基残基 ;Leu, 亮氨酰基残基 ;Ile, 异亮氨酰基残基 ;Ala, 丙氨酰基残基 ;sm-Dab, γ - 甲磺酸化 α , γ - 二氨基 - 正丁酰基残基。用于经修饰氨酰基残基的单字母代码是 :X, Dab ;Z, Abu ;B, N- γ -fDab ;J, N- γ -acDab。

[0060] 肽 :DAPB, 脱酰基多粘菌素 B ;DAC, 脱酰基粘杆菌素 ;PMBN, 多粘菌素 B 九肽 ;PMEN, 多粘菌素 E 九肽 ;PMB0, 多粘菌素 B 八肽 ;PMHP, 多粘菌素 B 七肽。

[0061] 其他 :cy, 环 (指括号中所包含的肽的环状部分) ;f, 甲酰基 ;ac, 乙酰基 ;LPS, 脂多糖 ;OM, 外膜 ;CFU, 集落形成单位。符号 * 在本文中用于 标示化合物的七肽环部分在其间闭合使得该分子其余部分为侧链的残基。

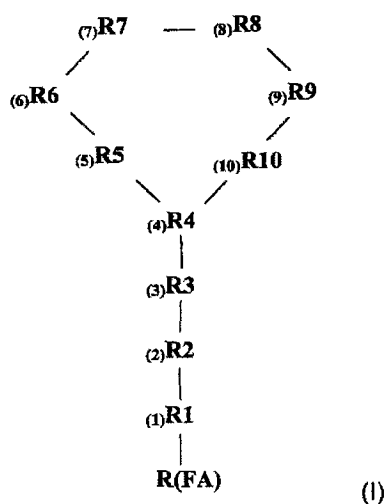
[0062] 发明详述

[0063] 现已发现, 含至少 2 个但不超过 3 个正电荷的多粘菌素衍生物仍具有针对革兰氏阴性菌的抗菌活性, 和 / 或具有使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的活性, 所述抗菌剂例如抗生素、半合成抗生素、化疗剂和宿主防御因子 (如补体)。

[0064] 相比于天然多粘菌素及其已知衍生物, 这一正电荷的减少可改善本发明衍生物的药学特性。更具体的, 相比于临床上使用的多粘菌素及其之前描述过和表征过的衍生物 (例如多粘菌素 B 九肽), 它可减少所述化合物的毒性 (包括肾毒性) 和 / 或减少由所述化合物所引起的宿主组织的组胺释放, 和 / 或带来更合适的药物代谢动力学特性, 例如更长的血清半衰期或更不易于被聚阴离子组织和脓组分失活。

[0065] 因此, 本发明涉及可由通式 I 表示的多粘菌素衍生物或其可药用盐 :

[0066]



[0067] 其中 R1、R2 和 R3 可以不存在；和

[0068] 其中所述化合物中游离的非取代阳离子电荷总数至少是 2，并且不超过 3。

[0069] 在天然多粘菌素和八肽菌素中，R(FA) 是 6-甲基辛酸 (6-MOA)、6-甲基庚酸 (6-MHA)、辛酸、庚酸、壬酸、3-OH-6-甲基辛酸、3-OH-8-甲基癸酸、3-OH-8-甲基壬酸、3-OH-8-癸酸和 3-OH-6-甲基辛酸。具有抗菌活性的已知衍生物实例包括其中 R(FA) 是 γ -苯基丁酸、异戊酸、9-芴甲氧碳酸、一系列 C:9 至 C:14 非分枝脂肪酸以及异 C:9 和异 C:10 脂肪酸的衍生物。

[0070] 在本发明的衍生物中，R(FA) 可以是任何疏水脂肪酸残基，优选选自辛酰基、癸酰基和 6-MHA 残基。

[0071] 本领域技术人员可容易认识到这些优选疏水 R(FA) 残基的等价物，其可选自：例如酰基残基，如任选取代的烷基残基、任选取代的异烷基残基、任选取代的环烷基残基、任选取代的烯基残基、任选取代的环烯基残基、任选取代的芳基残基、任选取代的杂芳基残基、任选取代的杂环残基，其中所述残基优选具有多于 5 个的碳原子，并且其中所述取代基还可包括任选的设计成位于酰基残基和所述肽 N 端之间的取代基。R(FA) 还可以是一段疏水寡肽。可能的 R(FA) 残基实例包括（但不限于）辛酰基、壬酰基、异壬酰基、癸酰基、异癸酰基、十一酰基、十二酰基、十四酰基、环己基、环庚酰基、环辛酰基、环壬酰基、环异壬酰基、环癸酰基、环异癸酰基、环十一酰基、环十二酰基、环十四酰基、己基、庚酰基和 9-芴甲氧羰基残基。

[0072] 在天然多粘菌素和八肽菌素中，R1 是 Dab 或不存在（即被共价键所替换）。具有抗菌活性的已知衍生物的实例包括其中 R1 是 Ala 或共价键的那些。

[0073] 在本发明的衍生物中，R1（如果存在的话）可以是任何氨基酸残基，只要所述衍生物中的正电荷总数不超过 3 并且侧链部分的正电荷总数不超过 2 即可，优选是 Abu（如果存在的话）。

[0074] 在天然多粘菌素和八肽菌素中，R2 是 Thr 或不存在（即被共价键所替换）。具有抗菌活性的已知衍生物实例包括其中 R2 是 O-乙酰-Thr、O-丙酰-Thr、O-丁酰-Thr 或共价键的那些。

[0075] 在本发明的衍生物中，R2（如果存在的话）可以是任何氨基酸残基，只要所述衍生物中的正电荷总数不超过 3 并且侧链部分的正电荷总数不超过 2 即可，优选选自 Thr、DThr

和 DAla(如果存在的话)。本领域技术人员还会认识到, Thr 的等价残基是 Ser。

[0076] 在天然多粘菌素和八肽菌素中, R3 是 Dab、DDab 或 DSer。许多具有抗菌活性的已知合成衍生物的实例包括其中 R3 是 Lys 或 2-氨基-4-胍基丁酸的那些。

[0077] 在本发明的衍生物中, R3(如果存在的话)可以是任何氨基酸残基, 只要所述衍生物中的正电荷总数不超过 3 并且侧链部分的正电荷总数不超过 2 即可, 优选选自 Thr、DThr、Ser、DSer、DAla、Dab 和 Abu(如果存在的话)。

[0078] 本领域技术人员可容易地认识到这些优选残基 R1、R2 和 R3 的等价残基, 其可选自例如, 共价键、丙氨酸、2-氨基己二酸、 α -正丁酸、N-(4-氨基丁基)甘氨酸、 α -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 α -氨基己酸、氨基环丙烷羧酸、氨基异丁酸、氨基降冰片基羧酸(aminonorbonylcarboxylate)、 α -氨基正戊酸、精氨酸、 N_{α} -甲基-精氨酸、天冬酰胺、 α -甲基天冬氨酸、天冬氨酸、N-苄基甘氨酸、N-(2-氨基甲酰基乙基)甘氨酸、N-(氨甲酰基乙基)甘氨酸、1-羧基-1(2,2-二苯基乙基氨基)环丙烷、半胱氨酸、 N_{α} -甲基二氨基-正丁酸、 N_{γ} -乙酰基二氨基正丁酸、 N_{γ} -甲酰基二氨基-正丁酸、 N_{γ} -甲基二氨基正丁酸、N-(N-2,2-二苯基乙基)氨甲酰基甲基-甘氨酸、N-(N-3,3-二苯基丙基)氨甲酰基甲基(1)甘氨酸、N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、叔丁基甘氨酸、2-氨基-4-胍基丁酸、N-(3-胍基丙基)甘氨酸、组氨酸、高苯丙氨酸、异锁链赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、羟基赖氨酸、 N_{α} -甲基赖氨酸、赖氨酸、 N_{α} -甲基羟基赖氨酸、 N_{α} -甲基赖氨酸、 N_{ϵ} -乙酰基羟基赖氨酸、 N_{ϵ} -乙酰基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲酰基羟基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲酰基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲基羟基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲基赖氨酸、甲硫氨酸、 α -甲基- γ -氨基丁酸、 α -甲基-氨基异丁酸、 α -甲基环己基丙氨酸、 α -萘基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、 α -甲基鸟氨酸、 N_{α} -甲基鸟氨酸、 N_{δ} -乙酰基鸟氨酸、 N_{δ} -甲酰基鸟氨酸、 N_{δ} -甲基鸟氨酸、鸟氨酸、青霉胺、苯丙氨酸、羟基脯氨酸、脯氨酸、 N_{α} -甲基二氨基-正丙酸、 N_{β} -乙酰基二氨基-正丙酸、 N_{β} -甲酰基二氨基-正丙酸、 N_{β} -甲基二氨基正丙酸、磷酸丝氨酸、丝氨酸、磷酸苏氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、正缬氨酸和缬氨酸。

[0079] 在天然多粘菌素和八肽菌素中, R4 是 Dab。具有抗菌活性的合成衍生物实例包括其中 R4 是 Lys 的那些。

[0080] 在本发明的衍生物中, R4 是包含能够使所述分子环化的功能侧链的氨基酸残基, 并可选自以下等同残基: Lys、羟基赖氨酸、鸟氨酸、Glu、Asp、Dab、二氨基丙酸、Thr、Ser 和 Cys, 优选 Dab。

[0081] 在天然多粘菌素和八肽菌素中, R5、R8 和 R9 是 Dab。具有抗菌活性的合成衍生物实例包括其中 R5、R8 和 R9 可以是 Lys 或 2-氨基-4-胍基丁酸的那些。

[0082] 在本发明的衍生物中, R5、R8 和 R9 是带正电或中性的氨基酸残基, 优选 Dab 或 Abu, 只要所述衍生物的总电荷数不超过 3 即可。

[0083] 本领域技术人员可容易地认识到这些优选残基的等价残基, 其可选自: 例如二氨基丁酸、二氨基丙酸、赖氨酸、羟基赖氨酸、鸟氨酸、2-氨基-4-胍基丁酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、D-苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、丝氨酸、 α -氨基正丁酸、 α -氨基正戊酸、 α -氨基己酸、 N_{ϵ} -甲酰基赖氨酸、 N_{ϵ} -乙酰基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲酰基羟基赖氨酸、 N_{ϵ} -乙酰基羟基赖氨酸、 N_{ϵ} -甲基羟基赖氨酸、L- N_{α} -甲基羟基赖氨酸、 N_{γ} -甲酰基二氨基正丁酸、 N_{γ} -乙酰基二氨基正丁酸、 N_{γ} -甲基二氨基正丁酸、 N_{β} -甲

酰基二氨基正丙酸、D-N_β-甲酰基二氨基正丙酸、N_β-乙酰基二氨基正丙酸、N_β-甲基二氨基正丙酸、N_δ-甲酰基鸟氨酸、N_δ-乙酰基鸟氨酸和 N_δ-甲基鸟氨酸。

[0084] 在天然多粘菌素和八肽菌素中,R6 是 DPhe 或 DLeu,R7 是 Leu、Ile、Phe 或 Thr。具有抗菌活性的合成衍生物实例包括其中 R6 是 DTrp 和 R7 是 Ala 的那些。

[0085] 在本发明的衍生物中,R6 是任选取代的疏水氨基酸残基,优选 DPhe 或 DLeu,以及 R7 是任选取代的疏水残基,优选是 Leu、Thr 或 Ile。

[0086] 本领域技术人员可容易地认识到这些优选疏水残基的等价残基,其可选自:例如苯丙氨酸、α-氨基正丁酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸和酪氨酸。本领域技术人员还可了解,苏氨酸的等价残基是丝氨酸。

[0087] 在天然多粘菌素和八肽菌素中,R10 是 Thr 和 Leu。具有抗菌活性的合成衍生物实例包括其中 R10 是 O-乙酰-Thr, O-丙酰-Thr 或 O-丁酰-Thr 的那些。

[0088] 在本发明的衍生物中,R10 是 Leu 或任何非疏水氨基酸残基,只要所述衍生物中的正电荷总数不超过 3 即可。优选 R10 是 Thr 或 Leu。

[0089] 本领域技术人员还可了解,苏氨酸的等价残基是丝氨酸。

[0090] 更具体的,以如下方式选择优选的残基,使得:当 R(FA)-R1-R2-R3 组成天然多粘菌素 B 侧链时,R8 和 R9 不都是甲酰化的;当 R4-R10 组成天然多粘菌素 B 环结构时,R4 不直接与辛酰基残基相连。

[0091] 上文所述最多 3 个正电荷的具体位置可以位于七肽环部分和/或侧链中(如果存在的话)。当本发明衍生物中存在 3 个正电荷时,所述 3 个正电荷可位于七肽环中;或者 2 个正电荷可位于七肽环中,而剩下的 1 个正电荷位于侧链中;或者 1 个正电荷可位于七肽环中,而剩下的 2 个正电荷位于侧链中。优选地,至少 2 个正电荷位于七肽环中。

[0092] 在一个实施方案中,本发明衍生物可选自下述衍生物的组,所述衍生物中 R1-R10 选自:Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 10;Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 11;Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 12;Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 13;Abu-Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 14;Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 15;Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu-],即 SEQ ID NO. 16;Thr-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 17;Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-],即 SEQ ID NO. 18;Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 19;DAla-DAla-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 20;cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 9;Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 21;Thr-Dab-cy[Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 22;Dab-Thr-Dab-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Abu-Thr-],即 SEQ ID NO. 23;Thr-Abu-cy[Dab-Lys-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 24;Thr-Abu-cy[Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 SEQ ID NO. 25;和 Thr-Abu-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-],即 SEQ ID NO. 26。

[0093] 在另一些实施方案中,本发明衍生物可选自:OA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 OA-SEQ ID NO. 10;DA-Thr-DSer-cy[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-],即 DA-SEQ ID NO. 10;OA-Thr-DThr-cy[Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-],

即 OA-SEQ ID NO. 11 ;OA Thr-DSer-cy [Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 12 ;DA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 DA-SEQ ID NO. 13 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 13 ;MHA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 MHA-SEQ ID NO. 13 ;MHA-Abu-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 MHA-SEQ ID NO. 14 ;OA-Thr-Dab-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 15 ;OA Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu-], 即 OA-SEQ ID NO. 16 ;OA-Thr-DAla-cy [Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 17 ;OA-Thr-Dab-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 18 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 19 ;OA-DAla-DAla-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 20 ;DA-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 DA-SEQ ID NO. 9 ;OA-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 21 ;OA-Thr-Dab-cy [Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 22 ;MHA-Dab-Thr-Dab-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Abu-rhr-], 即 MHA-SEQ ID NO. 23 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Lys-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 24 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Abu-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 25 ;和 OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 26.

[0094] 优选地, 本发明衍生物可选自 :OA-Thr-DSer-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 10 ;DA-Thr-DSer-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 DA-SEQ ID NO. 10 ;OA-Thr-DThr-cy [Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 11 ;OA-Thr-DSer-cy [Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 12 ;DA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 DA-SEQ ID NO. 13 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 13 ;MHA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 MHA-SEQ ID NO. 13 ;MHA-Abu-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 MHA-SEQ ID NO. 14 ;OA-Thr-Dab-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Abu-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 15 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Leu-], 即 OA-SEQ ID NO. 16 ;OA-Thr-DAla-cy [Dab-Dab-DPhe-Thr-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 17 ;OA-Thr-Dab-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Abu-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 18 ;OA-Thr-Abu-cy [Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 19 ;OA-DAla-DAla-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 OA-SEQ ID NO. 20 ;和 DA-cy [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr-], 即 DA-SEQ ID NO. 9.

[0095] 如本文实施例部分所示, 仅带有 3 个正电荷的本发明化合物可以是非常有效抑制革兰氏阴性菌生长或使其对抗菌剂致敏的药剂, 甚至仅带有 2 个正电荷的衍生物也可具有相同效果, 尽管是在更温和的水平上。

[0096] 对于直接抗菌活性, 至少 2 个和更优选 3 个正电荷位于七肽环部分 ;对于致敏活性, 至少 1 个和更优选 2 个或 3 个正电荷位于七肽环部分。另外, 侧链部分中两个羟基的存在显著增强直接抗菌活性。

[0097] Teuber(1970)、Srinivasa 和 Ramachandran(1980a) 和 Sakura 等 (2004) 的工作公开了仅具有 2 个或 3 个正电荷的衍生物及其他多粘菌素衍生物。但是, 所公开衍生物的抗菌活性非常弱且无临床意义 (Sakura 等 1980), 这是由于与本发明发现完全相反的氨基酸残基 (Srinivasa 和 Ramachandran 1980a), 或者由于因为不完全纯化而完全非特异性的氨基

酸残基 (Teuber 1970)。另外,上述工作均未描述、提示或启发研究这些衍生物使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的能力。如本发明实施例明白所示,人们不可能基于多粘菌素衍生物抑制革兰氏阴性菌生长的能力来预测多粘菌素衍生物使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的能力。例如,尽管需要高达 128 微克 / 毫升的无临床意义浓度的辛酰基多粘菌素 B 七肽来抑制大肠杆菌生长 (Sakura 等 2004),但低至 4 微克的量就足以使所述细菌对利福平适度致敏,如本文实施例部分所示。

[0098] Teuber (1970) 所述的乙酰化多粘菌素衍生物是不同乙酰化的衍生物的混合物。醋酸酐可与多粘菌素 B 分子的 5 个游离氨基中的任何一个反应,产生单乙酰化多粘菌素。因此,Teuber 的单乙酰化多粘菌素是 5 种单乙酰化多粘菌素衍生物的混合物,每种在不同的氨基处乙酰化。Teuber 的二乙酰化多粘菌素是 10 种不同乙酰化衍生物的混合物,三乙酰化也是 10 种不同乙酰化衍生物的混合物。Teuber 没有尝试将这些衍生物从所述混合物中分离出来。这种修饰多粘菌素的问题在于部分修饰可导致特异性降低。因此,对于抗菌活性具有重要性的一些氨基被部分取代 (因此失活),而一些不重要的氨基保持部分未取代。另外,取代的程度可导致批次间的差异。

[0099] 相反,本发明多粘菌素衍生物是分离的且在结构上明确限定和鉴定的化合物。

[0100] Srinivasa 和 Ramachandran (1980a) 认为,对于抑制绿脓假单胞菌 生长而言,三甲酰基多粘菌素 B 在残基 R1 和 R3 的游离侧链氨基以及二甲酰基多粘菌素 B 在残基 R1、R3 和 R5 的游离氨基是关键,而 R8 和 R9 的游离氨基不是关键的。与他们的结论不同,本发明的化合物包括缺少 R1 和 R3 游离氨基而在 R5、R8 和 R9 带有游离氨基、但仍是有力的抗绿脓假单胞菌及其他革兰氏阴性菌的药剂的化合物。

[0101] Sakura 等 (2004) 公开了缩短的多粘菌素 B 衍生物辛酰基多粘菌素 B 七肽。辛酰基残基与多粘菌素 B 七肽的 R4 残基 N 端相连得到了仅具有 3 个正电荷的化合物。Sakura 等发现辛酰基多粘菌素 B 七肽仅在非常高 (且无临床意义) 浓度 (128 微克 / 毫升) 下抑制细菌生长,而其他衍生物例如均带有 4 个电荷的辛酰基多粘菌素 B 八肽和辛酰基多粘菌素 B 九肽是非常有力的抑制细菌生长的药剂。Sakura 等没有公开或提示辛酰基多粘菌素 B 七肽使细菌对抗菌剂致敏的能力,也没有公开或提示更长的脂肪酸尾提高其抗菌活性,如本文实施例部分所示。

[0102] 在一个方面中,本发明提供了仅具有 2 个或 3 个正电荷而仍能够抑制一种或多种革兰氏阴性菌物种生长和 / 或使一种或多种革兰氏阴性菌物种对抗生素或抗菌剂致敏的新的多粘菌素衍生物。

[0103] 细菌对抗菌剂的易感性可以通过两种微生物学方法来确定。一种快速但粗略的方法使用已被特定量的抗菌剂所浸透的市售滤纸片。这些片被置于已接种了所测试生物体悬液的琼脂平板的表面,观察所述平板的生长抑制区。一种更精确的技术 (培养液稀释易感性测试) 包括准备含有液体培养基中药物的连续稀释液的试管,然后将所测试生物接种到所述管中。在适当的孵育期后,抑制所述细菌生长的最低药物浓度被认为是最小抑制浓度 (MIC)。

[0104] 本发明衍生物可抑制具有临床重要性的革兰氏阴性菌生长,或使其对抗菌剂致敏,所述细菌例如属于下列的那些:不动杆菌属 (Acinetobacter)、产气单孢菌属 (Aeromonas)、产碱杆菌属 (Alcaligenes)、博德特菌属 (Bordetella)、布兰汉氏菌

属 (Branhamella)、弯曲杆菌属 (Campylobacter)、柠檬酸杆菌属 (Citrobacter)、肠杆菌属 (Enterobacter)、埃希氏菌属 (Escherichia)、弗朗西丝氏菌属 (Francisella)、梭杆菌属 (Fusobacterium)、嗜血菌属 (Haemophilus)、螺杆菌属 (Helicobacter)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、军团菌属 (Legionella)、莫拉氏菌属 (Moraxella)、巴斯德氏菌属 (Pasteurella)、邻单胞菌属 (Plesiomonas)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、沙门氏菌属 (Salmonella)、沙雷氏菌属 (Serratia)、志贺氏菌属 (Shigella) 和耶尔森氏菌属 (Yersinia) 的物种。所述细菌可以是,例如:大肠杆菌 (Escherichia coli)、肺炎克雷伯氏菌 (Klebsiellapneumoniae)、产酸克雷伯氏菌 (Klebsiella oxytoca)、阴沟肠杆菌 (Enterobacter cloacae)、产气肠杆菌 (Enterobacter aerogenes)、其他肠杆菌物种、弗氏柠檬酸杆菌 (Citrobacter freundii)、绿脓假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)、其他假单胞菌物种、波美不动杆菌 (Acinetobacter baumannii),以及许多其他非发酵型革兰氏阴性菌物种。所述细菌还包括幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori),以及其他具有临床重要性的革兰氏阴性菌。

[0105] 所治疗的细菌感染包括,例如,菌血症、败血症、皮肤和软组织感染、肺炎、脑膜炎、盆腔腹膜区的感染、异物感染、血液病患者的发烧;与静脉内线或其他导管、canyl 和 / 或装置相关的感染;胃肠道、眼内或耳内的感染;浅表皮肤感染以及潜在毒性细菌在胃肠道、黏膜和 / 或皮肤的定殖。

[0106] 细菌感染性疾病包括(但不限于)严重的医院获得的感染、免疫受损患者的感染、器官移植患者的感染、重症监护室 (ICU) 中的感染、烧伤创面的严重感染、严重的社区获得的感染、囊性纤维化患者的感染,以及多重抗性革兰氏阴性菌造成的感染。

[0107] 本发明还涉及两种或更多种本发明衍生物用于联合治疗的组合。所述组合可包括具有不同抗菌活性谱或者能够使不同革兰氏阴性菌物种或菌株对抗菌剂致敏的衍生物。

[0108] 本发明的另一方面涉及包含与一种或多种可药用载体和赋形剂配制在一起的本发明多粘菌素衍生物、其盐形式、其选定组合以及任选地抗菌剂的药物组合物。它们有助于将活性化合物加工成可药用的制备物,其包括:例如稀释剂、填充剂、缓冲剂、增稠剂、润湿剂、分散剂、增溶剂、助悬剂、乳化剂、粘合剂、稳定剂、崩解剂、包裹剂、包衣剂、包埋剂、润滑剂、着色剂和调味剂以及吸附剂、吸附增强剂、保湿剂、防腐剂等,它们是本领域技术人员公知的。

[0109] 药物组合物包括其中含有有效实现预期目的之量的活性成分的组合。更具体地,治疗有效量指在可用于任何医学治疗的合理的受益 / 风险比下有效治疗、预防、减轻或改善病理症状或延长被治疗受试者存活时间的化合物的量。对治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围之内。

[0110] 可通过本领域公知的方法制备组合物,例如通过传统的混合、溶解、包裹、包埋、冻干、乳化和造粒过程。合适的制剂取决于所选的施用途径,药物组合物可被制备成立即释放或缓释(例如为了延长疗效和 / 或改善耐受性)。另外,可方便地通过药剂学领域已知的方法将所述制剂制成单位剂型的形式。

[0111] 本发明的药物组合物包括(但不限于)旨在用于静脉内、肌内、经口或局部施用的那些,以及作为栓剂或作为吸入气雾剂形式施用的那些。所述组合物包括静脉内、肌内、腹膜内、皮下、髓内、鞘内、心室内、鼻内或眼内注射剂,吸入气雾剂以及旨在用于直肠、经口、

阴道内、透粘膜或透皮递送的那些。

[0112] 对于胃肠外施用（例如通过单次注射、快速输注或者慢速输注），本发明化合物以及上文所述组合可在无菌水溶液中配制成合适的盐或酯形式，所述无菌水溶液优选生理相容性流体，例如盐水、5%葡萄糖、任氏溶液和Hank's溶液。所述制剂还可包含有机溶剂，例如丙二醇、聚乙二醇、丙二醇或相关化合物以及防腐剂和表面活性剂。

[0113] 可以由无机和有机酸制备可药用酸加成盐。来自无机酸的盐包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。来自有机酸的盐包括醋酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

[0114] 另外，用于胃肠外施用的药物组合物可以是在油或水载体中的混悬液或乳液，并可含有配制剂，例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。合适的亲脂载体和溶剂包括脂肪油，例如天然和/或合成脂肪酸酯，例如油酸乙酯和甘油三酯或脂质体。所述混悬液可含有增加混悬液粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡萄糖。

[0115] 胃肠外组合物可被制成单位剂量或多剂量密封容器的形式，例如安瓿和小瓶，并可保存于冷冻干燥（冻干）条件下，对于注射剂而言，仅需在临用前加入无菌液体赋形剂，例如注射用水。

[0116] 对于经口施用，固体形式制剂包括，例如，粉剂、片剂、丸剂、糖丸剂、锭剂、胶囊剂、扁囊剂（cachet）和微粒制剂。可使用固体赋形剂制备药物制剂：任选地将所得混合物粉碎，在需要时加入合适助剂后加工所述混合物制粒，以得到片剂或糖衣丸核心。固体载体/赋形剂可以是一种或多种还可用作稀释剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、粘合剂、防腐剂、调味剂、润湿剂、片剂崩解剂或者胶囊材料的物质。合适的载体包括但不限于碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、葡萄糖、乳糖、果胶、淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。

[0117] 适于经口施用的液体制备物包括，例如，水溶液、糖浆、酏剂、水性混悬剂、乳剂和凝胶剂。可以通过将活性成分溶解于水中和加入合适的稳定剂和增稠剂以及着色剂和调味剂来制备水溶液。可通过将粘性材料（例如天然或合成树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠以及其他公知助悬剂）与细微分开的活性成分一起分散于水中，来制备水性混悬剂。乳剂可在丙二醇水溶液中制备，或者可含有乳化剂，例如卵磷脂、失水山梨醇单油酸酯或者阿拉伯树胶。

[0118] 本发明化合物或上述组合还可配制成用于局部施用。在无菌条件下将所述活性化合物与可药用载体/赋形剂混合，其包括任何所需的缓冲剂和防腐剂。可以例如用水或油基础物质并添加合适乳化剂、分散剂、助悬剂、增稠剂、稳定剂或着色剂来制备膏剂、霜剂和洗剂。常用赋形剂包括动物和植物脂肪和油、蜡、凡士林、淀粉、纤维素衍生物、黄芪胶和聚乙二醇。

[0119] 其他局部制剂包括但不限于，滴耳液、滴眼液和透皮贴剂。

[0120] 对于透皮和透粘膜施用，可将本领域常用的渗透剂用于所述制剂中。

[0121] 对于吸入施用，本发明化合物和上述组合以从使用合适抛射剂（例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳）通风器、加压装置或喷雾器中产生的气雾剂形式递送。在加压气雾剂的情况下，可以通过提供阀来确定剂量单位，以递送计量的量。用于

吸入器或吹入器中的例 如明胶的胶囊和药筒 (cartridge) 可配制成含有所述化合物和合适粉末基础物质 (例如乳糖或淀粉) 的粉末混合物。

[0122] 本发明化合物和上述组合还可配置成直肠用组合物, 例如保留灌肠剂或栓剂, 其中使用常规栓剂基础物质, 例如可可脂、其他甘油酯、聚乙二醇或栓剂用蜡。

[0123] 本发明还涉及使用本发明多粘菌素衍生物或这些衍生物的组合作为患有感染性疾病的人或动物受试者临床治疗 (或预防方案) 的一部分的方法, 其包括将治疗有效剂量的至少一种本发明衍生物 (任选地与抗菌剂相组合) 施用给所述受试者。

[0124] 本发明还涉及使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的方法, 其中同时或以任何顺序依次施用本发明衍生物以及治疗有效量的所述抗菌剂。

[0125] 本发明衍生物和抗菌剂可在一种制剂中一起施用或者通过不同途径施用。例如, 所述多粘菌素衍生物可以静脉内施用, 而所述抗菌剂肌内、静脉内、皮下、经口或腹膜内施用。或者, 所述衍生物可肌内或腹膜内施用, 而所述抗菌剂可静脉内、肌内或腹膜内施用, 或者所述衍生物可以气雾剂或喷雾剂形式施用, 而抗菌剂通过例如静脉内施用。所述衍生物和抗菌剂可同时或依次施用, 只要它们以足以使得两者都在感染部位达到有效浓度的方式给药即可。

[0126] “治疗有效性”基于成功的临床结局, 它不要求本发明衍生物 (任选地与抗菌剂组合) 杀死参与感染的 100% 的细菌。成功的治疗依赖于在感染部位达到一定水平的抗菌活性, 其足以以使平衡有利于宿主的方式抑制细菌。当宿主防御最高效时, 所需要的抗菌效果可以是中等的。即便将生物载量仅减少一个对数级 (10 倍) 也可使得宿主自身的防御能够控制感染。另外, 激发早期杀菌 / 抑菌作用可能比长期杀菌 / 抑菌作用更重要。这些早期事件是治疗成功的重要和关键部分, 因为它们赢得了激活宿主防御机制的时间。提高杀菌率对于例如脑膜炎、骨或关节感染的感染来说可能特别重要。

[0127] 抗菌剂的治疗有效性依赖于细菌物种在有临床意义浓度的本发明衍生物下对所述抗菌剂的易感性。可在体内动物模型 (例如小鼠腹膜炎或兔 菌血症测定) 中证实本发明化合物在改善抗菌剂体内治疗有效性的作用, 并且可基于多种体外测试进行预测, 其包括 (1) 确定抑制革兰氏阴性菌生长 24 小时所需的抗菌剂最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), (2) 确定抗菌剂对革兰氏阴性菌动力学生长曲线的影响, 和 (3) 仅有抗菌剂连续稀释液或者与化合物连续稀释液联合的 MIC 方格测定 (checkerboard assay)。示例性模型或测试是本领域公知的。

[0128] 使用体外测定 24 小时的 MIC, 可显示本发明衍生物降低抗菌剂的 MIC。根据此结果, 预计体内同时施用所述化合物会提高革兰氏阴性菌对所述抗菌剂的易感性。还可显示本发明化合物将抗菌剂的 MIC 从被认为生物体有临床抗性的范围降低到生物体临床易感的范围。根据此结果, 预计体内同时施用一种或多种本发明化合物和抗菌剂会逆转抗生素抗性生物的抗性, 并且将其有效地转变成抗生素易感性生物。

[0129] 通过在存在或不存在本发明化合物的情况下测量抗菌剂对革兰氏阴性菌体外生长曲线的影响, 可以显示所述化合物在优选小于 24 小时的时期内增强抗菌剂的早期抗菌作用。早期杀菌 / 生长抑制作用的增强对于治疗结局的决定是很重要的。

[0130] 本发明多粘菌素衍生物和抗菌剂还可具有超越每种药剂自身的单独作用或者所述药剂一起的加合作用的协同或增效作用。在方格测定中, 本发明化合物与抗菌剂的组合

可产生“协同”分数抑制浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FIC)。方格方法是基于加合性的,其假设使用多种药物所观察到的结果是所测试药物单独作用的总和;根据此系统,小于 0.5 的 FIC 的得分为协同,1 的得分为加合,大于 1 但小于 2 的得分为无关的。

[0131] 适于与本发明衍生物联用的抗菌剂包括:例如,大环内酯类药物如克拉霉素、阿奇霉素和红霉素;酮内酯类、林可酰胺类如克林霉素;链阳性菌素类;利福霉素类如利福平、利福布汀和利福拉齐;夫西地酸、莫匹罗星、噁唑烷酮类;糖肽抗生素如万古霉素、dalbavancin、telavancin 和 oritavancin;氟喹诺酮类;四环素衍生物;青霉素的疏水衍生物;头孢菌素类;单环内酰胺类;卡巴培南类、培南类和其他 β 内酰胺抗生素;新生霉素;截短侧耳素类;叶酸合成抑制剂;去甲酰酶抑制剂和细菌流出泵抑制剂。治疗革兰氏阴性菌感染领域的技术人员可轻易地确定其他可使用的有临床意义的抗菌剂。优选地,所述抗菌剂选自疏水或中度疏水抗菌剂,对其来说革兰氏阴性菌的外膜是有效的透过屏障。

[0132] 本发明还包括本发明化合物或其组合用于使本文所列具有临床重要性的细菌对宿主防御机制补体(存在于人和动物新鲜血清中)致敏的用途,所述致敏通过在临床感染或疑似感染过程中使所述细菌受到本发明化合物或其组合的作用来实现。可以例如通过补体和多形核白细胞的联合作用来发挥宿主防御。

[0133] 医药领域的普通技术人员可通过考虑本领域公知的因素而容易地优化本发明化合物和同时施用的抗生素的有效剂量和施用方案,所述因素包括接受给药受试者的类型、年龄、体重、性别和医学状况、施用途径、受试者的肾功能和肝功能、期望效果、所使用的具体本发明化合物以及受试者对其的耐受性。所有抗微生物剂的剂量在肾损伤或肝功能不全的患者中都应进行调整,因为在有这些情况的患者中药物的代谢和/或排泄降低。儿童中的剂量一般也应根据体重而减少。

[0134] 施用给人或动物的本发明衍生物的日总剂量可有所不同,例如 0.1 至 100 毫克/千克体重的量,优选 0.25 至 25 毫克/千克体重。

[0135] 本领域普通技术人员还了解,最优治疗过程(即对于确定的天数每天给药的次数)将由所治疗状况的性质和程度、施用的形式、途径和部位以及所治疗的具体患者来决定,并且这些最适条件可通过常规技术来确定。

[0136] 本发明还提供了用于测定本发明化合物针对有害革兰氏阴性菌的抗菌活性和/或使其对抗菌剂和/或血清中存在的补体致敏的能力的方法,所述化合物是天然多粘菌素或八肽菌素的衍生物,其中与其来源的天然化合物相比,所述衍生物仅具有 2-3 个正电荷,所述方法包括使细菌与天然多粘菌素或八肽菌素的所述衍生物接触以及鉴定具有抗菌活性和/或使所述细菌致敏之活性的衍生物的步骤。

[0137] 本发明还提供了筛选与测试动物中或来自测试动物或来自人来源的肾组织或其成分结合能力降低的多粘菌素和八肽菌素衍生物的方法,其通过测量它们竞争性阻断氨基糖苷与肾组织或其成分结合的能力或阻断已知结合到肾组织或其成分的其他物质的结合能力的降低来进行。

[0138] 在又一个方面中,本发明提供了开发新型抗生素的方法,其包括以下步骤:提供具有总共 4 或 5 个正电荷或者像脱酰基多粘菌素中一样具有总共 6 个正电荷的天然多粘菌素或八肽菌素化合物或其衍生物;用不带正电荷的残基或者共价键取代 1 至 4 个带 1 个或多个

个正电荷的残基,由此产生具有 2 或 3 个正电荷的多粘菌素衍生物;测定所述衍生物化合物针对革兰氏阴性菌的抗菌活性和/或使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的能力;以及选择具有抗革兰氏阴性菌的抗菌活性或使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的能力的化合物。

[0139] 本发明还提供了分别通过化学或酶促处理天然多粘菌素或八肽菌素可得到的半合成多粘菌素衍生物,或者通过经遗传修饰的生物产生的其变体。化学处理包括但不限于用醋酸酐、甲酸、胍和草酸进行处理。酶促处理包括但不限于用例如多粘菌素脱酰基酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、枯草杆菌肽酶、枯草杆菌蛋白酶、粘杆菌素水解酶和 Nagarse 酶的处理。

[0140] 根据一个实施方案,优选的化合物比天然多粘菌素或八肽菌素的阳离子少,仅带有 2 个或 3 个正电荷,并且:

[0141] (a) 能够抑制大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 或波美不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 的生长和/或使其中任意种对抗生素致敏,和/或

[0142] (b) 如体内动物模式中所显示的,比临床使用的多粘菌素毒性更小,和/或

[0143] (c) 如动物模式和/或测量所述化合物对肾结构的亲和力之体外测试中所显示的,比临床使用的多粘菌素肾毒性更小,和/或

[0144] (d) 当局部施用或作为气雾剂吸入时能够比临床使用的多粘菌素更少地使组织释放组胺,和/或

[0145] (e) 药物代谢动力学更有利,例如相比于临床使用的多粘菌素具有更长的血清半衰期和/或更少被聚阴离子组织和脓组分失活。

[0146] 用于合成本发明化合物的方法包括但不限于下述方法。对于待合成的具体化合物,本领域普通技术人员能够选择合适的方法。

[0147] 1、可通过下述方法制备带有未变化七肽部分和经修饰的酰基-氨基酰基侧链的多粘菌素和八肽菌素半合成衍生物:

[0148] 通过本领域技术人员已知的方法保护起始材料(多粘菌素或八肽菌素或其修饰物)中的游离氨基。可通过使用例如叔丁氧羰基(tBoc)、苄氧羰基(Fmoc)、苄氧羰基(CBZ, Z)、烯丙氧羰基(ALOC)、3-吡啶基-N-氧代-甲氧羰基(如专利公开 GB 1323962 中所述)的残基来实现保护,通过使用希夫碱(例如苯甲醛)用日本专利公开 7115630/1971 中所述的方法实现保护,等等,它们可通过与产品性质相容的常规条件所移除。

[0149] 在水溶性差有时候给后续步骤带来问题的情况下,可使用带负电的封闭基团(例如 Fmoc 的磺酸衍生物或 Fmoc 的羧酸衍生物)进行保护,所述方法描述于美国专利公开 2006004185。可通过将合适的可移除带负电的高亲水性封闭基团与苏氨酸的 OH 基相连来增加水溶性。

[0150] 其后,用酶(例如多粘菌素脱酰基酶、多粘菌素水解酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶、枯草杆菌肽酶、Nagarse 酶或其他酶)对所述化合物进行酶处理,所述酶移除多粘菌素或八肽菌素化合物侧链的末端部分,或者甚至移除整个侧链。此处理后可任选地进行 Edman 降解步骤。所得化合物缺少整个侧链,仅仅由环状七肽部分组成,但具有游离

N 端 α 氨基。

[0151] 或者,可用草酸或甲酸处理具有受苯甲氧羰基或叔丁氧羰基保护之氨基的多粘菌素和八肽菌素,产生受保护的脱酰基衍生物,所述方法描述于 Kurihara 等 (1974)。所述步骤之后是进一步如上所述酶处理和 / 或 Edman 降解,以产生七肽。

[0152] 其后,将合适的残基与七肽环部分的游离 α 氨基位置相连。所述残基可含有酰基或相关残基和任选地氨基酸残基,优选地多至三个残基。例如,可通过将合成的 N-(酰基)-苏氨酸-D 苏氨酸残基添加到上述七肽来制备一种具有酰基和两个氨基酸残基的半合成化合物。这可以通过有机化学领域熟知的常规的一般技术来实现,这些技术包括使用 US 2006004185 中所述的 N-羟基-琥珀酰亚胺相连的残基。在此特定合成中,方法可包括使用 2-N-(正辛酰基)-丙氨酸-氨基丁酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

[0153] 2、带 3 个游离氨基的乙酰化的多粘菌素九肽。多粘菌素 D 仅带有 4 个正电荷。可用木瓜蛋白酶或无花果蛋白酶通过 Chihara 等 (1973) 和 Vaara 和 Vaara (1983a, b) 所述方法对其进行处理,产生相应九肽。然后可通过酰基异硫氰酸酯 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 US2006004185)、通过酰氯 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 Chihara 等 1974) 或者通过使用与 N-羟基-琥珀酰亚胺相连的残基 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 US 2006004185) 对所述九肽进行酰化。乙酰化多粘菌素 D 九肽仅带有 3 个游离氨基,都在七肽环部分中。

[0154] 或者,可通过上述方法保护多粘菌素 D 的游离氨基。这之后是酶处理和任选地 Edman 降解步骤,以产生九肽,然后可通过酰基异硫氰酸酯 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 US 2006004185)、通过酰氯 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 Chihara 等 1974) 或者通过使用与 N-羟基-琥珀酰亚胺相连的残基 (通过本领域技术人员公知的方法,其描述于 US 2006004185) 对其进行酰化,最后除去保护基团。

[0155] 以类似的方式,可制得酰基化多粘菌素 S 九肽和酰基化多粘菌素 F 九肽。它们都仅带有 3 个游离氨基。

[0156] 3、酰基化多粘菌素和八肽菌素七肽。可通过对天然化合物进行 Nagarse 酶处理制得七肽,如 Kimura 等 1992 所述。或者,它们可通过用其他例如多粘菌素酰基化酶、多粘菌素水解酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和枯草杆菌肽酶来制得,然后是任选地 Edman 降解步骤。还可通过肼或酸 (例如甲酸和草酸) 对天然化合物脱酰基来制得它们,然后是 Edman 降解。然后例如通过使用本领域技术人员公知的酰氯技术 (描述于 Chihara 等 1974) 来酰基化所述七肽。酰基化多粘菌素七肽仅带有 3 个游离氨基。

[0157] 4、可通过本领域技术人员已知的极为常规的技术制得全合成的多粘菌素和八肽菌素衍生物。这些方法包括液相合成方法以及固相合成方法,其描述于例如 Sakura 等 (2004)、Tsubery 等 (2000a, 2000b, 2002, 2005) 和 Ofek 等 (2004)。所述方法包括例如在关键的位置使用保护剂 (如 Fmoc、tBoc 和 CBZ) 以及环化步骤,其中使用 DPPA (叠氮磷酸二苯酯) 或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧代-三吡咯烷基-磷 (PyBop)、N-羟基苯并三唑 (HoBt) 和 N-甲基吗啉 (NMM)。许多不常见以及 D-氨基酸的 Fmoc 衍生物是市售的。

[0158] 5、涉及转化游离氨基以产生具有 2 个或 3 个正电荷的本发明化合物的示例性反应包括 (但不限于) 如下反应:

[0159] A) 所述化合物的游离氨基与包含反应性环氧基团的缀合部分反应,由此产生

β -羟基胺连接；

[0160] B) 所述化合物的游离氨基与包含反应性磺酰基卤化物的缀合部分反应，由此产生磺酰胺连接；

[0161] C) 所述化合物的游离氨基与包含反应性羧酸的缀合部分反应，由此产生胺基连接；

[0162] D) 所述化合物的游离氨基与包含反应性醛基的缀合部分反应（还原性条件下），由此产生胺基连接；

[0163] E) 所述化合物的游离氨基与包含反应性酮基的缀合部分反应（还原性条件下），由此产生胺基连接；

[0164] F) 所述化合物的游离氨基与包含反应性异氰基的缀合部分反应，由此产生尿素连接；

[0165] 参考文献列表

[0166] 本申请中引用的所有参考文献均通过参考整体并入本文。

[0167] Chihara S, Tobita T, Yahata M, Ito A, Koyama Y. 1973. Enzymatic degradation of colistin. Isolation and identification of α -N-Acyl α, γ -diaminobutyric acid and colistin nonapeptide. *Agr Biol Chem* 37:2455-2463.

[0168] Chihara S, Ito A, Yahata M, Tobita T, Koyama Y. 1974. Chemical synthesis, isolation and characterization of α -N-fattyacyl colistin nonapeptide with special reference to the correlation between antimicrobial activity and carbon number of fattyacyl moiety. *Agric Biol Chem* 38:521-529.

[0169] Kimura Y, Matsunaga H, Vaara M. 1992. Polymyxin B octapeptide and polymyxin B heptapeptide are potent outer membrane permeability-increasing agents. *J Antibiot* 45:742-749.

[0170] Kurihara T, Takeda H, Ito H, Sato H, Shimizu M, Kurosawa A. 1974. Studies on the compounds related to colistin. IX. On the chemical deacylation of colistin and colistin derivatives. *Yakugaku Zasshi* 94:1491-1494.

[0171] Nagai J, Saito M, Adachi Y, Yumoto R, Takano M. 2006. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J Control Release* 112:43-50.

[0172] Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Molec Biol Rev* 67:593-656.

[0173] Nikaido H, Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1-32.

[0174] Rose F, Heuer KU, Sibelius U, Hombach-Klonisch S, Ladislau K, Seeger W, Grimminger F. 1999. Targeting lipopolysaccharides by the non-toxic polymyxin B nonapeptide sensitizes resistant *E. coli* to the bactericidal effect of human neutrophils. *J Infect Dis* 182:191-199.

[0175] Sakura N, Itoh T, Uchida Y, Ohki K, Okimura K, Chiba K, Sato Y, Sawanishi H. 2004. The contribution of the N-terminal structure of polymyxin B peptides to

antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity. Bull Chem Soc Jpn 77 : 1915-1924.

[0176] Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1978. Chemical modification of peptide antibiotics: Part VI-Biological activity of derivatives of polymyxin B. Ind J Biochem Biophys 14 :54-58.

[0177] Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1979. The polymyxins. J Scient Industr Res 38 :695-709.

[0178] Srinivasa BD, Ramachandran LK. 1980. Essential amino groups of polymyxin B. Ind J Biochem Biophys 17 :112-118.

[0179] Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu Rev Biochem 46 :723-63.

[0180] Teuber M. 1970. Preparation of biologically active mono-N-acetyl (14C) -derivatives of the membrane-specific polypeptide antibiotic polymyxin B. Z Naturforsch 25b :117.

[0181] Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2000a. Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: Implications to sensitization of Gram-negative bacteria. J. Med Chem 43 :3085-3092.

[0182] Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2000b. The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: Studies on polymyxin B nonapeptide. Biochemistry 39 :11837-11844.

[0183] Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. 2001. N-terminal modifications of polymyxin B nonapeptide and their effect on antibacterial activity. Peptides 22 :1675-1681.

[0184] Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Eisenstein M, Fridkin M. 2002. Modulation of the hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. Molecular Pharmacology 62 :1036-42.

[0185] Tsubery H, Yaakov H, Cohen S, Giterman T, Matityahou A, Fridkin M, Ofek I. 2005. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 49 :3122-3128.

[0186] Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 56 :395-411.

[0187] Vaara M. 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Antimicrob Agents Chemother 37 :2255-2260.

[0188] Vaara M, Vaara T. 1983a. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. Nature (London) 303 : 526-528.

[0189] Vaara M, Vaara T. 1983b. Polycations sensitize enteric bacteria

toantibiotics. Antimicrob Agents Chemother 24 :107-113.

[0190] Vaara M, Vaara T. 1983c. Polycations as outer membrane-disorganizing agents. Antimicrob Agents Chemother 24 :114-122.

[0191] Vaara M, Viljanen P, Vaara T, **Mäkelä** P. 1984. An outer membrane-disorganizing peptide PMBN sensitizes E. coli strains to serum bactericidal action. J Immunol 132 :2582-2589.

[0192] Viljanen P, Matsunaga H, Kimura Y, Vaara M. 1991. The outer membrane permeability-increasing action of deacyl polymyxins. J Antibiotics 44 :517-523.

[0193] 实施例

[0194] 下述实施例举例说明了本发明的一些实施方案, 但不应认为是对本发明范围的限制。

[0195] 实施例 1

[0196] 肽合成

[0197] 使用标准 Fmoc 保护策略, 通过常规固相化学法合成多粘菌素衍生物 (“NAB 肽”或 “NAB 化合物”)。C 端氨基酸是预先连接在固相上市售的, 当用酸将其从树脂上切下时, 得到 C 端羧酸。

[0198] 保护策略是使用三个水平的独立保护——对 α 氨基功能的暂时性 Fmoc 保护, 其在酸切割阶段被移去的基团; 以及在环化反应发生过程中覆盖反应性侧链功能的半永久性保护。在将所述肽从树脂上切下之后, C 端羧酸与氨基酸之一的侧链上氨基功能反应, 形成环状肽。在环化步骤之后, 除去半永久性保护基得到 NAB 肽。

[0199] 因此, 所述氨基酸的 α 氨基功能被苄氧羰基 (Fmoc) 保护, 在每个循环用 DMF 中 20% 哌啶除去 Fmoc。用叔丁氧羰基 (tBoc, 在切割步骤被除去的酸不稳定基团) 保护参与环化的氨基酸 (例如二氨基丁酸)。用在酸切割步骤中稳定的基团 (即苄氧羰基 (Z)) 保护所有其他具有功能性侧链基团的氨基酸。氨基酸苯丙氨酸和亮氨酸天然地不需要侧链保护。氨基端不被保护; 这使得在酰基化过程中发生直接反应。

[0200] 在商品化自动合成仪中进行合成步骤, 其中使用六氟磷酸 2-(6 氯 -1-H- 苯并三唑 -1- 基) -1,1,3,3- 四甲基 - 铵 (HCTU) 作为活化剂。

[0201] 6- 甲基庚酸 (6-MHA) 来自 Ultra Scientific Inc, North Kingstown, RI, USA (产品号 : FLBA002)。其他脂肪酸来自标准供应商。

[0202] 通过使用 4 倍摩尔过量的每种氨基酸或脂肪酸、4 倍摩尔过量的活化剂 HCTU (见上文) 和 8 倍摩尔过量的 N- 甲基吗啉进行酰基化。反应时间为 30 分钟。

[0203] 已受保护的氨基酸购买自标准供应商。通过用 95% 三氟乙酸和 5% 水的溶液在室温反应 2 小时将肽从树脂上移去, 得到部分保护的产物。用二乙醚沉淀所得肽。

[0204] 所使用的环化混合物是六氟磷酸苯并三唑 -1- 基 - 氧代 - 三吡啶烷基 - 磷 (PyBop)、N- 羟基苯并三唑 (HoBt) 和 N- 甲基吗啉 (NMM), 分别摩尔过量 2、2 和 4 倍。所述肽溶解于二甲基甲酰胺, 加入环化混合物, 使之反应 2 小时。通过加入冷的二乙醚沉淀环化的受保护肽。通过用水洗涤所述肽除去任何残余的 PyBop。

[0205] 通过催化脱氢除去剩下的侧链保护基 (Z)。所述肽在氢气气氛和钯炭 (palladium charcoal) 催化剂存在下溶解于乙酸 - 甲醇 - 水 (5 : 4 : 1) 中。

[0206] 通过反相色谱使用常规乙腈：水：三氟乙酸梯度纯化所述肽。通过冻干使产物干燥。

[0207] 产量为 20-40 毫克,约为从与树脂结合的第一氨酰基残基摩尔量(约 100 微摩尔)计算所得理论值的 20% -40%。

[0208] 如反相 HPLC 所估计的,纯度超过 95%。对于酰基化残基,Edman 降解产物不显示任何氨基酸残基,表明与预期一致,N 端氨基酸残基的 α 氨基由于成功的 N- 酰基化而被封闭。在实验误差范围内,所得的质量是如理论值所预计的质量。

[0209] 实施例 2

[0210] 所述化合物针对大肠杆菌的直接抗菌活性

[0211] 对均带有至少 2 个但不超过 3 个正电荷的实施例 1 中所合成的肽抑制大肠杆菌生长的能力进行了研究。利用 LB 琼脂 (LB Agar Lennox, Difco, BD, Sparks, MD, USA) 平板进行此测定。指示生物大肠杆菌 IH3080 (K1:018) 是带荚膜菌株,最初分离自患有脑膜炎的新生儿 (Vaara 等, 1984), 并且获得自国家公共卫生研究院 (赫尔辛基, 芬兰)。

[0212] 从 IH3080 在 LB 琼脂上的过夜生长培养物中制得 0.9% NaCl 中约 10^8 个细胞 / 毫升的混悬液。然后用移液器将此混悬液的等分试样置于琼脂平板上,轻轻晃动平板以使混悬液均匀铺满平板的整个表面。之后,通过用巴斯德移液管移去未吸收的混悬液部分。在表面干燥之后,用无菌的边缘锋利的窄金属管、一次性枪头和真空吸引器在平板上钻出小孔 (直径 2 毫米,每个平板 5 个孔)。然后将 0.9% NaCl 中的肽溶液 (1 微克 / 毫升和 0.1 微克 / 毫升的浓度) 样品 (4 微升和 10 微升) 移至孔中,使样品液体被吸收。对照包括不含待测试化合物的 0.9% NaCl 溶液。然后在 37°C 将平板孵育 18 小时,之后测量每个孔周围生长抑制区的直径;不减去孔自身的直径。最后,将直径转化成生长抑制的表面面积 (以平方毫米计)。

[0213] 表 2 显示,所述衍生物针对大肠杆菌 IH3080 的抗菌活性与等量的多粘菌素 B 和一些与本发明无关的多粘菌素衍生物的比较。NAB734、NAB737、NAB739 和 NAB740 是最强的抗菌化合物,甚至强于多粘菌素 B 对大肠杆菌 IH3080 的抗菌性。含有 4 微克 NAB739 的孔产生高达 133 平方毫米的生长抑制面积。在所有这些 4 种 NAB 化合物中,侧链均由两个带有羟基的氨酰残基组成。

[0214] 与 NAB739 不同,NAB7061 在 4 微克时不具有抗菌性。但是,它在 10 微克时显示显著的抗菌活性。NAB7061 仅在 R3 带有 Abu (代替 D-Ser) 这一点上不同于 NAB739。脂肪酰基部分从 NAB7061 中的 C8 延长至 NAB7062 中的 C10 导致在 4 微克时显示显著增强的抗菌活性。另外,3 种其他的肽 (NAB738、NAB716 和 NAB719) 显示显著的抗菌活性,尽管明显弱于 NAB739 和其他最强的抗菌化合物。

[0215] 对大肠杆菌具有直接抗菌性的化合物的普遍特征是存在 3 个正电荷,其中所有三个或至少 2 个位于环部分的合适位置。在后者的情况下,所述电荷的相对位置显著影响对大肠杆菌的抗菌活性的效力。

[0216] 另外,如表 2 所示,侧链的结构和长度也显著影响抗菌活性的效力。存在由至少两个氨酰残基组成的侧链似乎对所述化合物针对大肠杆菌的抗菌性而言十分重要,因为缺少 R2 (NAB713) 或缺少 R2 和 R3 (辛酰基 PBHP) 的化合物在所述测定使用的条件下也缺少直接抗菌活性。但是,可以预计,可通过使用更长的如 R (FA) 残基代替辛酰基残基来补偿这些残

基的缺少。

[0217] 表 2

[0218] 化合物结构及其针对大肠杆菌 IH3080 的抗菌活性*

[0219]

	结构 **				所带正电荷		在以下量时的 抗菌活性	
	FA-部分	肽序列 ***						
		侧链	环部分	SEQ ID No.	环部分	总	4 µg	10 µg
参照化合物								
多粘菌素B	MO (H) A	XTX	cy [XXFLXXT]	1	3	5	79	133
多粘菌素E	MO (H) A	XTX	cy [XXLLXXT]	2	3	5	ND	ND
脱酰基多粘菌素B	-	+XTX	cy [XXFLXXT]	3	3	6	57	113
脱酰基多粘菌素E	-	+XTX	cy [XXLLXXT]	4	3	6	79	95
多粘菌素B九肽	-	+TX	cy [XXFLXXT]	5	3	5	0	0
多粘菌素B七肽	-	-	+cy [XXFLXXT]	6	4	4	0	0
NAB704	-	+TZ	cy [XXFLXXT]	7	3	4	0	0
NAB705	-	+ZTZ	cy [XXFLXXT]	8	3	4	0	0
辛酰基 PMBH	OA	-	cy [XXFLXXT]	9	3	3	0	0
本发明化合物								
NAB 739	OA	TS	cy [XXFLXXT]	10	3	3	133	177
NAB 740	DA	TS	cy [XXFLXXT]	10	3	3	95	133
NAB 737	OA	TT	cy [XXFTXXT]	11	3	3	133	201
NAB 734	OA	TS	cy [XXFTXXT]	12	3	3	113	177
NAB 7062	DA	TZ	cy [XXFLXXT]	13	3	3	50	99
NAB 7061	OA	TZ	cy [XXFLXXT]	13	3	3	0	50
NAB 706	MHA	TZ	cy [XXFLXXT]	13	3	3	5	7
NAB 707	MHA	ZTZ	cy [XXFLXXT]	14	3	3	5	7
NAB 716	OA	TX	cy [XXFLZXT]	15	2	3	13	64
NAB 719	OA	TZ	cy [XXFLXXL]	16	3	3	7	50
NAB 738	OA	TA	cy [XXFTXXT]	17	3	3	0	64
NAB 717	OA	TX	cy [XXFLXZT]	18	2	3	0	0
NAB 718	OA	TZ	cy [XXLLXXT]	19	3	3	0	0
NAB 733	OA	AA	cy [XXFLXXT]	20	3	3	0	0
NAB 736	DA	-	cy [XXFLXXT]	9	3	3	0	0
NAB 713	OA	Z	cy [XXFLXXT]	21	3	3	0	0
NAB 715	OA	TX	cy [XZFLXXT]	22	2	3	0	0
NAB 721	MHA	XTX	cy [XXFLZZT]	23	1	3	0	0
NAB 731	OA	TZ	cy [XXFLXXT]	24	3	3	0	0
NAB 710	OA	TZ	cy [XZFLXXT]	25	2	2	0	7
NAB 709	OA	TZ	cy [XXFLXZT]	26	2	2	0	0
NAB 708	OA	TZ	cy [XXFLZXT]	27	2	2	0	0
NAB 725	OA	XTX	cy [XZFLXZT]	28	1	3	0	0
NAB 726	OA	XTX	cy [XZFLZXT]	29	1	3	0	0
NAB 722	MHA	XTX	cy [XZFLZZT]	30	0	2	0	0
NAB 735	OA	XXX	cy [XZFLZZT]	31	0	3	0	0
NAB 701	-	+TX	cy [XXFLZZT]	32	1	3	0	0
NAB 702	-	+TX	cy [XXFLBBT]	33	1	3	0	0
NAB 703	-	+TX	cy [XXFLJJT]	34	1	3	0	0

[0220] *以 LB 平板上含 4 或 10 微克化合物的孔周围的生长抑制（以平方毫米计）测得的抗菌活性

[0221] **氨基酸残基的单字母代码：A, Ala；F, Phe；K, Lys；L, Leu；S, Ser；T, Thr；X Dab；Z, Abu；B, N-γ-甲酰基-Dab；J, N-γ-乙酰基-Dab。下划线字母表示处于 D 构型的残基。

粗体字母表示带有正电荷的残基。粗体+表示所述肽游离N端的 α 氨基基团的正电荷。缩写:cy,环。

[0222] ***在序列表中, X、Z、B、J 和 D 构型的氨基酸被称为 Xaa, 定义为修饰残基 (MOD_RES)。

[0223] 实施例 3

[0224] 选定的 NAB 化合物针对波美不动杆菌和绿脓假单胞菌的直接抗菌活性

[0225] 通过使用实施例 2 中所述的易感性测定方法测定 12 种 NAB 化合物针对波美不动杆菌 ATCC 19606 和绿脓假单胞菌 ATCC 27853 的直接抗菌活性。结果显示于表 3。五种化合物 (NAB7062、NAB734、NAB737、NAB739 和 NAB740) 针对抗波美不动杆菌具有显著的活性。在实施例 2 中, 相同的化合物显示出对大肠杆菌非常有效。NAB739 和 NAB740 的抗菌活性与多粘菌素 B 相当或者甚至更强。

[0226] 针对绿脓假单胞菌, 活性最强的 NAB 化合物是 NAB739、NAB740 以及针对大肠杆菌和波美不动杆菌几乎没有活性的 NAB736。NAB740 是活性最强的化合物, 其活性与多粘菌素 B 一样强。所有三种 NAB 化合物在侧链中都没有正电荷, 而仍然对绿脓假单胞菌有抗性。此发现与 Srinivasa 和 Ramachandran (1980a) 称 R1 和 R3 的游离氨基基团对抑制绿脓假单胞菌生长十分必要的结论不一致。

[0227] 出人意料的, NAB736 对绿脓假单胞菌相当有效, 而辛酰基 PMBH 的效果则差得多。因此, 将 R(FA) 部分从 C8 延长到 C10 对活性有显著影响。

[0228] 表 3

[0229] 十二种新化合物针对波美不动杆菌和绿脓假单胞菌的抗菌活性*

[0230]

	波美不动杆菌 ATCC 19606		绿脓假单胞菌 ATCC 27853		
	4 μ g	10 μ g	4 μ g	10 μ g	
NAB 7061	0	0	0	0	
NAB 7062	13	38	0	0	
NAB 716	0	0	0	0	
NAB 717	0	0	0	0	
NAB 718	0	0	0	0	
NAB 719	0	0	0	0	
NAB 736	0	0	38	79	
NAB 734	38	95	13	50	
NAB 737	38	79	0	28	
NAB 738	0	0	0	0	
NAB 739	113	177	38	79	
NAB 740	133	201	64	133	
多粘菌素B	113	154	95	133	
PMBN	0	0	113	177	
辛酰基 PMBH	未检出	未检出	0	13	

[0231] *以 LB 平板上含 4 或 10 微克化合物的孔周围的生长抑制 (以平方毫米计) 测得的抗菌活性

[0232] 实施例 4

[0233] NAB734 针对选定的革兰氏阴性菌的直接抗菌活性

[0234] 通过使用实施例 2 所述易感性测定方法, 比较 11 种革兰氏阴性菌 (9 种不同物种) 对 NAB734 和多粘菌素 B 的易感性。所述菌株包括属于粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和奇异变性菌 (*Proteus mirabilis*) 的物种, 两种物种都是公知对多

粘菌素有抗性的。另外,还使用公知也抗多粘菌素的革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 进行易感性测定。十种来源于 ATCC 的菌株 (美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA, USA), 一种来源于 CCUG (哥德堡大学培养物保藏中心, 瑞典)。大肠杆菌 IH3080 的来源描述于实施例 2。硫酸多粘菌素 B 来自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

[0235] 表 4 中的结果显示, NAB734 一般可被认为针对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 和弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 大致一样有效。它针对波美不动杆菌的效力似乎略微低于多粘菌素 B, 针对绿脓假单胞菌的效力明显低于多粘菌素 B。已知多粘菌素抗性细菌物种的代表对于 NAB734 也有抗性。这提示 NAB734 具有高度特异性的抗菌作用, 其作用模式非常类似于多粘菌素 B。

[0236] 表 4

[0237] NAB734 针对选定的革兰氏阴性菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性*

[0238]

菌株	NAB 734		硫酸多粘菌素B	
	4 μ g	10 μ g	4 μ g	10 μ g
大肠杆菌 ATCC25922	133	177	95	133
大肠杆菌 IH3080	113	154	95	133
肺炎克雷伯氏菌 ATCC13883	64	113	79	113
肺炎克雷伯氏菌 CCUG45421	64	104	95	133
产酸克雷伯氏菌 ATCC13182	95	143	79	104
阴沟肠杆菌 ATCC23355	133	177	95	143
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC8090	133	177	95	154
波美不动杆菌 ATCC19606	57	79	113	154
绿脓假单胞菌 ATCC27853	13	50	95	133
粘质沙雷氏菌 ATCC8100	0	0	0	0
奇异杆菌 ATCC29906	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌 ATCC 25923	0	0	0	0

[0239] *以 LB 平板上含 4 或 10 微克化合物的孔周围的生长抑制 (以平方毫米计) 测得的抗菌活性

[0240] 实施例 5

[0241] NAB 化合物使大肠杆菌 IH3080 对模式抗生素利福平致敏的能力

[0242] 还研究了本发明均带有至少 2 个但不超过 3 个正电荷的新型 NAB 肽使大肠杆菌 IH3080 对利福平致敏的能力。此测定通过使用含有浓度逐渐增加 (0.1 μ g/ml、0.3 μ g/ml、1 μ g/ml) 利福平 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U. S. A) 的 LB 平板与实施例 2 中所述的易感性测定平行进行。

[0243] 表 5 显示了 NAB 化合物 (4 微克) 在利福平 (0.1 和 1 微克 / 毫升)

[0244] 存在针对下大肠杆菌 IH3080 的活性与等量的前述已知使革兰氏阴性菌对抗菌剂致敏的物质 (即多粘菌素 B 七肽、脱酰基多粘菌素 B、脱酰基粘杆菌素、多粘菌素 B 九肽) 以及多粘菌素 B 之活性的比较。所述化合物还包括辛酰基 PMBH, 之前未曾报道过能够使细菌对抗生素致敏的药剂。

[0245] 一些 NAB 化合物使大肠杆菌 IH3080 对浓度低至 0.1 微克 / 毫升利福平的抗菌作用致敏。在所测试化合物不存在时, 抑制作用需要一百倍浓度 (10 微克 / 毫升) 的利福平。

一些在 4 微克时缺少显著直接抗菌活性的化合物能够使靶标细菌对利福平致敏。这些化合物包括 NAB7061、NAB717、NAB718 和 NAB733。

[0246] 另外,大多数具有直接抗菌活性(即利福平不存在时的抗菌活性,参见实施例 2)的 NAB 化合物在利福平存在时更加有效地抑制靶标细菌。活性最强的化合物 NAB734、NAB737、NAB738 和 NAB739 的效力明显强于公知的有效 OM 穿透剂 PMBN。

[0247] 活性最强的 NAB 化合物带有 3 个正电荷并且在环部分的合适位置上有至少 2 个正电荷,其相对位置影响增敏活性的效力。特别应该注意,在环部分仅带有两个正电荷并且在 R3 带有 Dab 形式的第三正电荷的 NAB716 能够显著地使大肠杆菌对利福平致敏。

[0248] 在具有最弱致敏活性的缺少 R2 和 R3 的均具有辛酰基残基作为 R(FA) 的辛酰基 PMHP 系列化合物中,缺少 R2 的 NAB713 具有略强的活性,带有 R2 和 R3 的 NAB7061 具有很强的活性。这表明,R2 和 R3 的存在是有利的。但是,其缺少至少可被 R(FA) 部分的延长(像在 NAB736 中一样)所部分补偿。它带有癸酰基残基作为 R(FA) 部分,缺少 R2 和 R3,是相当有活性的致敏剂。

[0249] 所带的 2 个正电荷都在环部分的 NAB 化合物活性比其他结构上类似、只是所带全部 3 个正电荷都在环部分的 NAB 化合物要低,或者对于 1 个化合物(NAB708),其在所使用的研究条件下没有活性。

[0250] 在所使用的研究条件下,在侧链中带有 2 个正电荷并且在环部分带有 1 个正电荷的 NAB 化合物即便有活性也非常低。在所使用的研究条件下,所有 3 个正电荷都在侧链中的 NAB735 没有活性。同样,所述电荷在环部分中的相对位置影响了致敏活性的效力。

[0251] 表 5

[0252] 化合物(4 微克)在利福平存在下针对大肠杆菌 IH3080 的抗菌活性*

[0253]

	下述浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 利福平 存在时的抗菌活性		
	0	0.1	1.0
参照及其它化合物			
多粘菌素B	79	95	104
多粘菌素E	未检出	未检出	未检出
脱酰基多粘菌素B	57	79	127
脱酰基多粘菌素E	79	87	127
多粘菌素B九肽	0	20	113
多粘菌素B七肽	0	0	38
NAB 704	0	0	24
NAB 705	0	0	5
辛酰基 PMBH	0	0	38
本发明的新化合物			
NAB 739	133	177	201
NAB 740	95	95	95
NAB 737	133	177	201
NAB 734	113	154	201
NAB 7062	50	104	104
NAB 7061	0	113	155
NAB 706	5	79	133
NAB 707	5	87	113
NAB 716	13	133	165
NAB 719	7	79	95
NAB 738	0	133	177
NAB 717	0	71	95
NAB 718	0	13	133
NAB 733	0	95	113
NAB 736	0	113	133
NAB 713	0	20	38
NAB 715	0	0	33
NAB 721	0	13	28
NAB 731	0	0	5 (22**)
NAB 710	0	7	13
NAB 709	0	0	13
NAB 708	0	0	0
NAB 725	0	0	0
NAB 726	0	0	0
NAB 722	0	0	0
NAB 735	0	0	0
NAB 701	0	0	0
NAB 702	0	0	0
NAB 703	0	0	0

[0254] *以不含利福平或者含有利福平 (0.1 或 1.0 微克 / 毫升) 的平板上含 4 微克化合物的孔周围的生长抑制 (以平方毫米计) 测得的抗菌活性

[0255] **括号内的值是使用含有 10 微克化合物的孔所获得的

[0256] 实施例 6

[0257] NAB 化合物使波美不动杆菌和绿脓假单胞菌对模式抗生素利福平致敏的能力

[0258] 还研究了本发明涉及的 NAB 肽使波美不动杆菌和绿脓假单胞菌对利福平致敏的能力 (表 6)。此测定通过使用含有浓度逐渐增加 (0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.3 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$) 利福平

的 LB 平板与实施例 3 中所述的易感性测定平行进行。

[0259] 一些 NAB 化合物具有非常显著的使波美不动杆菌对利福平致敏的能力。活性最强的化合物 NAB734、NAB737 和 NAB739 的效力甚至明显强于公知的有效 OM 穿透剂 PMBN。NAB739 对绿脓假单胞菌生长的抑制在利福平存在时略强于不存在利福平时。

[0260] 表 6

[0261] 十二种新化合物 (4 微克) 在利福平 (0.1 μ g/ml 或 0.3 μ g/ml) 存在下针对波美不动杆菌和绿脓假单胞菌的抗菌活性*

[0262]

	波美不动杆菌 ATCC 19606			绿脓假单胞菌 ATCC 27853		
	0	0.1	0.3	0	0.1	0.3
NAB 7061	0	28	50	0	0	0
NAB 7062	13	50	95	0	0	7
NAB 716	0	0	64	0	0	0
NAB 717	0	0	50	0	0	0
NAB 718	0	0	38	0	0	0
NAB 719	0	154	133	0	0	7
NAB 736	0	95	154	38	38	38
NAB 734	38	201	283	13	20	20
NAB 737	38	201	283	0	20	20
NAB 738	0	95	154	0	13	13
NAB 739	113	177	314	38	64	64
NAB 740	133	154	154	64	64	64
PMBN	0	133	154	113	113	154
辛酰基 PMBH	未检出	未检出	未检出	0	13	13

[0263] *以不含利福平 (对照) 或者含有利福平 (0.1 或 0.3 微克 / 毫升) 的平板上含 4 微克化合物的孔周围的生长抑制 (以平方毫米计) 所测的抗菌活性

[0264] 实施例 7

[0265] NAB7061 使大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌和阴沟肠杆菌对广范围的抗菌剂致敏

[0266] 通过使用存在和不存在 NAB7061 (4 微克 / 毫升) 的 Mueller-Hinton 琼脂培养基 (产品号 Lab039 ;LabM Ltd., Bury, Lancs, UK), 测定一组代表性临床应用抗微生物剂对两株大肠杆菌 (ATCC25922 和 IH3080)、肺炎克雷伯氏菌 ATCC13883 和阴沟肠杆菌 ATCC23355 的最低抑制浓度 (MIC)。通过使用 E-strips (Biodisk Ltd., Solna, Sweden) 根据制造商的说明测定 MIC。所使用的 NAB7061 浓度本身并不抑制靶细菌生长。NAB7061 对大肠杆菌 IH3080 和肺炎克雷伯氏菌 ATCC13883 的 MIC > 16 μ g/ml, 对大肠杆菌 ATCC25922 为 16 μ g/ml, 对肺炎克雷伯氏菌 ATCC23355 为 8 μ g/ml。

[0267] 结果在表 7 中显示。NAB7061 在 4 微克 / 毫升浓度时能够以 170 至 1500 的因数使测试菌株对利福平致敏。致敏因数定义为不存在 NAB7061 时抗生素的 MIC 与 4 微克 / 毫升 NAB7061 存在下的 MIC 的比值。对克拉霉素 (63-380)、莫匹罗星 (24-512)、阿奇霉素 (31-94)、红霉素 (21-48) 也观察到相当高的致敏因数, 对于一些菌株, 夫西地酸、奎奴普丁-达福普汀、克林霉素、利奈唑胺和万古霉素也观察到相当高的致敏因数。所有这些抗菌剂都是非常疏水的或大的 (万古霉素), 并已知被革兰氏阴性菌的完整 OM 所阻挡, 但可以透过受损的 OM。没有发现对哌拉西林、头孢他啶、头孢噻肟、左氧氟沙星、环丙沙星、美罗培南

和妥布霉素显著致敏（致敏因数 < 2 ，通过使用大肠杆菌 ATCC25922 测定），所有这些药剂都是亲水的或者相对亲水的，对它们来说，完整 OM 不是有效的穿透屏障。

[0268] 表 7

[0269] 在 NAB7061 浓度为 4 微克 / 毫升时选定抗菌剂的致敏因数*

[0270]

	大肠杆菌 ATCC 25922	大肠杆菌 IH 3080	肺炎克雷 伯氏菌 ATCC 13883	阴沟肠杆菌 ATCC 23355
利福平 **	250 - 750	170 - 350	250 - 500	750 - 1500
克拉霉素 ***	170 - 380	190 - 260	63	85 - 380
莫匹罗星 ***	64 - 170	64 - 85	24 - 32	250 - 512
阿奇霉素 ***	24 - 64	31 - 94	31 - 43	32
红霉素 ***	32 - 48	32 - 42	24 - 48	21 - 43
夫西地酸	> 43	> 43	> 4	> 8
奎奴普丁-达福普汀	> 21	> 21	1	> 5
克林霉素	6	12	43	32
利奈唑胺	> 11	> 8	> 4	> 8
万古霉素	5	2.5	1	32
多粘菌素B	5	2	1	4
甲氧苄啶	4	3	2	3
莫西沙星	2.5	4	1.4	4

[0271] *致敏因数是不存在 NAB7061 时抗生素的 MIC 与 4 微克 / 毫升 NAB7061 存在下 MIC 的比值

[0272] **来自 5 个独立测定的结果

[0273] ***来自 2 个独立测定的结果

[0274] 实施例 8

[0275] 33 种不同革兰氏阴性菌株在 NAB7061 (4 微克 / 毫升) 存在下对利福平和克拉霉素的易感性

[0276] 通过如实施例 7 中的 E-test 方法并使用含有或不含 NAB7061 (4 微克 / 毫升) 的 Mueller-Hinton 琼脂, 测定利福平和克拉霉素对一组代表性临床相关革兰氏阴性菌不同菌株的最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentrations, MIC)。此浓度的 NAB7061 本身不抑制靶细菌的生长。菌株来源于 ATCC (11 种菌株)、CCUG (11 种菌株) 和 NCTC (英国国家典型培养物保藏中心, Colindale, UK ; 2 种菌株)。8 种菌株 (F 菌株) 购自 Mobidiag Ltd., 赫尔辛基, 芬兰。大肠杆菌 IH3080 的来源在实施例 2 中给出。致敏因数在实施例 7 中有定义。

[0277] 结果显示于表 8。对于属于大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌的所有菌株 (17 种) 来说, 存在 NAB7061 时 (4 微克 / 毫升) 利福平的 MIC 低至 ≤ 0.125 微克 / 毫升, 致敏因数为 85 至 2000 不等。克拉霉素得到非常类似的结果。对于 17 种属于大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌和弗氏柠檬酸杆菌的菌株中的 15 种, 存在 NAB7061 时 (4 微克 / 毫升) 克拉霉素的 MIC 低至 ≤ 0.25 微克 / 毫升, 对于所有 17 种菌株, 致敏因数为 90 至 1000 不等。肺炎克雷伯氏菌菌株对两种抗生素都仍更有抗性, 致敏因数为 10 至 500 不等。对于波美不动杆菌的 3 种菌株, 致敏因数为 24 至 125 不等, 所得 MIC 值相当低 (利福平为 ≤ 0.125 微克 / 毫升, 克拉霉素为 ≤ 0.5 微克 / 毫升)

[0278] 表 8

[0279] NAB7061 使革兰氏阴性菌对模式抗生素（利福平和克拉霉素）致敏的能力

[0280]

细菌菌株	4 $\mu\text{g/ml}$ 的 NAB 7061 存在时利福 平的 MIC ($\mu\text{g/ml}$) *	对 利福平的 致敏因数**	4 $\mu\text{g/ml}$ 的 NAB7061 存在时克拉霉素的 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	对克拉 霉素的致敏 因数***
大肠杆菌 ATCC25922***	0,016 - 0,047	250-750	0,094 - 0,125	170-400
大肠杆菌 IH3080****	0,023 - 0,047	170-350	0,047 - 0,064	190-260
大肠杆菌 CCUG41421	0,032 - 0,064	125	0,125	400
大肠杆菌 CCUG41422	0,094 - 0,125	170 - 256	0,25	100
大肠杆菌 CCUG41424	0,064 - 0,094	85 - 94	0,125	130
大肠杆菌 CCUG41425	0,016 - 0,023	200 - 260	0,047	340
大肠杆菌 CCUG41427	0,032 - 0,064	100 - 250	0,064	250
大肠杆菌 CCUG41429	0,032	125 - 250	0,064	250
大肠杆菌 CCUG41432	0,032	180 - 250	0,064	90
大肠杆菌 NCTC13351	0,032 - 0,047	340 - 500	0,032	750
大肠杆菌 NCTC13353	0,064	125 - 250	1	260
肺炎克雷伯氏菌 ATCC13883****	0,064 - 0,125	250 - 500	0,19	60
肺炎克雷伯氏菌 CCUG45421	2 - 3	10 - 20	24	10
肺炎克雷伯氏菌 F145	0,19 - 0,25	170	0,25	170
肺炎克雷伯氏菌 F144	0,19	>170	0,75	64
肺炎克雷伯氏菌 F136	0,75	>43	2	24
产酸克雷伯氏菌 ATCC13182	0,032 - 0,047	680 - 750	0,25	260
产酸克雷伯氏菌 CCUG51683	0,012 - 0,023	700 - 2000	0,19	250
阴沟肠杆菌 ATCC23355****	0,008 - 0,016	750-1500	0,25 - 0,75	90-400
阴沟肠杆菌 CCUG52947	0,032 - 0,047	500 - 1000	0,38	350
阴沟肠杆菌 F230	0,016 - 0,032	1500	0,047	1000
阴沟肠杆菌 F232	0,023	1400	0,094	500
弗氏柠檬酸杆菌 ATCC8090	0,023 - 0,032	500 - 1000	0,125	250
波美不动杆菌 ATCC19606	0,094 - 0,125	24 - 32	0,5	50
波美不动杆菌 F263*****	0,032 - 0,19	21 - 125	0,38	40
波美不动杆菌 F264	0,125	32	0,25	100
嗜麦芽黄单胞菌 ATCC17444	2	4 - 8	64	4
粘质沙雷氏菌 ATCC8100	16	<2	96	<2
奇异杆菌 ATCC29906	1 - 6	<2	24	<2
普通芽孢杆菌 ATCC13315	1 - 1,5	<2	24	<2
绿脓假单胞菌 ATCC27853	12 - 16	2	32	<2
绿脓假单胞菌 CCUG51971	>32	<2	64	<2
绿脓假单胞菌 F58	>32	<2	256	<2

[0281] * 结果来自 2 个独立测定

[0282] ** 致敏因数是存在 NAB7061 时与 4 微克 / 毫升 NAB7061 存在时利福平 MIC 的比值

[0283] *** 致敏因数是存在 NAB7061 时与 4 微克 / 毫升 NAB7061 存在时克拉霉素 MIC 的比值

[0284] **** 结果来自 5 个（利福平）和 2 个（克拉霉素）独立测定

[0285] ***** 结果来自 3 个独立测定（利福平）

[0286] 实施例 9

[0287] NAB7061 使卡巴培南抗性的不动杆菌 (Acinetobacter) 菌株对卡巴培南致敏

[0288] 通过如实施例 7 中的 E-test 方法并使用含有或不含 NAB7061 (4 微克 / 毫升) 的

MueHer-Hinton 琼脂,测定两种卡巴培南(亚胺培南和美罗培南)对三种波美不动杆菌菌株的最低抑制浓度(MIC)。此浓度的 NAB7061 本身不抑制靶细菌的生长。致敏因数在实施例 7 中定义。结果显示于表 9。NAB7061 以 ≥ 4 的因数使卡巴培南抗性菌株(F263、F264)对两种卡巴培南均致敏。

[0289] 表 9

[0290] 在 NAB7061 不存在和存在(4 微克/毫升)时亚胺培南和美罗培南针对波美不动杆菌菌株的易感性

[0291]

菌株	在指明的NAB7061		在指明的NAB7061	
	浓度($\mu\text{g/ml}$)下亚胺培南的		浓度($\mu\text{g/ml}$)下美罗	
	MIC($\mu\text{g/ml}$)		培南的MIC($\mu\text{g/ml}$)	
	0	4	0	4
波美不动杆菌 ATCC19606	0.38	0.38	1.5	0.75
波美不动杆菌 F263	>32	8	>32	6
波美不动杆菌 F264	24	6	32	4

[0292] 实施例 10

[0293] NAB7061 使大肠杆菌对新鲜正常血清中的补体致敏

[0294] 按照 Vaara 等(1984)所述的方法研究 NAB7061 使大肠杆菌的带荚膜光滑菌株对正常豚鼠血清(guinea pig serum,GPS)的抗菌作用致敏的能力。在 37℃ 的翻转摇床上将大肠杆菌 IH3080(018,K1)在 LB 液体培养基(LB broth Lennox,Difco,BD, Sparks, MD, USA)中培养至对数生长早期,用 PBS(磷酸盐缓冲盐溶液,每升含 8.0g NaCl、0.2g KCl、1.44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.2g KH_2PO_4)洗涤,重悬于 PBS 至约 10^9 个细胞/ml。GPS 用作补体来源。其保存于 -70℃ 待用。为了使补体失活,将血清在 56℃ 孵育 30 分钟。

[0295] 实验步骤如下。以约每毫升 500CFU(菌落形成单位)的细菌接种 PBS 中的 10% GPS,吸取 0.2 毫升等分试样放入微滴定板的孔中。所述孔已含有 0.020 毫升 0.9% NaCl 中量递增的 NAB7061。将所述板在 37℃ 孵育 2 小时,然后将每个孔移空至 LB 平板上。在 37℃ 过夜孵育所述平板,对产生的菌落计数。

[0296] 结果显示于表 10。NAB7061 本身在不存在 GPS 时或者存在热失活 10% GPS 时不显著减少 CFU 计数。但是,在存在 10% 的新鲜 GPS 时,低至 2 微克/毫升浓度的 NAB7061 足以减少约 100 倍的 CFU 计数。因此 NAB7061 与新鲜血清中存在的抗菌补体机制协同作用,如公知具有此特性的药剂 PMBN 一样。

[0297] 表 10

[0298] NAB7061 和 10% 豚鼠血清(GPS)针对大肠杆菌 IH3080(018:K1)的协同抗菌活性*

[0299]

	NAB7061 的浓度($\mu\text{g/ml}$)			
	0	1	2	4
无(PBS)	100	97	97	79
10% GPS	270	230	2	0
10% GPS, 热灭活	500	500	500	250

[0300] *测量为 37℃ 处理 2 小时后的存活%

[0301] 实施例 11

[0302] NAB7061 与肾皮质的刷状缘膜 (brush-border membrane, BBM) 亲和力的降低

[0303] 可以通过测量本发明化合物抑制放射性标记的庆大霉素与 BBM 结合的能力来间接测定本发明化合物与分离自肾皮质的刷状缘膜 (BBM) 的结合。因此,与 BBM 的亲和力低于例如多粘菌素 B 的本发明化合物以低于多粘菌素 B 的程度抑制放射性标记庆大霉素的结合。

[0304] 通过按照 Nagai 等 (2006) 所述使用 Mg^{2+} /EGTA 沉淀技术,从雄性白化小鼠的肾皮质分离 BBM。根据 Nagai 等 (2006) 所述方法,通过将 10mM HEPES (pH7.5) 中的 BBM 囊泡 (20 微升) 与存在 20 μM [3H] 庆大霉素 (Amersham Biosciences Inc., Buckinghamshire, U. K.) 的 100mM 甘露醇在带有或不带有待测试化合物或阳性对照的情况下一同孵育来测量庆大霉素的结合。在 4°C 孵育 60 分钟之后,加入 1 毫升冰冷的上述缓冲液,通过 Millipore 过滤器 (0.45 μm ; HAWP) 过滤混合物。用缓冲液洗涤过滤器,通过使用闪烁计数器测量保留在过滤器上的放射性。如 Nagai 等 (2006) 所述使用 Hill 方程确定 IC_{50} 值。

[0305] 所研究 NAB 化合物和对照的 IC_{50} 值 (μM) 如下: NAB7061 为 187.3+24.3 (2 个独立实验的平均值,每个进行 3 个平行测定),多粘菌素 B 为 39.3+5.5 (2 个独立实验的平均值,每个进行 3 个平行测定),未标记庆大霉素为 90.2+9.7 (3 个平行测定)。因此, NAB7061 与 BBM 的亲和力仅约为庆大霉素与 BBM 亲和力的一半,约为多粘菌素 B 与 BBM 亲和力的五分之一。

[0306] 实施例 12

[0307] NAB7061 在小鼠中实验性大肠杆菌腹膜炎模型中的活性

[0308] 从血琼脂平板 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) 上的过夜培养物中制备大肠杆菌 IH3080 (K1:O18) 在盐水 (0.9% NaCl) 中的悬液。在腹部的侧下四分之一处对所有小鼠 (来自 Harlan Scandinavia, **Allerød**, Denmark 的雌性 NMR1, 体重 25-30g) 腹膜内接种 0.5 毫升每毫升含 0.96×10^6 CFU 的悬液。在第 1 小时,从 3 只小鼠中测定 CFU 计数,剩下的小鼠 (每组 4 只) 用皮下注射 0.2 毫升红霉素的盐水溶液 (对应于 5 毫克/千克体重) 或者 NAB7061 的盐水溶液 (对应于 5 毫克/千克体重),或红霉素与 NAB7061 的盐水溶液 (对应于两种药物都是 5 毫克/千克体重;在两个不同部位给药) 进行处理。对照组接受两个 0.2 毫升盐水注射。在感染后 4.5 小时,用 CO_2 麻醉所有小鼠并处死。腹膜内注射无菌盐溶液 (2 毫升),轻轻按摩腹部,然后将其打开,对液体取样。将所述液体的合适稀释液铺在血琼脂平板上,过夜孵育所述平板,对菌落计数。

[0309] 在感染后第 1 小时,CFU 计数是 $0.74 (+0.7) \times 10^6$ /ml。在感染后 4.5 小时 (对应于处理后 3.5 小时),CFU 计数 (每 ml) 是 $11.1 (\pm 6.2) \times 10^6$ (对照组)、 $8.9 (\pm 6.4) \times 10^6$ (红霉素组)、 $1.1 (\pm 0.6) \times 10^6$ (NAB 7061 组) 和 $2.1 (\pm 1.2) \times 10^6$ (NAB 加红霉素组)。因此,在不存在 NAB7061 时,细菌计数增加 15 倍 (盐水组) 或 12 倍 (红霉素组),而在 NAB7061 存在时,相应倍数是 1.5 至 3。

[0310] 实施例 13

[0311] NAB7061 的毒性研究

[0312] 通过两周内每天两次静脉内施用 NAB7061 剂量 (1、2、4、8、16 和 32mg/kg/天) 以及对照化合物多粘菌素 B 来测定年幼大鼠 (研究开始时约 150g 体重) 中的毒性。每个给

药方案研究一组 10 只大鼠。每天进行临床观察,每周两次测量体重,每周两次测量食物消耗。在第二周结束时,处死所有动物。

[0313] 对照化合物多粘菌素 B 在低至 1mg/kg/ 天的剂量下对体重增加产生负影响,而具有此作用的 NAB7061 最低剂量是 8mg/kg。32mg/kg/ 天的多粘菌素 B 造成致死(死亡率 100%),而所有接受 NAB7061 的大鼠均在整个实验过程中保持存活。在研究结束时,接受 16mg/kg/ 天的多粘菌素的组中血液尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 比对照或低剂量多粘菌素组(1mg/kg/ 天)高 15%。在接受 16mg/kg/ 天的 NAB7061 的组中,没有发现此升高,在接受 32mg/kg/ 天的 NAB7061 的组中,升高 7%。

[0314] 对每个动物进行肾脏的组织病理学研究,在接受 NAB7061 的 3 个高剂量组中进行所有组织的组织病理学研究。在一般性病理学 and 任何器官的组织病理学研究中或者在接受 NAB7061 的任何动物的肾脏组织病理学研究中,都没有发现与 NAB7061 相关的病理学所见。

序列表

<110> 北方抗生素有限公司

马尔蒂·瓦拉

蒂莫·瓦拉

<120> 多粘菌素衍生物及其用途

<130>2070627PC/NAB-1

<150>US 60/837,426

<151>2006-08-11

<150>DK 200601055

<151>2006-08-11

<160>34

<170>PatentIn version3.3

<210>1

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (8).. (9)

<223>Dab

<400>1

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1 5 10

<210>2

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223>D-Leu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(9)

<223>Dab

<400>2

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

10

<210>3

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(9)

<223>Dab

<400>3

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210>4

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223>D-Leu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(9)

<223>Dab

<400>4

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1	5	10
---	---	----

<210>5

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>5

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1	5
---	---

<210>6

<211>7

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (2)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1).. (7)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (3)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5).. (6)

<223>Dab

<400>6

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>7

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>7

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>8

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (4).. (5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8).. (9)

<223>Dab

<400>8

Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Thr
1				5					10

<210>9

<211>7

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (2)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(1).. (7)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (3)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (6)

<223>Dab

<400>9

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>10

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>D-Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>10

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210>11

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>D-Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(8)

<223>Dab

<400>11

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr

1

5

<210>12

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>D-Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>12

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr

1

5

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(8)

<223>Dab

<400>13

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>14

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (3)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4).. (5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<223>环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8).. (9)

<223>Dab

<400>14

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

10

<210>15

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (8).. (8)

<223>Dab

<400>15

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>16

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>16

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu

1

5

<210>17

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>D-A1a

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>17

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Thr

1

5

<210>18

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222> (8).. (8)

<223>Abu

<400>18

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>19

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Leu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>19

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>20

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (2)

<223>D-Ala

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>21

<211>8

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (3)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (2).. (8)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (6).. (7)

<223>Dab

<400>21

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>22

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (3)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (6).. (7)

<223>Dab

<400>22

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210>23

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (5)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8).. (9)

<223>Abu

<400>23

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>24

Thr Xaa Xaa Lys Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>Dab

<400>25

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>26

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222> (8).. (8)

<223>Abu

<400>26

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (8).. (8)

<223>Dab

<400>27

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>28

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5).. (5)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8).. (8)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(9).. (9)

<223>Abu

<400>28

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210>29

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>Dab

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5).. (5)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8).. (8)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (9).. (9)

<223>Dab

<400>29

Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1 5 10

<210>30

<211>10

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223>DAb

<220>

<221>MOD_RES

<222> (3).. (4)

<223>DAb

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (4).. (10)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(9)

<223>Abu

<400>30

Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Thr
1				5					10

<210>31

<211>10

<212>PRT

<213>细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(4)..(10)

<223>环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>Abu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(9)

<223>Abu

<400>31

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5 10

<210>32

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(8)

<223>Abu

<400>32

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr
1 5

<210>33

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222> (3).. (9)

<223> 环状

<220>

<221>MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222> (7).. (8)

<223>N- γ - 甲酰基 -Dab

<400>33

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5

<210>34

<211>9

<212>PRT

<213> 细菌

<220>

<221>MOD_RES

<222> (2).. (4)

<223>Dab

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(3)..(9)

<223>环状

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223>D-Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(8)

<223>N-γ-乙酰基-Dab

<400>34

Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr

1

5