



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105228617 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201480029144. 8

A61K 31/4162(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 20

C07D 498/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 17/18(2006. 01)

690/DEL/2013 2013. 03. 20 IN

C12N 1/20(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 31/04(2006. 01)

2015. 11. 19

A61P 31/06(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/059989 2014. 03. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/147578 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 印度生物技术部

地址 印度新德里

申请人 印度德里大学 俄勒冈州立大学

(72) 发明人 鲁珀·拉勒 塔伊佛·马哈茂德

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

A61K 31/395(2006. 01)

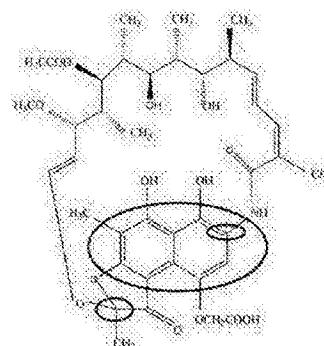
权利要求书5页 说明书27页 附图17页

(54) 发明名称

抗耐药性细菌的抗菌化合物

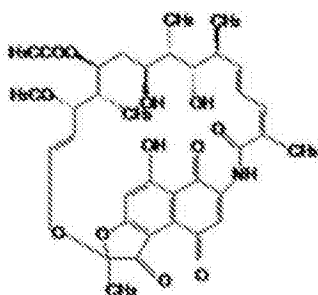
(57) 摘要

本发明涉及抗耐药性细菌的利福霉素类似物的生产。本发明也涉及抗耐药性分枝杆菌的抗菌化合物。本发明也提供包含抗耐药性细菌、特别是分枝杆菌的抗菌化合物的药物组合物。本发明也提供抗菌化合物用于治疗细菌、且特别是分枝杆菌引起的疾病的用途。

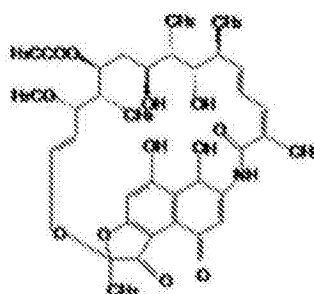


利福霉素B的化学结构。侧链在C-2和C-12处连接(黑色圈出)。侧链位  
(黑色圈出)向化合物赋予微红棕色。

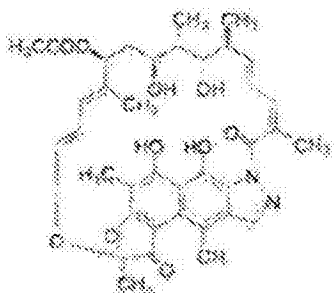
1. 具有下列化学结构的抗菌化合物和 / 或其盐：



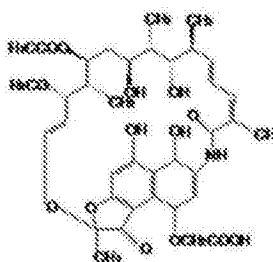
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



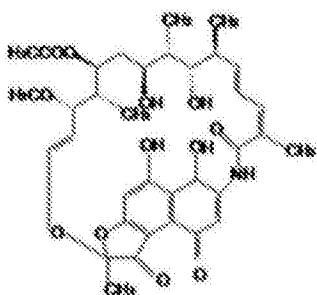
24-脱甲基利福霉素B。

2. 根据权利要求 1 所述的抗菌化合物,其中所述抗菌化合物对细菌引起的感染或疾病有用。

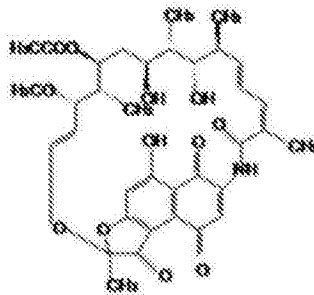
3. 根据权利要求 1 至 2 任一项所述的抗菌化合物,其中所述抗菌化合物对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的抗菌化合物,其中选择的所述分枝杆菌属物种为结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的 MDR 菌株。

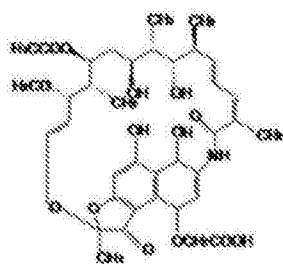
5. 一种药物组合物,其包含具有下列化学结构的抗菌化合物和 / 或其盐、和它们药学上可接受的载体：



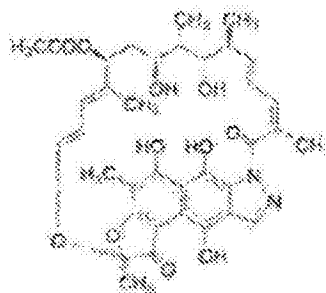
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福霉素B



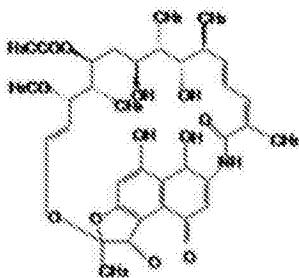
24-脱甲基利福平。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物, 其中所述抗菌化合物对细菌引起的感染或疾病有用。

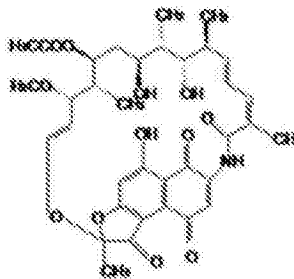
7. 根据权利要求 5 至 6 任一项所述的药物组合物, 其中所述抗菌化合物对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用。

8. 根据权利要求 5 至 6 任一项所述的药物组合物, 其中所述抗菌化合物对结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的 MDR 菌株引起的感染或疾病有用。

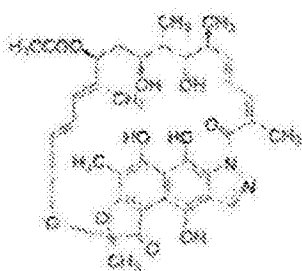
9. 一种治疗方法, 其包括向患者给予具有下列结构的抗菌化合物和 / 或其盐 :



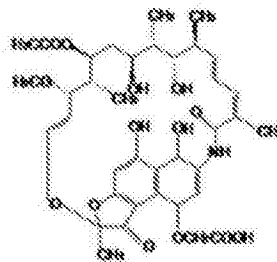
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV

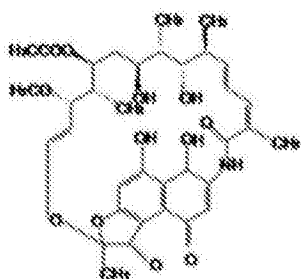


24-脱甲基利福平

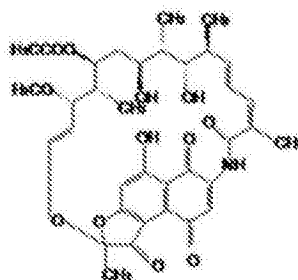


24-脱甲基利福霉素B。

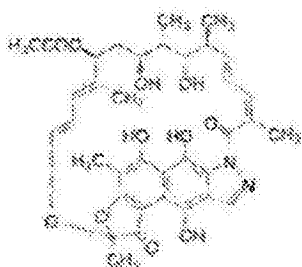
10. 用于治疗疾病或感染的具有下列化学结构和 / 或其盐的抗菌化合物或其盐用于制备药物的用途 :



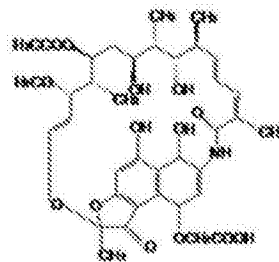
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV

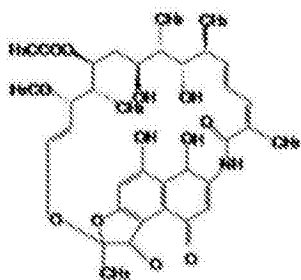


24-脱甲基利福平

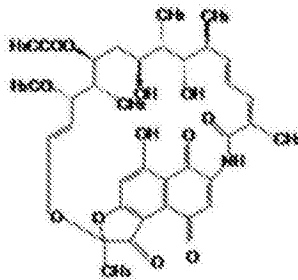


24-脱甲基利福霉素B。

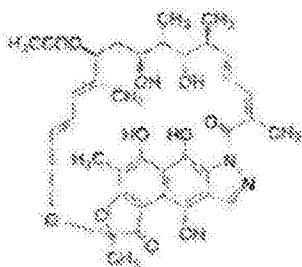
11. 具有下列化学结构的抗菌化合物和 / 或其盐用于制备药物的用途：



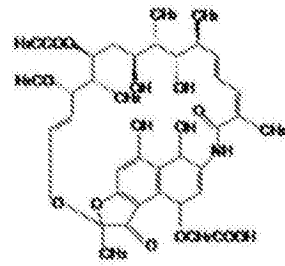
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

12. 根据权利要求 10 所述的药物的用途，其用于治疗疾病或感染。

13. 根据权利要求 10 所述的药物的用途，其用于治疗细菌引起的疾病或感染。

14. 根据权利要求 10 所述的药物的用途，其用于治疗分枝杆菌属物种引起的疾病或感染。

15. 根据权利要求 10 或 13 所述的药物的用途，其用于治疗分支杆菌属物种、结核分枝杆菌、结核分枝杆菌的 MDR 菌株引起的疾病或感染。

16. 根据权利要求 5 所述的药物组合物的制备方法，所述方法包括根据权利要求 1 所述

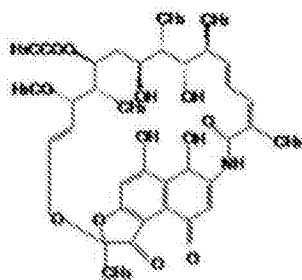
的抗菌化合物和药学上可接受的载体。

17. 地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其包含基因 rapAT2 区域。

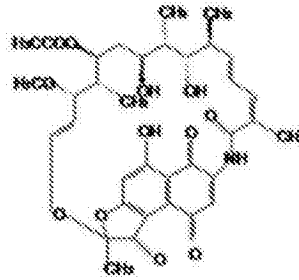
18. 地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其中 rifAT6 区域与 rapAT2 区域交换。

19. 地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其能够产生新型的利福霉素 B 的类似物和衍生物。

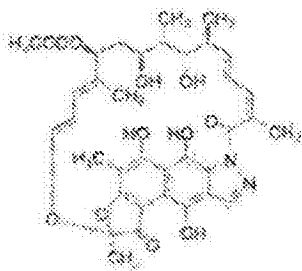
20. 根据权利要求 19 所述的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其中所述利福霉素 B 的类似物和衍生物包含具有下列化学结构的化合物:



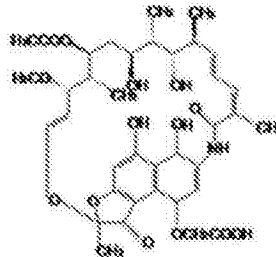
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

21. 包含 rifPKS 中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株的制备方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 分离来自地中海拟无枝酸菌 S699 的 rifPKS 的 rifAT6 区域, 以及吸水链霉菌 (Acc. No. DSM-41524) 的 rapAT2 区域;

(b) 通过将 rifPKS 的 rifAT6 区域与吸水链霉菌 (Acc. No. DSM-41524) 的 rapAT2 区域交换, 制备载体构建体;

(c) 将步骤 (b) 的载体构建体插入地中海拟无枝酸菌 S699 ; 和

(d) 获得包含 rifPKS 的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34。

22. 一种新型抗菌化合物的制备方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 培养包含 rifPKS 区域中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞; 和

(b) 收获地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞, 从而获得产物的粗级分;

(c) 通过 HPLC 纯化粗产物;

(d) 获得抗菌化合物 24-脱甲基利福霉素 B 和 24-脱甲基利福霉素 SV。

23. 一种制备 24-脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24-脱甲基利福霉素 S 的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 在选自氯化铜的试剂的存在下使 24-脱甲基利福霉素 B 反应;

(b) 在室温下使步骤 (a) 的反应过夜进行 ;和

(c) 获得 24- 脱甲基利福霉素 S。

24. 一种制备 24- 脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24- 脱甲基利福平的方法,所述方法包括下列步骤:

(a) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 和乙酸的存在下使 24- 脱甲基利福霉素 B 反应 ;

(b) 向步骤 (a) 的混合物添加多聚甲醛和 1, 3, 5- 三甲基 - 六氢 -1, 3, 5- 三嗪 ;

(c) 获得 3- 甲基 -1, 3- 噁嗪并 (5, 6-c)-24- 脱甲基利福霉素 ;

(d) 使步骤 (c) 的化合物与 1- 氨基 -4- 甲基 - 哌嗪反应 ;和

(e) 获得 24- 脱甲基利福平。

25. 一种重组核苷酸 SEQ ID No. 1。

26. 一种细菌菌株,其含有核苷酸 SEQ ID NO. 1。

27. 根据权利要求 26 所述的细菌菌株,其中所述细菌菌株能够产生利福霉素类似物。

28. 根据权利要求 26 至 27 任一项所述的细菌菌株,其中所述细菌菌株为地中海拟无枝酸菌 S699#34。

29. 一种重组核苷酸 SEQ ID No. 1,其能够表达利福霉素的新型类似物。

30. 根据权利要求 1 所述的重组核苷酸序列,其中所述类似物为 24- 脱甲基利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 S。

31. 一种载体构建体,其含有重组核苷酸序列 ID No. 1。

32. 根据权利要求 29 所述的载体构建体,其中所述载体构建体为 pAT6E 和 pAT6F。

## 抗耐药性细菌的抗菌化合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗耐药性细菌的利福霉素 (rifamycin) 类似物的生产。本发明也进一步涉及抗耐药性分枝杆菌的抗菌化合物。本发明也提供包含抗耐药性细菌特别是分枝杆菌的抗菌化合物的药物组合物。本发明也提供抗菌化合物在治疗细菌、特别是分枝杆菌引起的疾病中的应用。

### 背景技术

[0002] 地中海拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis mediterranei*) S699 (ATCC 13685) 是产生重要的抗生素即利福霉素 B 的放线菌 (actinobacterium) (图 1)。半合成的利福霉素 B 衍生物用于对抗分别为结核病 (tuberculosis, TB) 和麻风病的病原体的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)。这些衍生物也用于对抗各种其它生物体, 包括艾滋病相关的分枝杆菌。利福霉素 B 和利福霉素类通常属于祥霉素 (ansamycin) 类抗生素, 并且其特征在于由脂肪链像篮子的提手一样跨越的羰基部位 (图 1)。此芳香核将红棕色赋予利福霉素分子。地中海拟无枝酸菌 (*A. mediterranei*) S699 的利福霉素 B 中的碳骨架由 2 个乙酸酯和 8 个丙酸酯单元和起始单元 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (AHBA) 构成。利福霉素 B 是天然和稳定的分子, 并充当用于合成包括 (临床使用中的) 利福霉素 S、利福霉素 SV、利福平 (rifampicin)、利福布丁 (rifabutin)、利福喷丁 (rifapentine) 和利福昔明 (rifaximin) 在内的半合成衍生物的起始材料。此外, 从 1960 年起, 对菌株 S699 实施传统的菌株改进程序, 并且此菌株的后继用于利福霉素 B 的生产。目前, 改进的工业菌株产生约 15g/l 至 24g/l 的利福霉素 B。

[0003] 如此前所述, 开发了利福霉素 B 的半合成衍生物, 以改善分子的药代动力学 (图 2)。利福平 (3-[4-甲基哌嗪基亚氨基-甲基] 利福霉素 SV) 于 1968 年在意大利首次被批准用于临床使用。它于 1971 年在美国获得食品与药物管理局的批准 [Sensi., P. 等人 (1983). *Farmac. Ed. Sc.* Vol. 14, p. 146-147]。它是首个利福霉素 B 的半合成衍生物, 并已广泛用于结核病的治疗。它结合至结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 的 RNA 聚合酶, 并阻断 RNA 链的延伸。

[0004] 利福霉素 B 的另一衍生物是利福布丁 (4-N-异丁基螺哌啶基利福霉素 S)。它以 Mycobutin 的名称上市。它的特点在于对一些耐利福平的菌株有效, 并且具有抗艾滋病相关的鸟型分支杆菌复合体 (*Mycobacterium avium complex*) 的高活性。

[0005] 利福霉素 B 的衍生物利福昔明 (4-脱氧-3'-溴吡啶并-[1', 2'-1, 2] 咪唑并[5, 4-c]-利福霉素 SV) 经口给药后在肠中实质上不吸收。此性质使之有利于用来治疗胃肠道内病原体局部病况。

[0006] 利福喷丁 (3-[(4-环戊基-1-哌嗪基) 亚氨基] 甲基} 利福霉素 SV) 具有抗分枝杆菌活性和允许长效作用的药代动力学特性。它由 Sanofi Aventis 以 Prifith 的名称上市。它于 1998 年被食品与药物管理局批准用于结核病的治疗。

[0007] 利福霉素的产生者地中海拟无枝酸菌具有有趣的历史。它是从距法国圣拉斐尔

海滨约 50m、海拔 200m 的松树园的土壤样品中分离出来的。由于形态和生物化学上的相似性,此分离物被分类为地中海链霉菌 (*Streptomyces mediterranei*) [Margalith, P. 和 Beretta, G. (1960). *Mycopathol. Mycol. Appl.* Vol. 13, p. 321-330]。后来又重新分类为地中海拟无枝酸菌 [Lechevalier 等人 (1986). *Int. J. Sys. Bacteriol.* Vol. 36, p. 29-37] (需要参考文献)。Lal 和同事开发了可用于地中海拟无枝酸菌多种菌株的转化和克隆的一系列克隆载体 (pRL 系列) [Lal, R., US5985560A (1999); Lal, R. 等人 (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57, p. 665-671; Dhingra, G. 等人 (2003). *Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 30, p. 195-204]。

[0008] 恰当地提到,红霉素 (ery)、雷帕霉素 (rap) 和利福霉素 (rif) 的合成是通过由乙酸酯和丙酸酯单元的缩合而构建这些大环聚酮的模块化聚酮合酶 (modular polyketide synthase) (多酶复合体,亦称为 I 型 PKS) 介导的。I 型 PKS 具有共线性结构,并由模块 (module) 组成,各自具有决定基本链装配用的底物选择和随后的  $\beta$ -酮酯 (聚酮) 修饰的顺序的催化结构域。I 型 PKS 模块通常包括形成最低限度 PKS 的酮基合酶 (ketosynthase, KS)、酰基转移酶 (acyl transferase, AT) 和酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 结构域。任选地可存在酮基还原酶 (ketoreductase, KR)、脱水酶 (dehydratase, DH) 或烯酰还原酶 (enoyl reductase, ER) 结构域 (也称为还原性结构域),以在酮酸酯链中引起修饰。起始单元 (乙酰辅酶 A) 加载在由起始模块的 AT 结构域催化的 ACP 上。延伸链从先前模块的 ACP 交给当前模块的 KS,并由 KS 结构域催化。AT 结构域选择将要加至生长中的聚酮链的延伸单元的类型,KS 催化缩合反应,以及 ACP 在连续的缩合之间拴住生长中的聚酮链,并接受来自 AT 的延伸单元,从而为下一次缩合反应作准备。生长中的聚酮由还原性环 (reductive loop) 修饰。KR 结构域将  $\beta$ -酮基还原成羟基。DH 结构域消去水分子,产生  $\alpha$ - $\beta$  双键,并且 ER 结构域将  $\alpha$ - $\beta$  双键转化成饱和键。然后通过 TE 结构域的水解作用使碳骨架从 PKS 释放 (图 3)。虽然 ACP、AT 和 KS 的存在是模块中必需的,其它结构域例如 KR、DH、ER 是任选的,并且在模块中可以或者不必存在。

[0009] 发现 eryPKS 和 rapPKS 基因簇之后,从地中海拟无枝酸菌 S699 克隆负责利福霉素 B 生物合成的全部 90kbp rifPKS 基因簇 [August, P. R. 等人 (1998). *Chem Biol.* Vol. 5, p. 69-71. ]。生物合成基因簇分为 4 个区域。区域 II (52kb) 是最大的区域,并编码模块 PKS。此区域分为 5 个开放读码框 (ORF)-rifA、rifB、rifC、rifD 和 rifE。ORF 包含按照在生物合成中的功能而共线性排列的 10 个模块,并催化连续的 10 轮聚酮链延伸以构建十一聚酮 (图 4)。基因 rifA 由模块 1-3 组成,rifB 由模块 4-6 组成,rifC 由模块 7 组成,rifD 由模块 8 组成,rifE 由模块 9-10 组成。模块内的结构域顺序为 KS-酮基合酶、AT-酰基转移酶 (任选的还原性结构域-DH-脱水酶和 KR-酮基还原酶) 和 ACP-酰基载体蛋白 (图 5)。rifPKS 中结构域 ER 不存在。在 rifA 基因之前是由激活起始单元而启动聚酮链形成的加载单元。rifPKS 中有两类 AT 结构域。模块 2 和 9 中发现的 AT 结构域催化乙酸酯延伸单元的并入。其它 8 个模块具有催化丙酸酯延伸单元并入生长中的聚酮链的 AT 结构域。另一基因 Riff 紧接着位于 rifE 下游,与之翻译偶联。riff 的角色是环化聚酮链并同时将之从模块 10 的 ACP 结构域释放 [Stratmann, A. 等人 (1999). *Microbiol.* Vol. 145, p. 3356-3375]。

[0010] 萘部位的形成发生在第三和第四链延伸步骤之间,并且不是后 PKS 修饰。此步骤在本发明下文的交换策略的设计中是关键。

[0011] 临床中利福霉素衍生物特别是利福平的使用导致 TB 所致的死亡率明显降低。然而不良的依从性和不良的医药监管的结合已导致结核分枝杆菌的多重耐药 (multiple drug resistance, MDR) 株的产生。根据 2011 年 WHO 报告, 东南亚区域、印度的结核病控制中心在新报告的 TB 病例中记录到 2.3% 的 MDR-TB 病例。如前所述, 利福霉素 B 结构的复杂性使得化学工具的使用仅限于分子的 C-3 和 C-4。这降低了可通过化学合成而产生的变化分子的排列组合的数目。对用于有效经济的 MDR-TB 治疗的利福霉素类似物的生产有强烈需求。

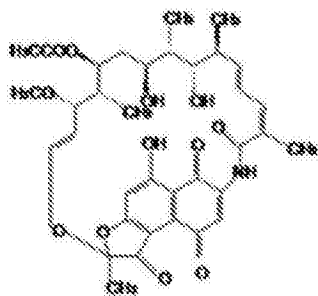
[0012] 利福霉素 B 的半合成衍生物, 例如利福平和利福布丁, 已广泛用于结核病 (结核分枝杆菌)、麻风病 (麻风分枝杆菌) 和艾滋病相关的分枝杆菌感染的治疗。利福平于 1968 年首次引入市场。此后利福平广泛地用于治疗结核病。然而不良的依从性和不良的医药监管的结合已导致结核分枝杆菌的多重耐药 (MDR) 株的产生。药物公司和医药界在寻找可有效对抗 MDR-TB 的经济的药物。利福霉素 B 化学结构的复杂性仅允许通过已完全使用的化学修饰在芳香核的 C-3 和 C-4 处进行如上所述的化学改变。

[0013] 另一选择是组合生物合成, 其涉及在产生利福霉素的生物体中向已有的 PKS 基因簇交换 / 删除 / 添加模块 / 结构域, 以创造可产生目标分子的非自然的基因集合。具有共线性排列的聚酮合酶基因簇可按此方式改组, 并已被证实来产生红霉素类似物。虽然在红霉素分子的方向上已进行了广泛工作 (前面章节引用的文献), 但还没得到用于 rifPKS 操纵的报道。因此本领域需要开发在治疗 TB 中有更好、更高程度效果的目标分子, 并且也需要开发 TB 细菌不耐受的此类新分子。

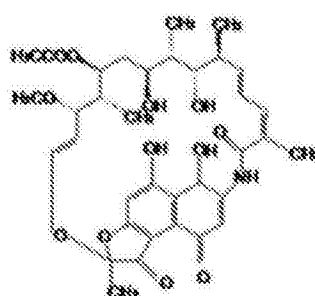
## 发明内容

[0014] 因此, 本发明的主要实施方案涉及具有下列化学结构及其盐的抗菌化合物和 / 或其盐:

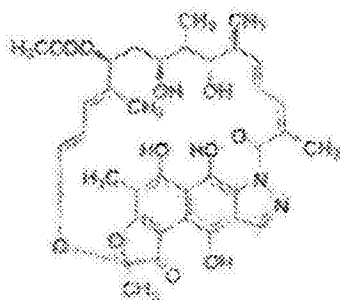
[0015]



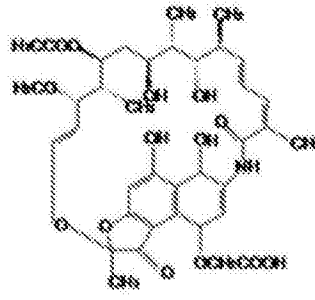
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B

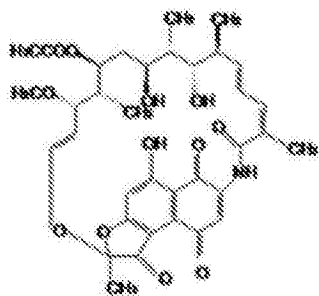
[0016] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对细菌引起的感染或疾病有用。

[0017] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用。

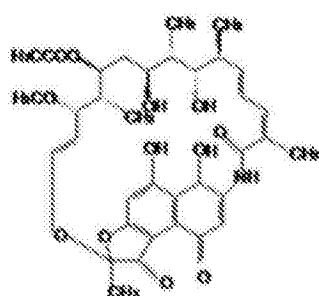
[0018] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用,其中选择的分枝杆菌属物种为结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的MDR株。

[0019] 本发明的另一实施方案还涉及药物组合物,其包含具有下列化学结构的抗菌化合物和/或其盐和它们药学上可接受的载体:

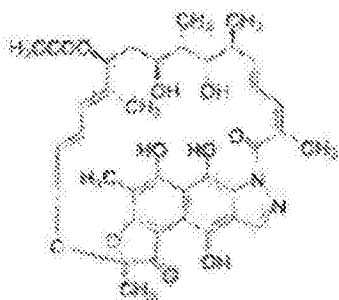
[0020]



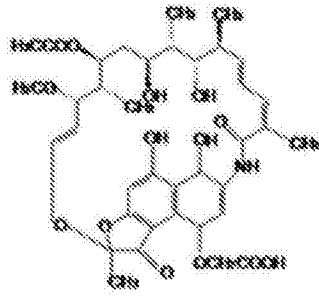
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



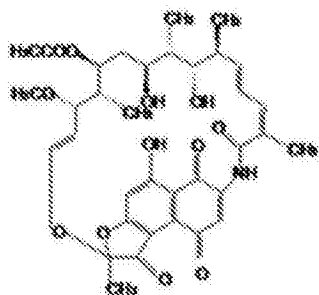
24-脱甲基利福平



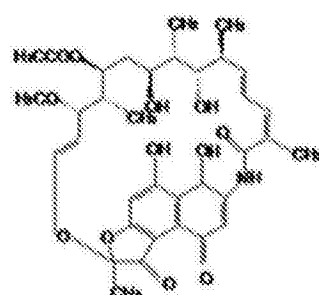
24-脱甲基利福霉素B。

[0021] 本发明的另一实施方案还涉及一种治疗方法,其包括向患者给予具有下列结构的抗菌化合物和 / 或其盐:

[0022]

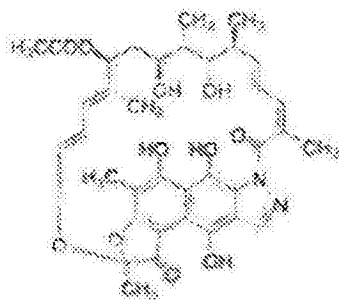


24-脱甲基利福霉素S

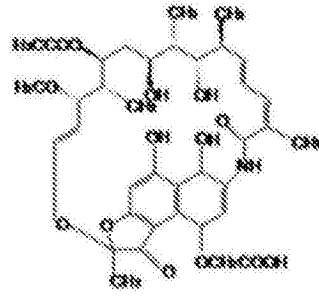


24-脱甲基利福霉素SV

[0023]



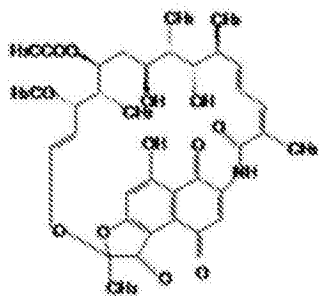
24-脱甲基利福平



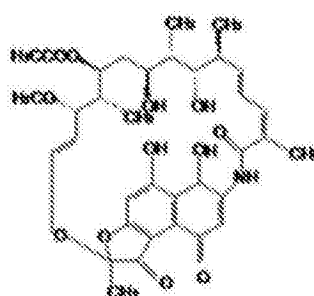
24-脱甲基利福霉素B。

[0024] 本发明的另一实施方案还涉及用于治疗疾病或感染的具有下列化学结构的抗菌化合物和 / 或其盐用于制备药物的用途:

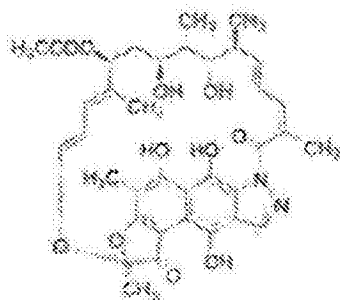
[0025]



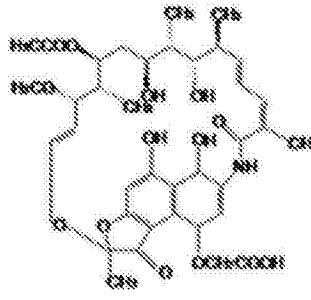
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

[0026] 本发明的另一实施方案涉及包含本发明的抗菌化合物的药物用于治疗疾病或感染的用途。

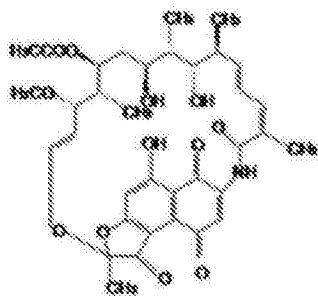
[0027] 本发明的另一实施方案还涉及包含本发明的抗菌化合物的药物用于治疗细菌引起的疾病或感染的用途。

[0028] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其包含基因 rapAT2 区域。

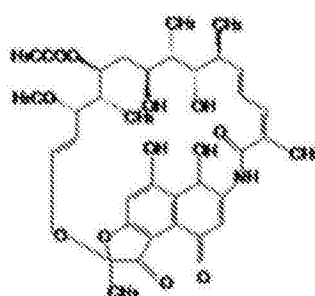
[0029] 本发明的另一实施方案还涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其中 rifAT6 区域与 rapAT2 区域交换。

[0030] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其能够产生包括下列化学结构的利福霉素 B 的类似物和衍生物:

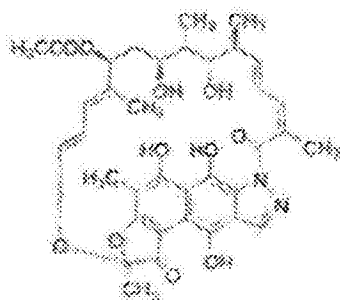
[0031]



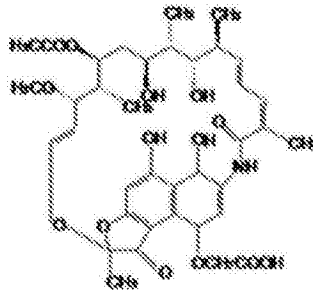
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

[0032] 本发明的另一实施方案涉及包含 rifPKS 中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株的制备方法,所述方法包括下列步骤:

[0033] (a) 分离来自地中海拟无枝酸菌 S699 的 rifPKS 的 rifAT6 区域,以及吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) (Acc.No.DSM-41524) 的 rapAT2 区域;

[0034] (b) 通过将 rifPKS 的 rifAT6 区域与吸水链霉菌 (Acc.No.DSM-41524) 的 rapAT2 区域交换,制备载体构建体;

[0035] (c) 将步骤 (b) 的载体构建体插入地中海拟无枝酸菌 S699 ;和

[0036] (d) 获得包含 rifPKS 的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34。

[0037] 本发明的另一实施方案涉及新型抗菌化合物的制备方法,所述方法包括下列步骤:

[0038] (a) 培养包含 rifPKS 区域中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞;和

[0039] (b) 收获地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞,从而获得产物的粗级分;

[0040] (c) 通过 HPLC 纯化粗产物;

[0041] (d) 获得抗菌化合物 24-脱甲基利福霉素 B 和 24-脱甲基利福霉素 SV。

[0042] 本发明的另一实施方案涉及一种制备 24-脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24-脱甲基利福霉素 S 的方法,所述方法包括下列步骤:

[0043] (a) 在选自氯化铜的试剂的存在下使 24-脱甲基利福霉素 B 反应;

[0044] (b) 在室温下使步骤 (a) 的反应过夜进行;

[0045] (c) 获得 24-脱甲基利福霉素 S。

[0046] 一种制备 24-脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24-脱甲基利福平的方法,所述方法包括下列步骤:

[0047] (a) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 和乙酸的存在下使 24-脱甲基利福霉素 B 反应;

- [0048] (b) 向步骤 (a) 的混合物添加多聚甲醛和 1,3,5-三甲基-六氢-1,3,5-三嗪；
- [0049] (c) 获得 3-甲基-1,3-噁嗪并 (oxazino) (5,6-c)-24-脱甲基利福霉素；
- [0050] (d) 使步骤 (c) 的化合物与 1-氨基-4-甲基-哌嗪反应；和
- [0051] (e) 获得 24-脱甲基利福平。
- [0052] 本发明的另一实施方案涉及重组核苷酸 SEQ ID No. 1。
- [0053] 本发明的另一实施方案涉及含有核苷酸 SEQ ID NO. 1 的细菌菌株。
- [0054] 本发明的另一实施方案涉及如本发明所记载的含有核苷酸 SEQ ID NO. 1 的细菌菌株。
- [0055] 本发明的另一实施方案涉及如本发明所记载的细菌菌株，其中所述细菌菌株能够产生利福霉素类似物。
- [0056] 本发明的另一实施方案涉及含有重组核苷酸序列 ID No. 1 的载体构建体。
- [0057] 本发明的另一实施方案还涉及载体构建体，其中所述载体构建体为 pAT6E 和 pAT6F。

## 附图说明

[0058] 当参考附图阅读下面的详细说明时，将更好地理解本发明的这些和其它特征、方面和优点，在附图中相同文字始终表示相同部分，其中：

- [0059] 图 1：利福霉素 B 的化学结构。
- [0060] 图 2：利福霉素 B 的半合成衍生物。
- [0061] 图 3：I 型 PKS 进行性机理 (processive mechanism) 的图示。
- [0062] 图 4：通过区域 II 的利福霉素 PKS 的假定中间体的合成。
- [0063] 图 5：rif PKS 基因簇中酶结构域的组织。
- [0064] 图 6：通过 rifAT6 与 rapAT2 交换而构建功能性盒的策略。
- [0065] 图 7：示出 rifAT6 与 rapAT2 交换的策略的图示。
- [0066] 图 8：示出单交换型 (Single Crossover) 克隆的培养物的表现。
- [0067] 图 9：单交换型克隆的凝胶电泳图谱。
- [0068] 图 10：示出双交换型克隆的培养物的表现。
- [0069] 图 11：双交换型克隆的凝胶电泳图谱。
- [0070] 图 12：从 DCO 提取的类似物脱甲基利福霉素 B 的 LC-ESI-MS 图谱。
- [0071] 图 13：利福霉素 B 及其类似物的 NMR。
- [0072] 图 14：24-脱甲基利福霉素 B、24-脱甲基利福霉素 S 和 24-脱甲基利福霉素 SV 的结构。
- [0073] 图 15：24-脱甲基利福霉素 S 的晶体结构和与 RNA 聚合酶 A 的药物相互作用。
- [0074] 图 16：(a) 利福霉素 S；(b) 24-脱甲基利福霉素 S；(c) 利福平；(d) 24-脱甲基利福平的 ESI-MS 谱。
- [0075] 图 17：(a) 24-脱甲基利福平；(b) 化学合成的利福平和 (c) 商购可得的利福平的 NMR 谱。
- [0076] 图 18：(a) 24-脱甲基利福平和 (b) 利福平的比较 MS/MS 分析。
- [0077] 图 19：ESI 阴离子模式中利福平和 24-脱甲基利福平特征性 MS 碎片。

[0078] 图 20 :新型利福霉素类似物抗各种细菌物种的抗菌试验。

[0079] 图 21 :利福平、利福霉素 S、24- 脱甲基利福平、24- 脱甲基利福霉素 S 的活性的抗菌试验。

[0080] 图 22 :核苷酸序列 ID No. 1。

## 具体实施方式

[0081] 虽然本发明可以进行各种修改和 / 或替代的方法和 / 或组成,其具体的实施方案已通过绘图 / 图和表举例说明的方式示出,并将在下文中详细描述。但是应理解,不意图将本发明限于公开的特定方法和 / 或组成,相反,本发明将覆盖落入由所附权利要求限定的本发明的精神和范围以内的所有变形、等同和替代。

[0082] 已通过图中常规的陈述适当示出图、表、式和方案,仅示出与理解本发明实施方案有关的具体细节,以便不会将本公开与对于从本文的记载获益的本领域的普通技术人员而言显而易见的细节相混淆。

[0083] 下列记载仅是示例性的实施方案,并且不意图以任何方式限制本发明的范围、适用性或配置。相反,下列记载提供对实施本发明的示例性实施方案的方便的解释。只要不偏离本发明的范围,对记载的实施方案,在记载的要件的功能和排列上可进行各种变化。

[0084] 术语“包括”、“包含”或其任何其它变形意在覆盖非排除性的包含,因而由“包含…”开头的一种或多种方法或组成或系统或方法没有更多限制,不排除其它的方法、子方法、组成、子组成、次要或主要组成或其它元素或其它结构或另外的方法或组成或另外的元素或另外的特征或另外的特点或另外的属性的存在。

[0085] 定义:

[0086] 为了本发明的目标,下列术语将具有如本文所述的含义:

[0087] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“组合途径或组合生物合成”是指通过将地中海拟无枝酸菌 S699 的 rifPKS 基因簇的 rifAT6 结构域与吸水链霉菌的 rapPKS 基因簇的 rapAT2 结构域交换而进行的 rifPKS 基因簇的基因操作。

[0088] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“载体 / 克隆载体”是指载体系列 pAT6A、pAT6B、pAT6C、pAT6D、pAT6E 和 pAT6F 的建立。pAT6F 是转化入地中海拟无枝酸菌 S699 的非复制性质粒。

[0089] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“衍生物”是指从 24- 脱甲基利福平 B 获得或制备的衍生物。一些示例性的衍生物为 24- 脱甲基利福平、24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福霉素 SV。

[0090] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“类似物”是指利福霉素 B 的类似物,其通过用 rapAT2 结构域来交换 rifAT6 结构域而制备,或者含有由 rapAT2 结构域替换的 rifAT6 结构域。一种此类示例性类似物为 24- 脱甲基利福霉素 B。

[0091] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“突变体或突变株”是指 rifAT6 结构域被 PKS-1 系统的 rapAT2 结构域替换,并且能够产生利福霉素 B 的类似物和衍生物的地中海拟无枝酸菌株。例如:产生例如 24- 脱甲基利福霉素 B 等类似物的地中海拟无枝酸菌 #34。

[0092] 如本文中使用时,当在本发明的语境中使用时,术语“抗菌化合物”是指能抑制细菌

生长、或细菌引起的感染、或细菌引起的疾病、或属于放线菌类的细菌或任何格兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌引起的病况的化合物。特别地，本发明的语境中使用的抗菌化合物是指有效抑制属于分枝杆菌属物种的细菌的生长的抗菌化合物。此外，本发明的语境中使用的抗菌化合物是指有效抑制由属于分枝杆菌属物种的细菌引起的任何疾病或任何感染或病况的抗菌化合物。

[0093] 如本文中使用时，当在本发明的语境中使用时，术语“多重耐药 /MDR”是指使得引起疾病的细菌能够耐受确切的抗微生物剂或抗菌化合物，即目标在于消灭细菌的广泛结构和功能的化学品的情况。特别地，本发明的语境中使用的 MDR 是指使得引起疾病的分枝杆菌属物种能够耐受确切的抗微生物剂或抗菌化合物的情况，其中此类抗微生物剂或抗菌化合物是通常使用的抗生素药或商购可得的抗微生物剂或抗菌化合物。

[0094] 如本文中使用时，当在本发明的语境中使用时，术语“其盐”是指 24- 脱甲基利福霉素 B、24- 脱甲基利福霉素 S、24- 脱甲基利福霉素 SV 和 24- 脱甲基利福平的任何盐、酯、多晶型物、纯形式、异构体、异构体混合物、复合物和任何其它衍生物或类似物。更特别地，其盐例如盐、酯、多晶型物、纯形式、异构体、异构体混合物、复合物和任何其它衍生物应至少含有 24- 脱甲基 - 形式或结构，即，在 24- 脱甲基利福霉素 B、24- 脱甲基利福霉素 S、24- 脱甲基利福霉素 SV 和 24- 脱甲基利福平的类似物、衍生物、盐、酯、多晶型物、纯形式、异构体、异构体混合物、复合物中，在 24 位失去甲基。

[0095] 本发明涉及可有效对抗细菌性疾病或感染的抗菌化合物。更特别地，本发明涉及可有效对抗由落入放线菌类的革兰氏阳性菌的细菌群体引起的感染或疾病的抗菌化合物的用途。本发明的抗菌化合物对多重耐药性细菌有用。本发明的抗菌化合物对例如分枝杆菌属物种、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 物种或菌株、杆菌属 (*Bacillus*) 物种或菌株、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种或菌株和大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株有用。

[0096] 此外，本发明涉及对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用的抗菌化合物。特别地，这些抗菌化合物在抗结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌和耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中有效。本发明的另一方面提供对分枝杆菌属物种的多重耐药株有用的抗菌化合物。

[0097] 利福霉素分离为利福霉素复合物的同类物 (congeners) [SensiP. 等人 (1983). *Farmac. Ed. Sc.* Vol. 14, p. 146-147], 并且 rifPKS 在 1998 年被完整测序 [August, P. R. 等人 (1998) *Chem. Biol.* Vol. 5, p. 69-79]。此后已进行了很多研究来阐明基因簇的功能和利福霉素 B 的结构和作用。然而，rif PKS 在利福霉素 B 生产中的独特性质长久阻碍了利福霉素 B 类似物的生产进程。在这之前，难以基因操作地中海拟无枝酸菌的 rifPKS，因为对于地中海拟无枝酸菌还不能得到有效的基因技术和克隆载体。由于本发明的发明人之一已开发出了可用于转化和克隆地中海拟无枝酸菌一些菌株的一系列克隆载体 (pRL 系列) [Lal, R., US 5985560A (1999); Lal, R. 等人 (1991). *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57, p. 665-671; Dhingra, G. 等人 (2003). *Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 30, p. 195-204], 并且这样开发的电转化方法已用来操作产生利福霉素类似物用的 rifPKS 基因簇。rifPKS 的操作也基于如下事实：过去红霉素 (eryPKS) 和雷帕霉素 (rapPKS) 的聚酮合酶的模块化性质在新型生物工程化聚酮的生产中已产生了相当大兴趣。由于早期克隆了 eryPKS 和 rapPKS，在 1998 年，利福霉素生物合成基因簇或 rifPKS 的克隆和表征 [August, P. R. 等人 (1998). *Chem.*

Biol. Vol. 5, p. 69-79] 为通过使用已用于 eryPKS 的类似途径来操作于产生利福霉素类似物的 rifPKS 基因簇打开了可能性。在本发明中,使用了组合途径,其中地中海拟无枝酸菌 S699 的利福霉素聚酮合酶 (rifPKS) 簇已被基因操作来生产利福霉素 B 的类似物。

[0098] 虽然在过去的 40 年中已通过化学方法来合成利福霉素的多种衍生物,但现在仅有屈指可数的利福霉素衍生物用于治疗结核病。多数利福霉素衍生物,包括临床上使用的,是在萘部位的 C-3 和 / 或 C-4 位被化学修饰。由于分子的复杂性,化合物其它部分的化学修饰出现困难。此外,与利福平复合的水生栖热菌 RNAP 的 X- 射线晶体学研究揭示,分子中的四个游离羟基对于 RNAP 结合是重要的 [Campbell, E. A. 等人 (2001). Cell. Vol. 104, p. 901-912])。因此,对这些羟基的修饰是不希望的。从前述角度,本发明是独特的,因为本发明设计了一种策略,来开发聚酮骨架中发生修饰的新型类似物和衍生物。

[0099] 在本发明中,开发了地中海拟无枝酸菌 S699 的突变体,用于生产利福霉素 B 的类似物,24- 脱甲基利福霉素 B,这也是对通过使用这种途径来生产利福霉素 B 的多种类似物而开启的组合生物合成的概念的证明。此类似物的衍生物有效对抗结核分枝杆菌的 MDR 株。更重要地,本发明首次提供了对于可通过生产利福霉素 B 类似物用的组合途径在模块 4 之外操作 rifPKS 基因簇的概念的证明。现在可改进突变株供商业应用。

[0100] 因此本发明提供用于操作地中海拟无枝酸菌 S699 的 rifPKS 的组合生物合成策略。因而在本发明中,设计的策略允许将 ( 募集丙酸酯的 )rifPKS 的第六模块 (AT6) 的酰基转移酶结构域与 ( 将乙酸酯募集到生长链上的 )rapPKS 的第二模块 (rapAT2, 来自吸水链霉菌 ( 有登录号 :X86780.1 和 DSM 培养物保藏 -DSM 41524)) 的酰基转移酶结构域交换。这些区域的交换导致产生的利福霉素 B 的新的类似物,即 24- 脱甲基利福霉素 B 的开发和生产。此外本发明也设计策略来开发 24- 脱甲基利福霉素 B 的衍生物。由此发现开发的新的类似物和衍生物有效对抗多种细菌物种 ( 图 20-21)。更具体地,发现这些新的类似物和衍生物有效对抗结核分枝杆菌的 MDR 菌株。

[0101] 尽管有已知事实,即已知如 rifPKS 的复杂聚酮系统对于通路工程而言本质上较难改变,是由于下游的酶对于接受经修饰的底物的刚性,或由于经修饰的 PKS 系统的结构模块性的不兼容 [Khosla, C. 等人 (2009). Curr. Opin, Chem. . Biol. Vol. 13, p. 135-143]。本发明不仅鉴别出途径来阐明和解出 rifPKS 系统目前的缺点,还达成对分枝杆菌的已知和 / 或耐药菌株高度有效的类似物和衍生物。由此解决了在利福霉素聚酮骨架,特别是作为 rifPKS 基因的 rifAT6 区域的目标的萘醌环的合成的步骤中设计的 rifPKS 系统的性质不可改变的现有问题。用结构域替换策略,将此 rifPKS 基因簇的 rifAT6 区域与 rapAT2 交换。这导致新的利福霉素类似物,即 24- 脱甲基利福霉素 B,和进一步的其衍生物,即 24- 脱甲基利福霉素 S、24- 脱甲基利福霉素 SV 和 24- 脱甲基利福平。

[0102] 24- 脱甲基利福霉素 B 及其衍生物的这些类似物 ;24- 脱甲基利福霉素 SV、24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福平,不仅是以可比的量产生,还表现更强的抗金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、耻垢分枝杆菌、枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)、绿脓假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)、大肠杆菌 (Escherichia coli) 的抗菌活性。

[0103] 本发明也提供能够产生利福霉素 B 的类似物即 24- 脱甲基利福霉素 B 的地中海拟无枝酸菌 S699 的突变菌株。本发明也提供开发地中海拟无枝酸菌 S699 的突变菌株的方法。在本发明中已发现,地中海拟无枝酸菌 S699 的菌株在增殖中、并且也在利福霉素 B 类似物

的表达中相当稳定。从这些突变体中生产类似物已以实验室规模进行。产量为约 50mg/L 的类似物 24- 脱甲基利福霉素 B。

[0104] 从地中海拟无枝酸菌 S699 的突变菌株产生的类似物的 NMR 研究表明,利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 B 的 NMR 谱图有显著差异 (图 13)。NMR 谱图显示,24- 脱甲基利福霉素 B 有  $m/z$  740 的准分子离子,而 24- 脱甲基利福霉素 SV 的准分子离子为  $m/z$  682,这比利福霉素 B 和利福霉素 SV 少 14 个原子质量单位。

[0105] 利福霉素耐受性与编码 DNA- 依赖性的 RNAP  $\beta$ - 亚基的 *rpoB* 基因的 81-bp 区域中的基因改变有关 (Williams 等人, 1998. *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother., Vol. 42, 1853-1857 页)。本发明使用耐利福平结核分枝杆菌菌株,即在其 RNAP  $\beta$ - 亚基中含 S531L 突变的 OSDD 321 和 OSDD 206,和含 H526T 突变的 OSDD 55。突变在 OSDD 菌株中确认。基于序列数据,本发明发现耐药突变破坏了聚酮的柄 (ansa) 链中的氢键和可能的盐桥 (图 15b)。然而 24- 脱甲基利福平中甲基的失去可能导致柄链中的构象变化,使得化合物具有更多的柔性而结合突变的 RNAP。因此相信除了有利的分配系数以外,从柄链的旁式 (gauche)、顺戊烷和重叠相互作用的差异产生的柔性,以及与构象变化相关的氢键网络中的变化 (图 15c),导致野生型和耐药菌株中的结合亲和性都增加。这种可能的构象柔性可能也与 24- 脱甲基利福平不稳定的  $^1H$  和  $^{13}C$  NMR 谱联系。从前文的角度,本发明中提供的最意想不到和独特的发现是,24- 脱甲基利福平抗结核分枝杆菌的利福平敏感和利福平耐药菌株的活性。24- 脱甲基利福平表现出更强的抗结核分枝杆菌的利福平耐药菌株的活性。因此本发明的此发现向罹患分枝杆菌已对现有利福平药物或相关药物变得耐受的结核病的患者打开了完全的希望。这些结果与计算的自由能扰动 (free energy perturbation, FEP) 研究相印证, FEP 研究显示,相比于利福霉素 B, RNAP 以 1.2kcal/mol 优先选择 24- 脱甲基利福霉素 B (表 1)。这是意义重大的,因为现在可开发此化合物作为治疗 MDR-TB 的具前景的导向。

[0106] 表 1. 24- 脱甲基利福霉素 B 和野生型 RNAP 的计算自由能扰动 (FEP) 研究

[0107] \* 所有能量的单位为 kcal/mol。

[0108]

|              | 蛋白亲和性 $\Delta G$ | 溶剂亲和性 $\Delta G$ | 结合亲和性 $\Delta G$ | 相对结合 $\Delta G^*$ |
|--------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 利福霉素B        | -36.2            | -28.4            | -7.8             | 0.0               |
| 24-脱甲基-利福霉素B | -35.0            | -26.0            | -9.0             | -1.2              |

[0109] 由此,本发明通过首次显示 *rifPKS* 对结构域替换修饰是可变化的,而展示出利福霉素 B 的新型类似物和衍生物的产生,导致新型利福霉素类似物的形成。

[0110] 本发明提供独特的能够产生利福霉素类似物的重组序列 ID No. 1 (图 22)。本发明也提供包含重组序列 ID No. 1 的载体构建体。

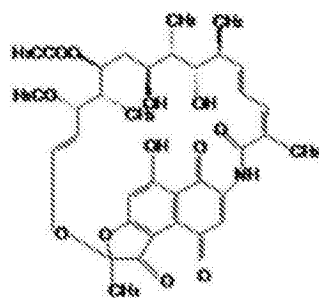
[0111] 本发明提供携带核苷酸序列 ID No. 1 的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34。更具体地,此新菌株的参考号为地中海拟无枝酸菌 S699#34,携带重组子 SEQ ID No. 1 (图 22),该重组子向菌株提供独特的特性,并且此独特特性允许新菌株表达或产生利福霉素类似物,例如 24- 脱甲基利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 S。

[0112] 本发明也提供有效对抗细菌物种特别是分枝杆菌的本发明中记载的抗菌化合物及其盐的药物组合物。本发明的药物组合物意在用于肠胃外和口服给药。优选地,本发明如此处记载的药物组合物可肠胃外地给药,例如静脉、皮下、皮内或肌内给药。本发明也提供作为“药学上可接受的辅料”功能的物质,其中术语“药学上可接受的辅料”意指用来实现如本文记载的抗菌化合物的传递、溶解或悬浮的药学上可接受的制剂载体、溶液或添加剂。本发明的药物组合物按需也可含有药学上可接受的辅助物质,从而近似生理状态,例如 pH 调节和缓冲剂、渗透压调节剂和湿润剂等。本发明的药物组合物也可含有药学上可接受的载体,例如佐剂等。此发明的药物组合物也可按任何方便的形式给药,例如片剂、胶囊剂、注射剂、颗粒剂或粉末形式,例如在小袋中的。

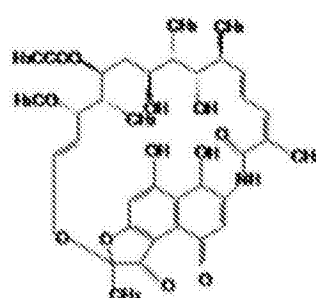
[0113] 将参照发明的非限制性实施方案进一步解释本发明。

[0114] 因此,本发明的主要实施方案涉及具有下列化学结构及其盐的抗菌化合物:

[0115]

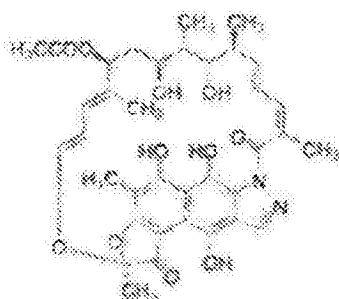


24-脱甲基利福霉素S

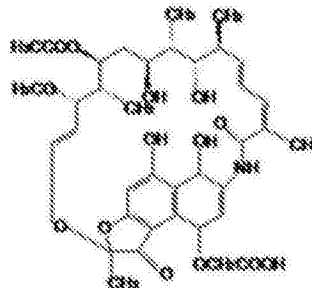


24-脱甲基利福霉素SV

[0116]



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

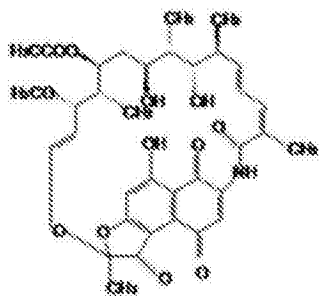
[0117] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对细菌引起的感染或疾病有用。

[0118] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用。

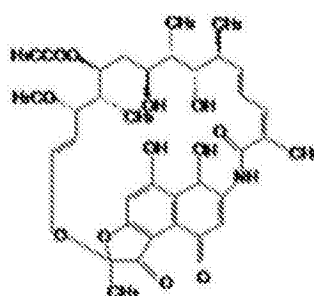
[0119] 本发明的另一实施方案涉及本发明的抗菌化合物,其对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用,其中选择的分枝杆菌属物种为结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的 MDR 株。

[0120] 本发明的另一实施方案还涉及药物组合物,其包含具有下列化学结构的抗菌化合物和 / 或其盐和它们药学上可接受的载体:

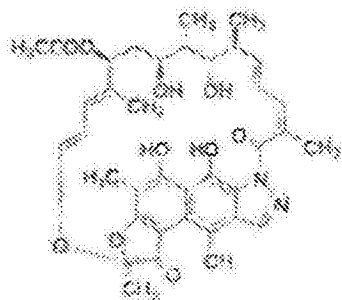
[0121]



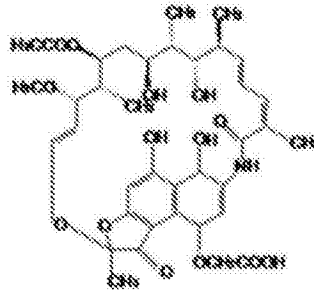
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

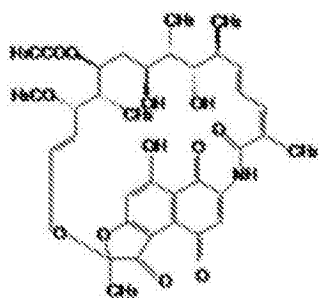
[0122] 本发明的另一实施方案涉及药物组合物,其包含对细菌引起的感染或疾病有用的本发明的抗菌化合物。

[0123] 本发明的另一实施方案涉及药物组合物,其包含对分枝杆菌属物种引起的感染或疾病有用的本发明的抗菌化合物。

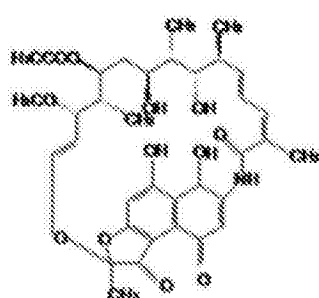
[0124] 本发明的另一实施方案还涉及药物组合物,其包含对结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的MDR菌株引起的感染或疾病有用的本发明的抗菌化合物。

[0125] 本发明的另一实施方案还涉及一种治疗方法,其包括,向患者给予具有下列结构的抗菌化合物或其盐:

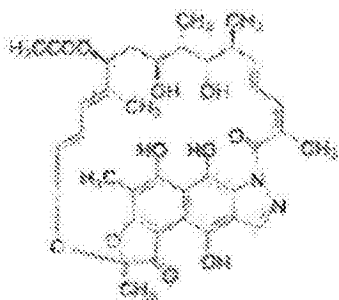
[0126]



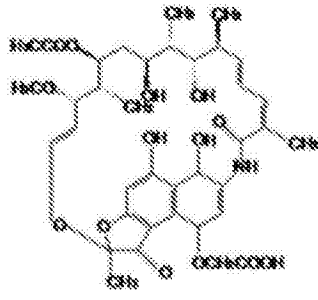
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



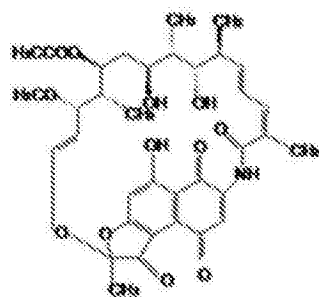
24-脱甲基利福平



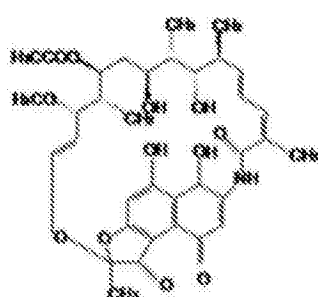
24-脱甲基利福霉素B。

[0127] 本发明的另一实施方案还涉及用于治疗疾病或感染的、具有下列化学结构的抗菌化合物或其盐用于制备药物的用途：

[0128]

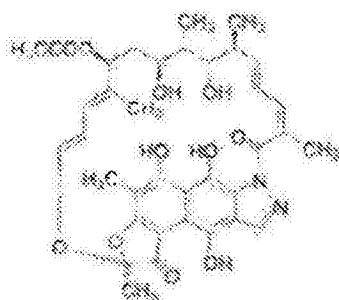


24-脱甲基利福霉素S

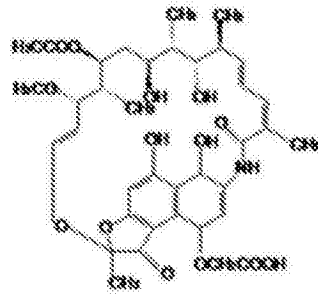


24-脱甲基利福霉素SV

[0129]



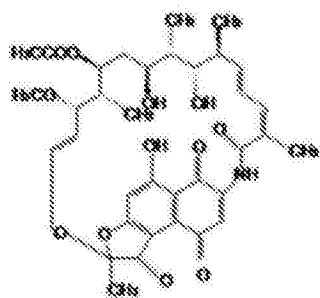
24-脱甲基利福平



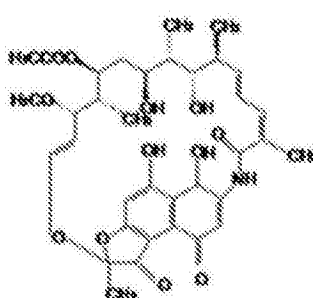
24-脱甲基利福霉素B。

[0130] 本发明的另一实施方案还涉及具有下列化学结构的抗菌化合物或其盐用于制备药物的用途：

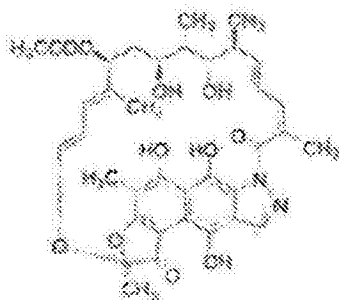
[0131]



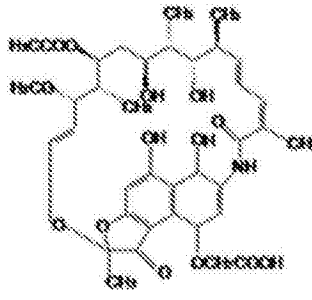
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

[0132] 本发明的另一实施方案涉及含有本发明的抗菌化合物的药物用于治疗疾病或感染的用途。

[0133] 本发明的另一实施方案还涉及含有本发明的抗菌化合物的药物用于治疗细菌引起的疾病或感染的用途。

[0134] 本发明的另一实施方案还涉及含有本发明的抗菌化合物的药物用于治疗分枝杆菌属物种引起的疾病或感染的用途。

[0135] 本发明的另一实施方案涉及含有如权利要求 10 或 13 中所要求的本发明的抗菌化合物的药物用于治疗分枝杆菌属物种、结核分枝杆菌和结核分枝杆菌的 MDR 菌株引起的疾病或感染的用途。

[0136] 本发明的另一实施方案涉及含有本发明的抗菌化合物和药学上可接受的载体的药物组合物的制备方法。

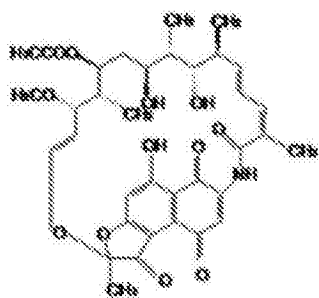
[0137] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其包含基因 rapAT2 区域。

[0138] 本发明的另一实施方案还涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其中 rifAT6 区域与 rapAT2 区域交换。

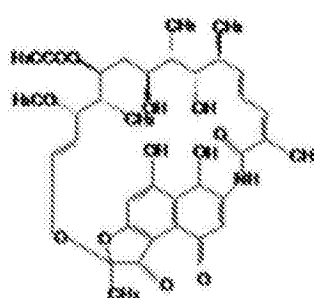
[0139] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其能够产生如本文所记载的利福霉素 B 的类似物和衍生物。

[0140] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34, 其能够产生包含下列化学结构的利福霉素 B 的类似物和衍生物:

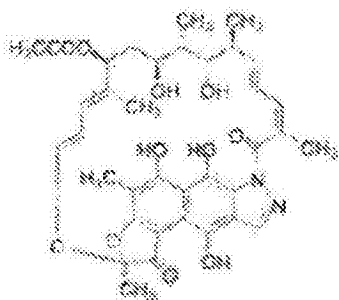
[0141]



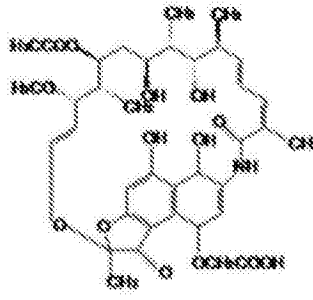
24-脱甲基利福霉素S



24-脱甲基利福霉素SV



24-脱甲基利福平



24-脱甲基利福霉素B。

[0142] 本发明的另一实施方案涉及包含 rifPKS 中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34 的制备方法,所述方法包括下列步骤:

[0143] (a) 分离来自地中海拟无枝酸菌 S699 的 rifPKS 的 rapAT6 区域,以及吸水链霉菌 (登录号 DSM-41524) 的 rapAT2 区域;

[0144] (b) 通过将 rifPKS 的 rapAT6 区域与吸水链霉菌 (登录号 DSM-41524) 的 rapAT2 区域交换,制备载体构建体;

[0145] (c) 将步骤 (b) 的载体构建体插入地中海拟无枝酸菌 S699;和

[0146] (d) 获得包含 rifPKS 的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699 的新菌株 #34。

[0147] 本发明的另一实施方案涉及制备新型抗菌化合物的方法,所述方法包括下列步骤:

[0148] (a) 培养包含 rifPKS 区域中的 rapAT2 区域的地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞;和

[0149] (b) 收获地中海拟无枝酸菌 S699#34 的细胞,从而获得产物的粗级分;

[0150] (c) 通过 HPLC 纯化粗产物;

[0151] (d) 获得抗菌化合物 24-脱甲基利福霉素 B 和 24-脱甲基利福霉素 SV。

[0152] 本发明的另一实施方案涉及一种制备 24-脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24-脱甲基利福霉素 S 的方法,所述方法包括下列步骤:

[0153] (a) 在选自氯化铜的试剂的存在下使 24-脱甲基利福霉素 B 反应;

[0154] (b) 在室温下使步骤 (a) 的反应过夜进行;

[0155] (c) 获得 24-脱甲基利福霉素 S。

[0156] 一种制备 24-脱甲基利福霉素 B 的衍生物 24-脱甲基利福平的方法,所述方法包括下列步骤:

[0157] (a) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 和乙酸的存在下使 24-脱甲基利福霉素 B 反应;

- [0158] (b) 向步骤 (a) 的混合物添加多聚甲醛和 1, 3, 5- 三甲基 - 六氢 -1, 3, 5- 三嗪 ;
- [0159] (c) 获得 3- 甲基 -1, 3- 噁嗪并 (5, 6-c)-24- 脱甲基利福霉素 ;
- [0160] (d) 使步骤 (c) 的化合物与 1- 氨基 -4- 甲基 - 哌嗪反应 ; 和
- [0161] (e) 获得 24- 脱甲基利福平。
- [0162] 本发明的另一实施方案涉及重组核苷酸 SEQ ID No. 1。
- [0163] 本发明的另一实施方案涉及含有核苷酸 SEQ ID NO. 1 的细菌菌株。
- [0164] 本发明的另一实施方案涉及含有核苷酸 SEQ ID NO. 1 的地中海拟无枝酸菌 S699#34 菌株。
- [0165] 本发明的另一实施方案涉及本发明的细菌菌株, 其中细菌菌株能够产生利福霉素类似物。
- [0166] 本发明的另一实施方案涉及地中海拟无枝酸菌 S699#34 菌株, 其中细菌菌株能够产生利福霉素类似物。
- [0167] 本发明的另一实施方案涉及重组核苷酸 SEQ ID No. 1, 其能表达利福霉素的新型类似物。
- [0168] 本发明的另一实施方案涉及本发明的重组核苷酸序列, 其中所述类似物为 24- 脱甲基利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 S。
- [0169] 本发明的另一实施方案涉及包含重组核苷酸序列 ID No. 1 的载体构建体。
- [0170] 本发明的另一实施方案还涉及载体构建体, 其中所述载体构建体为 pAT6E 和 pAT6F。
- [0171] 本发明的另一实施方案涉及包含如本发明记载的载体构建体的细菌菌株。
- [0172] 本发明的另一实施方案涉及包含如本发明记载的载体构建体的地中海拟无枝酸菌 S699#34 菌株。
- [0173] 本发明的另一实施方案涉及携带 pAT6F 载体的地中海拟无枝酸菌 S699#34 菌株, 其中所述 pAT6F 载体包含核苷酸序列 No. 1。
- [0174] 本发明的另一实施方案涉及能携带 pAT6F 载体的细菌菌株, 其中所述 pAT6F 载体包含核苷酸序列 No. 1。
- [0175] 本发明的另一实施方案涉及能携带 pAT6F 载体的微生物菌株, 其中所述 pAT6F 载体包含核苷酸序列 No. 1。
- [0176] 本发明的另一实施方案涉及能表达核苷酸序列 No. 1 和 / 或其产物的微生物菌株。
- [0177] 虽然还没有关于通过组合生物合成来操作利福霉素 B 的骨架的报道, 但有在其它聚酮合酶基因上尝试组合生物合成的报道。如本发明的记载而明白的, 在通过使用组合途径而改变利福霉素 B 分子中取得了值得注意的成功。
- [0178] 下列记载仅是示例性的实施方案, 并且不意图对本发明的范围、适用或配置以任何方式进行限制, 相反, 下列记载提供了对本发明的示例性事实方案的方便的阐释。对于记载的实施方案, 可在不偏离本发明范围的前提下对要件的功能和排列进行各种变化。
- [0179] 实施例
- [0180] 实施例 1
- [0181] 地中海拟无枝酸菌 S699 的基因操作。
- [0182] 常规的基因方法, 例如基因组 DNA 分离 (根据 CTAB- 溴化十六烷基三甲基铵

法)、质粒分离(Promega DNA 纯化试剂盒)和限制性内切酶消化按标准技术进行。构建质粒 pAT6F,用此前记载的方法 [Dhingra, G. 等人 (2003). J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Vol. 13, p. 195-204] 向地中海拟无枝酸菌 S699 中转化(用 BioRad GenePulser),并且电穿孔混合物涂在每升含有 4g 酵母提取物、10g 麦芽提取物和 4g 葡萄糖的 YMG 琼脂板(pH 7.2)上。上铺有含 500  $\mu$ g/mL 红霉素的软琼脂(5g/L, Difco™ 琼脂,颗粒状),以便在温育 12-16h 后赋予抗性。5-7 天后获得的转化物在含 50  $\mu$ g/mL 红霉素(Sigma Aldrich)的 YMG 培养基中生长来确认抗性。这些单交换型(SCO)克隆中 pAT6F 的整合通过 DNA 印迹杂交确认。为影响 rifAT6 由 rapAT2 的替换,这些 SCO 在没有红霉素的 YMG 培养基中培养 3-4 轮。细胞涂在有和没有红霉素压力的 YMG 琼脂板上,并选择抗生素敏感的克隆。双杂交(DCO)克隆进一步通过 DNA 印迹杂交确认。对于 DNA 杂交,基因组 DNA 固定在 Hybond N+ 膜(Amersham Biosciences)上。用 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] 标记的 DNA 探针,在 65°C 下进行杂交 12h。对于非放射性方法,杂交用 DIG- 标记的 DNA 探针在 65°C 下进行。严格洗涤在 65°C 下用 5 $\times$ SSC、2 $\times$ SSC、1 $\times$ SSC 和 0.1 $\times$ SSC 进行。获得的 DCO 克隆含有重组核苷酸序列 ID No. 1(图 22)。如记载和描述的含有重组核苷酸序列 ID No. 1 的地中海拟无枝酸菌 S699 克隆被予以(内部)参考号地中海拟无枝酸菌 S699#34。

#### [0183] PCR I 和 PCR II 用引物的构建

[0184] 用寡聚引物,即引物 I 和 II(表 1) 分别作为正向和反向引物,扩增位于 rifAT6 上游的 AT6 侧翼区域,也称为 PCR I(41862-43533bp)。为了帮助将 PCR I 克隆入 pUC 18 的 SmaI 位点,限制性位点 XbaI 和 BalI 分别引入引物 I 和 II 的 5' 端。这些位点随后用于克隆。

[0185] 类似地,用引物对引物 III 和引物 IV(表 2) 扩增位于 rifAT6 下游的 PCR II(44488-45989bp)。在 5' 端,向引物 III 中引入 AvrII 位点,并向引物 IV 引入 XbaI,用于后续的 pUC 18 中的克隆。

#### [0186] 表 2:用于扩增 PCR I 和 PCR II 的引物的序列

[0187]

|       |                                                              |  |
|-------|--------------------------------------------------------------|--|
| 引物I   | <i>Xba</i> I<br>5'-CTCTAGAAGGCGCTCGCCCGGCACCTGCGCGACGAACT-3' |  |
| 引物II  | <i>Bal</i> I<br>5'-CTGGCCAGGGAAGACCCAGACGAGCTTG-3'           |  |
| 引物III | <i>Avr</i> II<br>5'-CCCTAGGGCGGACCGGCCGGGTCGACCTGCCGA-3'     |  |
| 引物IV  | <i>Xba</i> I<br>5'-CTCTAGAGGTGCCAGCGATCCGGCGCCCGAGA-3'       |  |

[0188] 在所有引物中为产生限制性位点而插入的另外核苷酸用红色标出。PCR I 和 PCR II 的正向引物中产生的限制性酶切位点的核苷酸序列用浅蓝色标出,而在反向引物中用黄色标出。

#### [0189] 实施例 2

#### [0190] pAT6A、pAT6B 和 pAT6C 的构建

[0191] PCR I 和 PCR II 产物从黏粒克隆 no. 13 上的 rifPKS 产生。然后在线性化并去磷酸化的 pUC18 的 SmaI 位点进行多核苷酸激酶处理的 PCR I 或 PCR II 片段的连接。接下来, 连接混合物转入大肠杆菌 JM101。pUC 18 中含有 PCR I 和 PCR II 的质粒分别命名为 pAT6A 和 pAT6B。在质粒 ‘pAT6A’ 中, PCR I 逆向连接至后续克隆所需的质粒。根据所需的方向, PCR I 的 XbaI 位点应与质粒的 NdeI 位点相邻, 然而获得的克隆有远离质粒的 NdeI 位点的 XbaI 位点。为了使方向反转, 用 EcoRI/HindIII 双酶切切下 PCR I, 并引入 pUC19, 最终得到质粒 pAT6C。

[0192] 实施例 3

[0193] pAT6D 的构建

[0194] 质粒 pM02[Olinsky, M. 等人 (1996). Chem. Biol. Vol. 3, p. 833-839]), 其中克隆有来自吸水链霉菌的雷帕霉素生物合成的基因簇的模块 2(AT2) 的酰基转移酶, 用 AvrII/HindIII 消化, 以释放 rapAT2 结构域。质粒 pAT6B 也用 AvrII/HindIII 消化, 并将 rapAT2 与线性化的 pAT6B 连接, 并将连接混合物转入大肠杆菌 JM101, 并选择含有正确插入的克隆。这些构建体命名为 pAT6D。

[0195] 实施例 4

[0196] pAT6E 的构建

[0197] 通过用 BalI/NdeI 消化 pAT6C 而切下 PCR I, 同时用 BalI/NdeI 消化 pAT6D。将来自 pAT6C 的插入物和线性化 pAT6D 连接, 连接混合物转入大肠杆菌 JM101。这样获得的构建体命名为 pAT6E。

[0198] 实施例 5

[0199] [发展用于交换的功能性盒 (pAT6F-8.3kb) 的策略 (图 6)]:

[0200] 最终盒 pAT6F 的构建

[0201] 质粒 pAT6E 用 XbaI 消化, 以释放 PCR I-rapAT2-PCR II 片段 (约 4kb), 并克隆入 XbaI 消化的含红霉素抗性基因的载体 pIJ4026。pIJ4026 (由 M. J. Bibb, John Innes Institute, Norwich 提供) (图 6) 是大肠杆菌质粒, 但含有赋予对红霉素抗性的 ermE 基因, 并仅在地中海拟无枝酸菌中表达, 而不在大肠杆菌中表达。包含由 pIJ4026 中的 PCR I、rapAT2 和 PCRII 片段组成的 3.85 kb 片段的最终的构建体命名为 pAT6F。3.85kb 片段命名为 SEQ ID NO. 1 (图 22)。

[0202] 此质粒 pAT6F 通过电穿孔 (7.5KV/Cm, 1000  $\Omega$ , 25  $\mu$ F) 转化入地中海拟无枝酸菌 S699。在 GYM 琼脂培养基 (葡萄糖 4g/l; 麦芽提取物 10g/l; 酵母提取物 4g/l) 中、红霉素压力下选择单交换型克隆。选择没有表现出棕色着色的单交换 (SCO) 克隆 (这是由于通过同源重组, pAT6F 整合入染色体, 生物合成通路被阻断因而利福霉素的产生缺失) (图 7 和 8)。如本发明所述的含核苷酸序列 ID No. 1 的质粒 pAT6F 示于图 22。

[0203] 为确认基因型, 来自这些单交换 (S. C. O.) 型克隆的 DNA 与质粒 (pIJ4026) 杂交。4 个 SCO 克隆 (1-5, 2-2, 6-1, 6-2) 显示阳性杂交信号 (图 9)。为了选择双交换 (D. C. O.), 阳性 SCO 型克隆 2-2 在没有红霉素压力的条件下进一步培养 3-4 代。选择有能力产生利福霉素 (恢复棕色着色) 的红霉素敏感双交换 (D. C. O.) 型克隆。这些克隆具有与 rapAT2 交换的 rifAT6 (图 7)。通过过 DNA 杂交和 DNA 测序, 以基因水平再次对获得的 D. C. O. (图 10) 进行 AT2 结构域而不是 AT6 存在的检查。四个克隆表现出有 rapAT2 基因的阳性信号 (图

11)。含有重组序列 ID No. 1 的 D. C. 0 克隆命名为地中海拟无枝酸菌 S699#34。

[0204] 由这些 DCO 克隆产生的期望的利福霉素类似物用 LC ESI-MS 分析。这些阳性克隆仅有 3 个 (#3、#34 和 #36) 产生期望的类似物 (图 12)。结果通过  $^1\text{H}$  NMR 确认 (图 13)。发现类似物的分子量为 741, 这比天然的利福霉素 B 的分子量 (755) 少 14amu (原子质量单位 (atomic mass unit))。

[0205] 突变菌株的孢子最初在 30℃、200rpm 下、YMG 培养基中, 在摇床上生长 3 天。然后用种子培养物接种 (10%, v/v) 500mL 烧瓶中的 YMG 培养基 (10×100mL)。在相同条件下温育 10 天后, 将培养物离心, 用 1N HCl 将采集的上清酸化至 pH 3, 并用乙酸乙酯 (2×1L) 提取代谢产物。对利福霉素相关化合物的粗提取物进行硅胶色谱, 用  $\text{CHCl}_3$ -MeOH/5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10:1, 然后 8:1) 作为流动相。汇集含产物的级分, 并用旋转蒸发仪干燥。获得的产物进一步用 HPLC [YMC-ODS-A, 250×10mm,  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{HCOONH}_4$  (0.05M) (60:40), 流速 2mL/min, 254nm] 纯化。然后用 Sephadex LH-20 柱, 以 MeOH 作为洗脱剂, 将产物脱盐, 以给出 24- 脱甲基利福霉素 B (20mg) 和 24- 脱甲基利福霉素 SV (8mg)。

[0206] 24- 脱甲基利福霉素 B:  $^1\text{H}$  NMR (700MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , CryoProbe):  $\delta$  6.69 (s, 1H, H-3), 6.34 (d, 1H,  $J = 12\text{Hz}$ , H-29), 5.98 (d,  $J = 11\text{Hz}$ , 1H, H-17), 5.75 (dd,  $J = 15\text{Hz}$ , 11Hz, 1H, H-18), 5.21 (dd,  $J = 15\text{Hz}$ , 10Hz, 1H, H-19), 5.05 (m, 2H, H-25, H-28), 4.50 (d,  $J = 17\text{Hz}$ , 1H,  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), 4.42 (d,  $J = 17\text{Hz}$ , 1H,  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), 3.38 (bd,  $J = 10\text{Hz}$ , 1H, H-23), 3.22 (m, 2H, H-21 和 H-27), 3.22 (s, 3H, H-37), 2.11 (s, 3H, H-36), 2.08 (s, 3H, H-14), 1.98 (m, 2H, H-20 和 H-26), 1.70 (s, 3H, H-13), 1.53 (m, 2H, H-22 和 H-24), 1.28 (t,  $J = 12\text{Hz}$ , 1H, H-24), 0.92 (d,  $J = 6.5\text{Hz}$ , 3H, H-31), 0.85 (d,  $J = 7\text{Hz}$ , 3H, H-32), 0.72 (d,  $J = 6.5\text{Hz}$ , 3H, H-34).  $^{13}\text{C}$  NMR (175MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , CryoProbe):  $\delta_c$  191.7, 176.7, 174.7, 168.1, 144.7, 142.1, 141.5, 131.5, 126.5, 126.4, 119.4, 117.8, 113.7, 112.8, 112.1, 109.6, 104.4, 101.1, 80.5, 73.9, 72.4, 71.5, 68.8, 54.9, 48.8, 41.4, 39.9, 35.9, 32.2, 21.8, 20.6, 20.5, 15.4, 9.5, 9.5, 6.9. (-)-HR-ESI-TOF-MS  $m/z$  740.2939 ( $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{NO}_{14}$  [M-H] 计算值: 740.2918)。

[0207] 24- 脱甲基利福霉素 SV:  $^1\text{H}$  NMR (700MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , CryoProbe):  $^1\text{H}$  NMR (700MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.42 (s, 1H), 6.31 (bd,  $J = 12\text{Hz}$ , 1H), 5.95-5.89 (m, 2H), 5.51 (s, 1H), 5.20 (bt,  $J = 12\text{Hz}$ , 1H), 5.14 (bd,  $J = 9\text{Hz}$ , 1H), 3.22 (s, 3H), 3.17 (t,  $J = 10\text{Hz}$ , 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12-2.11 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.54-1.49 (m, 4H), 0.93 (d, 6H), 0.78 (d,  $J = 5\text{Hz}$ , 3H). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  ( $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{NO}_{12}$  [M-H] 计算值: 682.2707)。

[0208] 实施例 6

[0209] 24- 脱甲基利福霉素 B 向 24- 脱甲基利福霉素 S 的转换

[0210] 24- 脱甲基利福霉素 B (8mg, 0.0107mmol) 溶解在含  $\text{CuCl}_2$  (0.1mM) 的  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (10:1, 5mL) 中。反应混合物在室温下搅拌过夜, 以使 24- 脱甲基利福霉素 B 转换为 24- 脱甲基利福霉素 S。混合物酸化至 pH 3, 且产物用乙酸乙酯提取 (3×5mL)。提取物送至硅胶柱, 用  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (10:1) 作为洗脱剂, 从而给出 24- 脱甲基利福霉素 S (6mg)。

[0211] 产物用 (-)-ESI-MS 和  $^1\text{H}$  NMR 谱分析 (680 的  $m/z$  [M-H] $^-$ , 表明分子中没有乙醇酸部分, 存在萘醌单元)。有趣的是, 在  $\text{CDCl}_3$  中 -20℃ 下储存, 形成透明红棕色正交晶体, 揭示出通过 C-1、C-8、C-21 和 C-23 氧原子与  $\text{Ca}^{2+}$  配位的 24- 脱甲基利福霉素 S 的二聚形式

(图 15a)。

[0212]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7.85 (s, 1H), 7.04 (m, 1H), 6.88 (bd,  $J = 11\text{Hz}$ , 1H), 6.59 (m, 1H), 5.23 (dd,  $J = 12.6\text{Hz}$ ,  $9.7\text{Hz}$ ), 4.53 (bt,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H), 4.22 (bd,  $J = 10\text{Hz}$ , 1H), 3.80 (bd,  $J = 10\text{Hz}$ , 1H), 3.48 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.62 (m, 3H), 1.41 (d,  $J = 7\text{Hz}$ , 3H), 1.29 (d,  $J = 6.8\text{Hz}$ , 3H), 0.67 (d,  $J = 7\text{Hz}$ , 3H). HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  680.2730 ( $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{NO}_{12}[\text{M}-\text{H}]$  计算值: 680.2707)。

[0213] 24-脱甲基利福霉素 S 的 X-射线晶体学。在 Bruker Apex CCD 衍射仪上, 用 MoK 辐射  $\lambda = 0.71073\text{\AA}$ , 在 173 (2) K 下采集衍射强度。基于系统性的缺失确定空间组。通过 SADABS [Sheldrick, G. M. (1998). Bruker/Siemens Area Detector Absorption Correction Program (Bruker AXS, Madison, WI)] 实施吸收校正。通过直接法和傅立叶技术解析出结构, 并用全矩阵最小二乘法对  $F^2$  精确化。所有非-H 原子用各向异性热参数精确化 (图 16)。H 原子在刚性基团模型中以计算的位置处理。发现溶剂水以 0.25 的占位因子在分子之间的位置部分占位。该溶剂水分子中的 H 原子没有加以考虑。Flack 参数为 0.00 (10)。相对高的  $R_{\text{int}}$  值 0.1271 与高角度处的衍射非常弱并且高角度处的强度统计不良这一事实相关。所有计算通过 Bruker SHELXTL (v. 6.10) 包 [Sheldrick, G. M. (1998). Bruker/Siemens Area Detector Absorption Correction Program (Bruker AXS, Madison, WI)] 进行。

[0214] 实施例 7

[0215] 24-脱甲基利福平的合成

[0216] 24-脱甲基利福霉素 S (5mg, 0.0073mmol) 溶解在 DMF (200  $\mu\text{L}$ ) 和乙酸 (50  $\mu\text{L}$ ) 中。在 50 $^{\circ}\text{C}$  下搅拌混合物后, 添加多聚甲醛 (3mg) 和 1, 3, 5-三甲基-六氢-1, 3, 5-三嗪 (8  $\mu\text{L}$ )。反应物在 50 $^{\circ}\text{C}$  下搅拌 2h 直至所有起始原料转换为 3-甲基-1, 3-噁嗪并 (5, 6-c)-24-脱甲基利福霉素, 由 TLC 上的蓝色点指示。接着, 向混合物添加 1-氨基-4-甲基-哌嗪 (8  $\mu\text{L}$ )。搅拌反应物, 通过 TLC 监测, 直至蓝色点消失, 24-脱甲基利福平形成。混合物用冷却的 2% 乙酸 (1.5mL) 稀释, 并用  $\text{CHCl}_3$  (2mL) 提取 3 次。合并有机级分, 并浓缩至 1mL, 并进一步用盐水溶液洗涤 3 次。合并有机级分, 并在无水硫酸钠上干燥, 然后在旋转蒸发仪下干燥。粗级分送至硅胶色谱, 用  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 以 10:1 和 8:1 的比作为洗脱剂。含产物的级分汇集出, 并进一步通过 HPLC [ $\text{CH}_3\text{CN}$ -0.05M  $\text{HCOONH}_4$  (60:40)], 以 (YMC-ODS-A, 250 $\times$ 10mm ID, 5 微米粒径) 柱和 2mL/min 流速在 254nm 下纯化。干燥含 24-脱甲基利福平的级分, 从而提供产物为微红橙色粉末的标题化合物 (2.5mg, 0.0031mmol)。

[0217]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): (图 17) HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  807.3829 ( $\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{12}[\text{M}-\text{H}]$  计算值: 807.3816)。

[0218] 为确认 24-脱甲基利福平的特性, 进行比较 MS/MS 分析 (图 18)。结果显示 24-脱甲基利福平 ( $m/z$  807  $\rightarrow$  676  $\rightarrow$  616  $\rightarrow$  490  $\rightarrow$  420) 和利福平 ( $m/z$  821  $\rightarrow$  690  $\rightarrow$  630  $\rightarrow$  490  $\rightarrow$  420) 具有相同的碎片图谱, 虽然 24-脱甲基利福平的多数碎片比利福平的相应碎片少 14 原子质量单位 (图 19)。这些碎片图谱也与此前对利福平报道一致 (Prasad, B. 和 Singh, S. J. (2009) Pharm. Biomed. Anal. Vol. 50, pages 475-490)。

[0219] 实施例 8

[0220] 抗菌试验

[0221] 利福平及其类似物和衍生物即 24-脱甲基利福霉素 B、24-脱甲基利福霉素 S、

24- 脱甲基利福霉素 SV 和 24- 脱甲基利福平的抗菌活性也通过琼脂扩散试验测定。

[0222] 将耻垢分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在营养琼脂上划线并在 37℃ 下温育过夜。菌落转移至营养肉汤,并在 37℃ 下温育 24h。测定培养物的生长至合适的 600nm 处的密度 (BioRad, SmartSpec 300)。接种物 (1mL) 与温热的营养琼脂 (24mL) 彻底混合,并倒入培养皿。试验前,使琼脂板固化并干燥 30min。无菌 Whatman 盘用利福平及其类似物 (20  $\mu$  L) 以 1mg/mL 的浓度饱和并在室温下干燥。盘放置在接种的琼脂板上,并在 37℃ 下温育 24h。为产生抑制区的对比背景,0.25% MTT 显影染料 (2mL) 添加在盘上。

[0223] 用 24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福霉素 SV 进行对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,例如耻垢分枝杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌试验 (图 20)。结果表明衍生自新类似物 24- 脱甲基利福霉素 B 的新化合物 (24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福霉素 SV) 对抗耻垢分枝杆菌比利福霉素 B 更有活性。进行了模拟研究,表明 24- 脱甲基利福平向结核分枝杆菌的耐利福霉素 RNA 聚合酶的结合比利福平更好。

[0224] 类似地,用 24- 脱甲基利福平、24- 脱甲基利福霉素 S 以及商购可得的利福平和利福霉素 S 进行对耻垢分枝杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌试验。结果显示 24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福平具有抗耻垢分枝杆菌和金黄色葡萄球菌的活性,分别与利福霉素 S 和利福平相当 (图 21)。

[0225] 基于上述结果,对本发明的类似物和衍生物的效果进行进一步研究,以研究结核分枝杆菌的多重耐药菌株。对此,MDR 菌株从开源药物发现 (Open Source Drug Discovery, OSDD ;[www.osdd.net](http://www.osdd.net)) 获得,并根据 WHO 指南在印度 Premas Biotech, Haryana 进行药物试验。分别对两种利福平 - 敏感菌株和结核分枝杆菌三重抗性菌株 :OSDD 209&H37Rv 和 OSDD 55, OSDD 206&OSDD 321 进行药物敏感试验 (表 3)。

[0226] 表 3 :在各种结核分枝杆菌 (耐受和敏感) 菌株 (从 OSDD 获得) 对商购可得的利福平和新型化合物 24- 脱甲基利福霉素 S&24- 脱甲基利福平的药物敏感性试验的比较数据

[0227]

| 结核分枝杆菌菌株         |    | 利福平<br>(HiMedia) | 24-脱甲基利福霉素S | 24-脱甲基利福平 |
|------------------|----|------------------|-------------|-----------|
| OSDD 55 (H526T)  | 耐受 | >50              | 0.1         | <0.01     |
| OSDD 206 (S531L) |    | >50              | 0.05        | 0.05      |
| OSDD 321 (S531L) |    | >50              | 0.1         | 0.05      |
|                  | 敏感 |                  |             |           |
| OSDD 209*        |    | 0.1              | <0.01       | <0.01     |
| H37Rv*           |    | 0.05             | <0.01       | 0.05      |

[0228] \*norpoB 突变

[0229] 试验利福平 (可从 HiMedia 购得)、24- 脱甲基利福平和 24- 脱甲基利福霉 S 抗

上述病原性菌株。用 BacT/ALERT MB 系统 [Crump, J. A. 等人 (2011). J. Clin. Microbiol. Vol. 49, p. 3054-3057], 在不同的药物浓度 (0.01-50  $\mu\text{g/mL}$ ) 下进行试验。结果表明 24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福平表现出具有对结核分枝杆菌的利福霉素 - 敏感和 - 抗性菌株的强烈抗菌活性。

[0230] 由印度 Premas Biotech, Haryana 用不同药物浓度 (0.01-1  $\mu\text{g/mL}$ ) 进行药物敏感试验。药物试验使用 MB BacT/ALERT 系统 [Crump, J. A. 等人 (2011). J. Clin. Microbiol. Vol. 49, p. 3054-3057] 来完成, 该系统是使用比色传感器和反射检测器来确定瓶中的二氧化碳水平的分枝杆菌检测系统。随着微生物的生长, 有  $\text{CO}_2$  产生, 导致传感器的颜色变化 (在瓶的底部)。由于  $\text{CO}_2$  浓度上升, 颜色从绿色变为黄色。瓶含有促进分枝杆菌生长的培养基和 MB/BacT 重构液。样品接种入 MP BacT/ALERT 瓶。试验以两种对照进行: 直接生长对照 (DGC) 和比例生长对照 (PGC)。DGC 包含 0.1mL 种子培养物, 与 0.5mL 重构液一起接种入 MP BacT/ALERT 瓶。PGC 包含 0.5mL 的 DGC, 与 0.5mL 重构液一起接种入 MP BacT/ALERT 瓶。试验瓶包含 0.5mL 种子培养物, 与 0.5mL 重构液和抗生素一起接种入 MP BacT/ALERT 瓶。当 PGC 瓶标示阳性时认为试验完成。

[0231] 自由能扰动研究

[0232] 鉴于 24- 脱甲基利福霉素类似物对利福平 - 敏感和 - 耐受结核分枝杆菌表现出比利福平可比或更佳的活性, 我们决定用野生型 RNAPv [Postma, J. P. M. 等人 (1982). Faraday Symp. Chem. Soc. Vol. 17, p. 55-67; Singh, U. C. 等人 (1987). J. Am. Chem. Soc. Vol. 109, p. 1607-1614] 进行自由能扰动 (FEP) 研究 (表 4)。然而用利福平 - 耐受 RNAP 计算 FEP 是更可取的, 不幸的是, 突变的 holo-RNAP 的晶体结构还有待阐明。本发明中选择利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 B, 基于的是其潜在的更低的计算费用, 因此利福平衍生物稍微更大。此外, 通常接受的是, C-3 或 C-4 侧链并不显著改变药物的结合, 但明显改变转运性质。

[0233] 表 4. 用野生型 RNAP 的 24- 脱甲基利福霉素 B 的计算自由能扰动 (FEP) 研究

[0234]

| 化合物          | 蛋白质亲和性 $\Delta G$ | 溶剂亲和性 $\Delta G$ | 结合亲和性 $\Delta G$ | 相对结合 $\Delta G^*$ |
|--------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 利福霉素B        | -36.2             | -28.4            | -7.8             | 0.0               |
| 24- 脱甲基利福霉素B | -35.0             | -26.0            | -9.0             | -1.2              |

[0235] \* 所有能量的单位为 kcal/mol。

[0236] FEP 计算用 Gromacs 4.5 [Pronk, S. 等人 (2013). Bioinformatics. Vol. 29, p. 845-854], 以 21 个平行窗口, 从此前产生的结构来运行, 并使用 Bennet 接受比来列表显示自由结合能。FEP 结果显示 24- 脱甲基利福霉素 B 对野生型 RNAP 具有与利福霉素 B 相似的亲和性, 但对水具有比后面的化合物更低的亲和性。24- 脱甲基利福霉素 B 溶剂化亲和性中显著的降低引起比利福霉素 B 更高的对蛋白质的分配系数, 导致 24- 脱甲基利福霉素 B 对 RNAP 的相对结合亲和性以 1.2kcal/mol 更好 (表 4)。

[0237]

## 序列表

<110> 印度生物技术部(Department of Biotechnology)  
 印度德里大学(University of Delhi)  
 俄勒冈州通过州高等教育委员会以俄勒冈州立大学(Oregon State University)的名义代表

<120> 抗耐药性细菌的抗菌化合物

<130> 3531WO007

<140> 690/DEL/2013

<141> 2013-03-20

<160> 1

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 4153

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组序列

```

<400>1 caggcgctcg cccggcacct ggcgcacgaa ctcggtggtg cggcccagac gccggtgacc 60
acagcgggccc cgaaggccga cctcgacgag ccgatcgcca tcgtcgggat ggcgtgccc 120
ttgcggggggc ggggtcgccg gcccggaggac ctctggcggc tgggtcgccga gggccgggac 180
gcggtgtcga gcttcttcgac cgaccgccc tgggacaccg acagcctgta cgaccccgat 240
ccggcccgc cgggcaagac ctacacccgg cccggcggct tcctgcacga agccgggctc 300
ttcgacggcg gcttcttcgg gatctcgcca cgcgagggcg tcgccatgga cccgcagcag 360
cggctgtctc tggaggcctc ctgggaggcc atggaagacg cgggggtcga cccactttcg 420
ctgaaggggca acgacgtcgg cgtgttcacc ggcattgtcg gccagggtta cgtcgtctcc 480
gggaacagcg tcgtcacgac ggagctggag ggtttcgcg gacggggcg gtcgtcgagt 540
gtcgcgtccg gccgcgtgtc gtacgtgttc ggggttcgaag gcccgccgt gacgatcgac 600
tcggcgtgct cgtctctcgt ggtcgcgatg caectcgccg cgcagtcgct gcggcagggc 660
gagtgctcga tggccttgac cggcgccgcg acggtgatgg cgaaccccg cgcattcgtg 720
gagttctcgc ggcagcgggg cctcgccgtc gacggtcgct gcaaggcgtt cgcgcgcg 780
gccgacggca cgggctgggc cgaggggcgtc ggtgtggtca tcctcgagcg gctgtcggtg 840
gcgcgggaac gcggccaccg gatcctggcc gtgctgcgcg gcagcgcggt caaccaggac 900
ggcgcctcga acggcctgac cgcgcgaac gggcgtcgc agcagcgggt gatccgctgg 960
gcgctggtga ggcgcgggct ggcaccgtcc gatgtggacg tcgtcgaggg gcacggcacc 1020
gggaccacgc tgggtgacc gatcgaggcg caagctctgc tggctacctc cggcaaggac 1080
cgcgagtcgc cgtgtgtggt cggctcgtcg aagtcgaara tgggccacgc gcaggcctgc 1140
gcgggggtcg cggcgctcat caagatggtc caggcgctcc ggcacgaagt cctgccgccg 1200
acgctgcacg tcgacgggac taccctcgag gtcgactggt cggccgggtc cgtcgaactg 1260
  
```

[0238]

|            |            |             |            |             |             |      |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ctgacggaag | ccccgcgagt | gccgcgcaac  | gggcgccccg | gccgggcccgg | ggctctccgcg | 1320 |
| ttcggcgta  | gcggcacgaa | cgcgcacctg  | atcctggagg | aggcgccccg  | cgaagagccg  | 1380 |
| gtgcccacac | ccgaggttcc | cctgggtgcc  | gtcgtgggtc | ccgcgcggag  | cagggcgctc  | 1440 |
| ctggccggtc | aggccgggtc | cctcgccgga  | ttcgtggcgg | gtgacgcgtc  | cttggccggg  | 1500 |
| gtggccccgg | cgtgtgtgac | gaaccgggcc  | gcgtcgaccg | agcgcgcggt  | catgggtcgt  | 1560 |
| ggctctcgcg | aagaagccgt | gacgaacctg  | gaagcgttgg | ccgcgggcga  | agaccgggcc  | 1620 |
| gcgggtggta | ccggccgggc | gggttcgcgc  | ggcaagctcg | tctgggtctt  | cccaccactc  | 1680 |
| gacactcacg | ccgttcacgt | acaggtgagc  | cagggcaccg | acagcggcct  | gcgcctcatg  | 1740 |
| gtcaccgtgc | agcatcgcga | tgccatcgac  | caggcgggcc | agtgaccggg  | cggcaccacg  | 1800 |
| ctcgacgaac | accgcctcct | cgaacgaggc  | cacctgctcg | ccgaaccgga  | ccgtgtcccc  | 1860 |
| gacctgcgcg | acccagtact | cagcgggtcat | cacctgatca | ccagcggcca  | tggcgacctg  | 1920 |
| cggcgctccg | taggtcaggg | cttcagcgac  | cggccggaac | tcctccagca  | tgggttccat  | 1980 |
| acgggcgga  | tggaaacggt | gactgggtcg  | cagccgcgtc | cacttcccca  | gccccctccg  | 2040 |
| ggcctgcagc | acggcggcct | catcaccgga  | gagaaccacc | gacgacggcc  | cgttgaccgc  | 2100 |
| ggcgatctcc | acacccctac | ccagcacggc  | ccgagcctca | tcctccgaga  | ccgggacagc  | 2160 |
| gaccatcacc | ccacccgcag | gcagagcctg  | catcagacga | gccccgcgcg  | acaccaaagt  | 2220 |
| gcaggcatcc | tccaacgacc | acaaccggga  | gacgtatccg | gcggcgagct  | caccgacaga  | 2280 |
| gtgaccgacc | accgcctccg | gccgtacacc  | ccacgattcc | agcaaccgga  | acagagccac  | 2340 |
| ctgcaaagcg | aacaggggcg | gctgggcata  | cccgggtctc | ttcacatcga  | gatcgggcac  | 2400 |
| atccagcaga | tcccacacct | gctgatggat  | ccgcgcgaag | acggggaaac  | cggcgccacg  | 2460 |
| ttcctcacc  | ataccagcac | gctgcgaccc  | tggccagccg | gctgggcata  | cccgggtctc  | 2520 |
| ttcacatrga | gatcgggcac | atccagcaga  | tcccacacct | gctgatggat  | ccgcgcgaag  | 2580 |
| acggggaaac | cggcgggcaa | gttcctcacc  | cataccagca | cgtgcgggac  | ccctggccag  | 2640 |
| ggaataccga | ggcggaccgg | ccgggtcgac  | ctgccgaagt | acgccttcga  | ccaccggcac  | 2700 |
| tactggctgc | ggccccgcga | gtccgcgacc  | gacgcgggtt | cgtggggcca  | gggggcggcc  | 2760 |
| gaccacccgt | tgctggggcg | ggtcgtcgag  | ctgccgcagt | ccgacggcct  | ggtgttcacc  | 2820 |
| tcgcggctgt | ccgtgcggac | gcacccgtgg  | ctggccgacc | acgcgggtcg  | tggcgtggtc  | 2880 |
| atcctccccg | gctccgggct | ggccgaacct  | gccgtccggg | ccggcgacga  | agccgggtgc  | 2940 |
| accgcccccg | acgagctgat | tatcgaagct  | ccgctgggtc | tgccccccca  | aggcgcggtc  | 3000 |
| cgcgtccagg | tcgcgttgag | cggccccgac  | gagaccggct | cgcgcacggg  | ggacctctac  | 3060 |
| tcccagcgcg | acggcgggcg | ggggacgtgg  | acgcggcacg | ccaccggcgt  | gccgtcgacg  | 3120 |
| gcccccgctc | aggaacccga | gttcgacttc  | cacgcctggc | cgccccggga  | tggcgagcgg  | 3180 |
| atcgacgtcg | agaccttcta | caccgacctg  | gccgagcgtg | gttacggcta  | cgggcccggc  | 3240 |
| ttccaggggc | tgcaagcggg | gtggcgggcg  | gacggcgatg | tcttcgcccga | ggtcgcctcg  | 3300 |

[0239]

|            |             |             |            |            |             |      |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| cccgaggacc | tgcgcaagga  | cgcgggcccgg | ttcggcgctc | acccggcgct | gctcgacgcg  | 3360 |
| gcgctgcagg | ccgccacggc  | cgtgggcccgc | gacgagcccg | gtcagccggg | gctggcgctc  | 3420 |
| gcgtggaacg | gcctgggtcct | gcacgcgcgc  | ggcgcgctcg | ccctgcgggt | ccggctcgcg  | 3480 |
| ccgagcggcc | cggacacgct  | gtccgtggca  | gccgccgacg | aaaccggcgg | cttgggtcctg | 3540 |
| accatggaat | cgtgtgtctc  | ccggccgggt  | tgggccgagc | agctcggcgc | cgcggccgac  | 3600 |
| gcgggccacg | acgcgatgtt  | ccgcgtcgac  | tggaccgagc | tgcctgccgt | gccccgcgcg  | 3660 |
| gaactgccgc | cgtgggtgcg  | gacgcacacc  | gccgacgacg | tcgcggcctt | ggcggagaag  | 3720 |
| gcggacgcac | caccgggtgt  | ggctctggga  | gccgccgggg | gagaccgggc | cctggccgtg  | 3780 |
| agttcccggg | tgctcgagat  | catgcaggcc  | tggctggccg | cgcccgcggt | cgaggaggcc  | 3840 |
| cggctgggtc | tgacgacccg  | cggcgcggtg  | cccgccggcg | gtgaccacac | actgaccgac  | 3900 |
| ccggccgcgc | ccgcgggtgt  | gggcctgggt  | cggctccgcg | aggcgggaac | cccggaccgg  | 3960 |
| gtcgtcctgc | tggacaccga  | cggcgaagtt  | ccgctgggcg | cggctgctgg | ctccggtgag  | 4020 |
| ccgcagctcg | cgggtgcgcg  | aacgacgttc  | ttcgtgcccc | ggctggcccc | cgccacccgg  | 4080 |
| ctctcggacg | cgcctcctgc  | gttcgacccg  | gacgggaccg | tgctgggtct | gggcgcccga  | 4140 |
| tcgctgggca | cct         |             |            |            |             | 4153 |

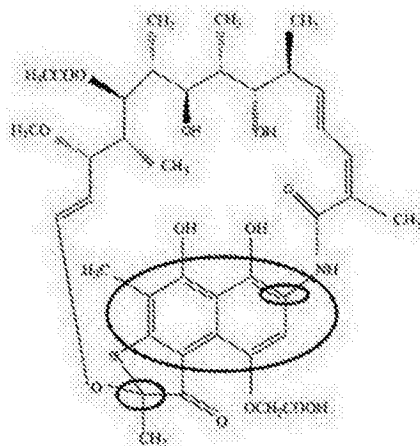


图 1

图 1:利福霉素 B 的化学结构。侧链在 C-2 和 C-12 处连接萘部位 (黑色圈出)。萘部位 (黑色圈出) 向化合物赋予微红棕色。

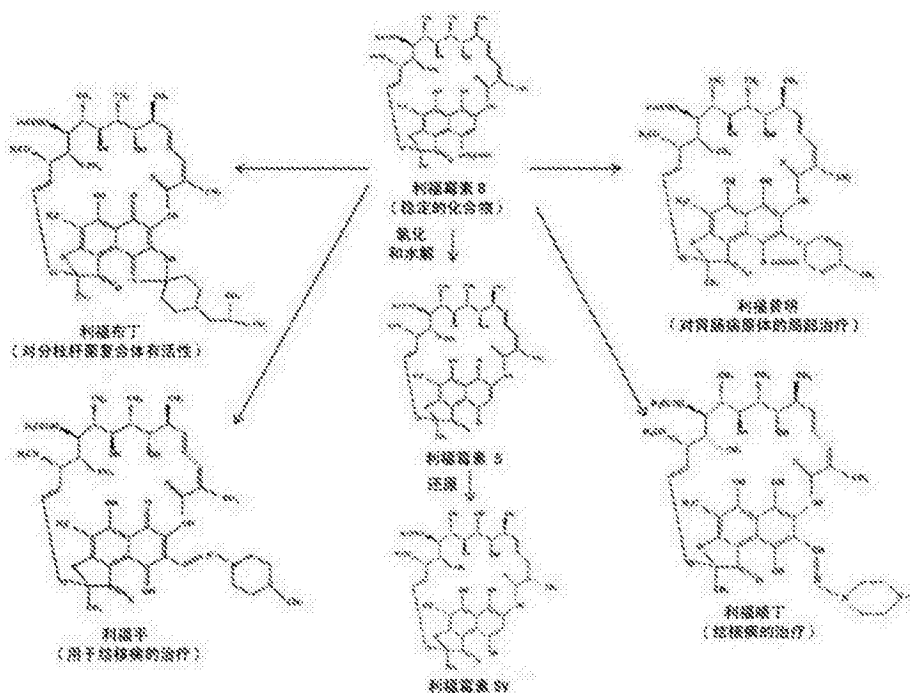


图 2

图 2:当前市场上供临床使用的利福霉素 B 的半合成衍生物。利福霉素分子的复杂性仅允许在碳骨架的 C-3 和 C-4 修饰,并因此修饰限于利福霉素 B 的这些位置。据我们所知,没有进一步的具有强抗生素活性的利福霉素衍生物 (除了图 2 中提及的以外) 能够通过化学修饰而产生。这在利福霉素类似物的生产中造成瓶颈。

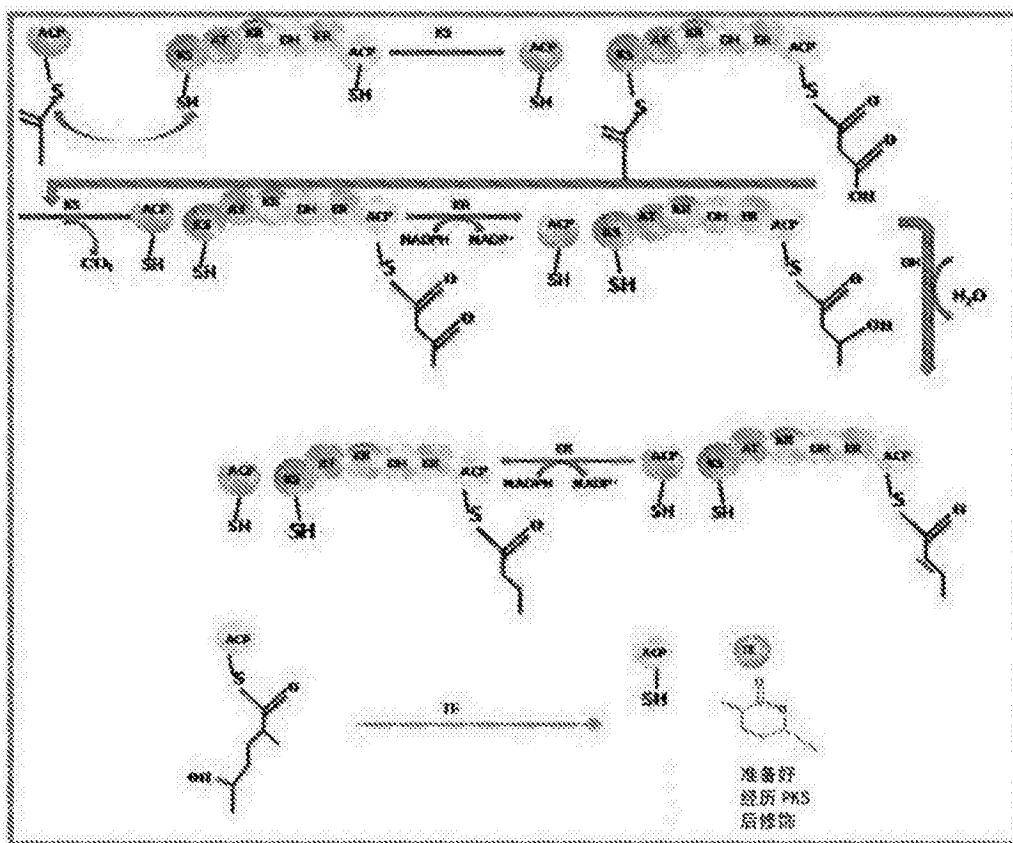


图 3

图 3 :I 型 PKS 进行性机理的图示。开始单元 (乙酰辅酶 A) 加载到由起始模块的 AT 结构域催化的 ACP 上。延伸链从先前模块的 ACP 结构域交给当前模块的 KS 结构域。延伸单元加载到由 AT 结构域催化的当前 ACP 结构域上。KS 结合延伸单元通过脱羧和克氏缩合与 ACP 结合延伸单元反应。生长中的聚酮链可任选地被另外的结构域修饰。KR 结构域将  $\beta$  酮基还原为羟基。DH 结构域消去一分子水以给出双键。ER 结构域将双键还原为饱和烃链。然后碳骨架通过 TE 结构域的水解作用从 PKS 释放。

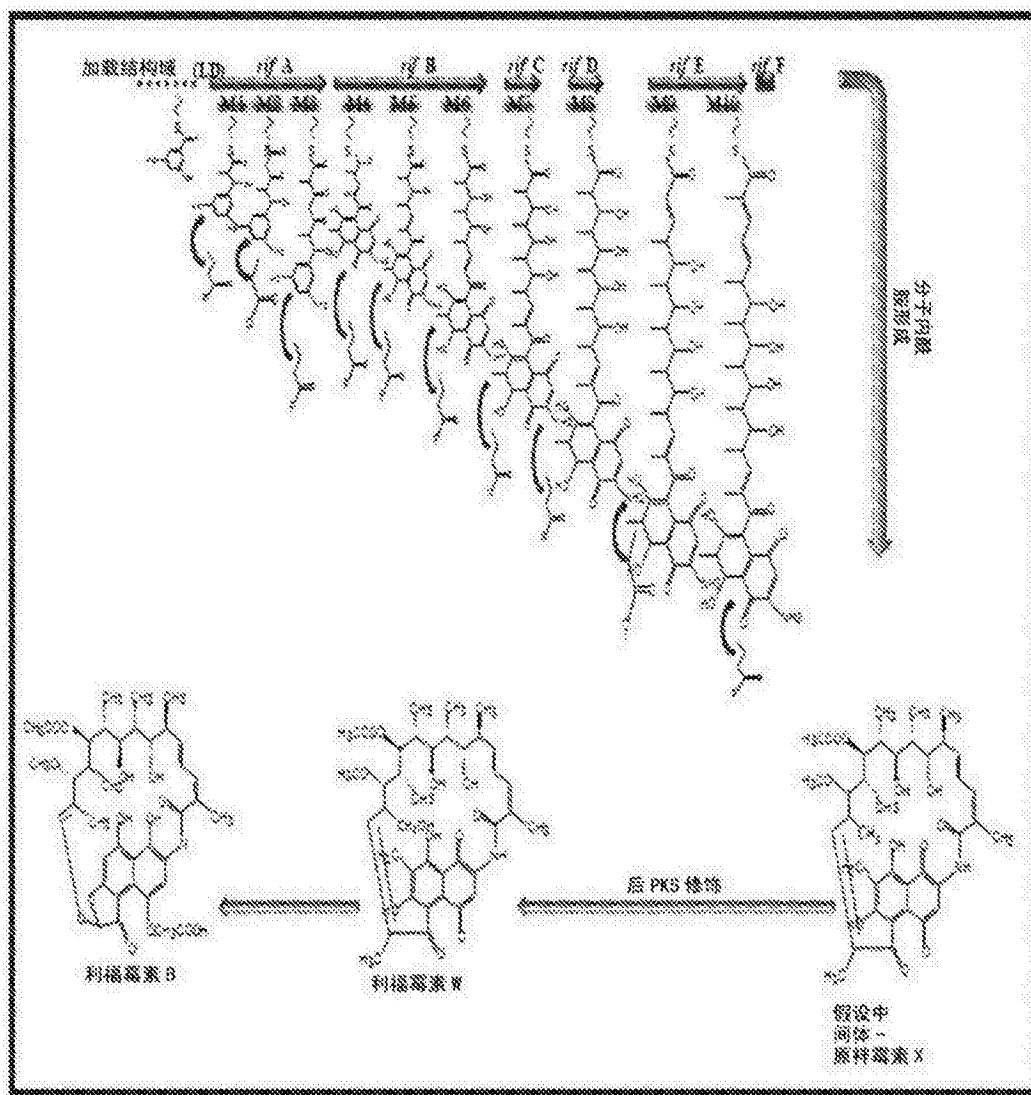


图 4

图 4:在利福霉素 B 的生物合成时通过利福霉素 PKS 区域 II 的假设中间体的合成。链由起始单元 (AHBA)、2 个乙酸酯和 8 个丙酸酯延伸单元组成。Rif F 与翻译地 Rif E 偶联,并替代 TE 结构域的功能。其编码酰胺合酶并由此替换装配的聚酮链的硫酯酶键合。然后原样霉素 X 经历后 PKS 修饰而形成利福霉素 B。

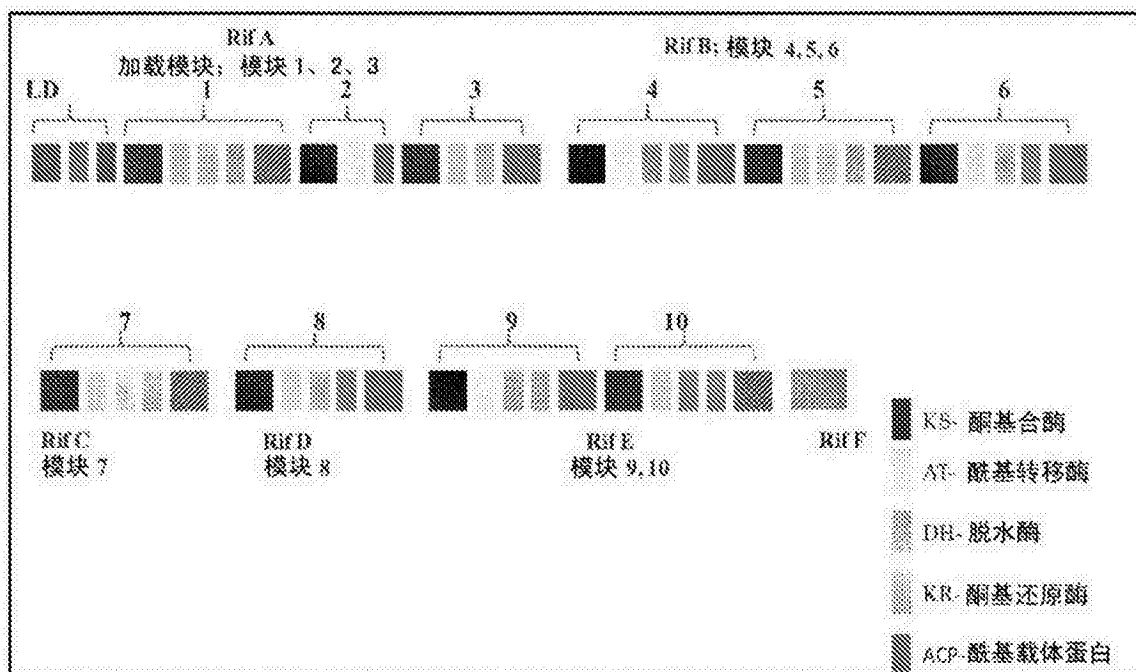


图 5

图 5 :rifPKS 基因簇中酶结构域的组织。结构域按线性形式排列而形成模块,其依次形成 5 个大型开放读码框。Rif A 具有模块 1-3,Rif B 具有模块 4-6,Rif C 具有模块 7,Rif D 具有模块 8,Rif E 具有模块 9 和 10。Rif F 位于 Rif E 的下游。加载单元在模块 1 之前。各结构域用颜色编码。暗色的框表示非活性结构域。模块 3 的 KR 结构域和模块 1、3、5、6、7 和 8 的 DH 结构域是非活性的。模块 2 和 9 的 AT 结构域催化乙酸酯延伸单元的并入,而其余 AT 结构域将丙酸酯延伸单元并入生长中的聚酮链。

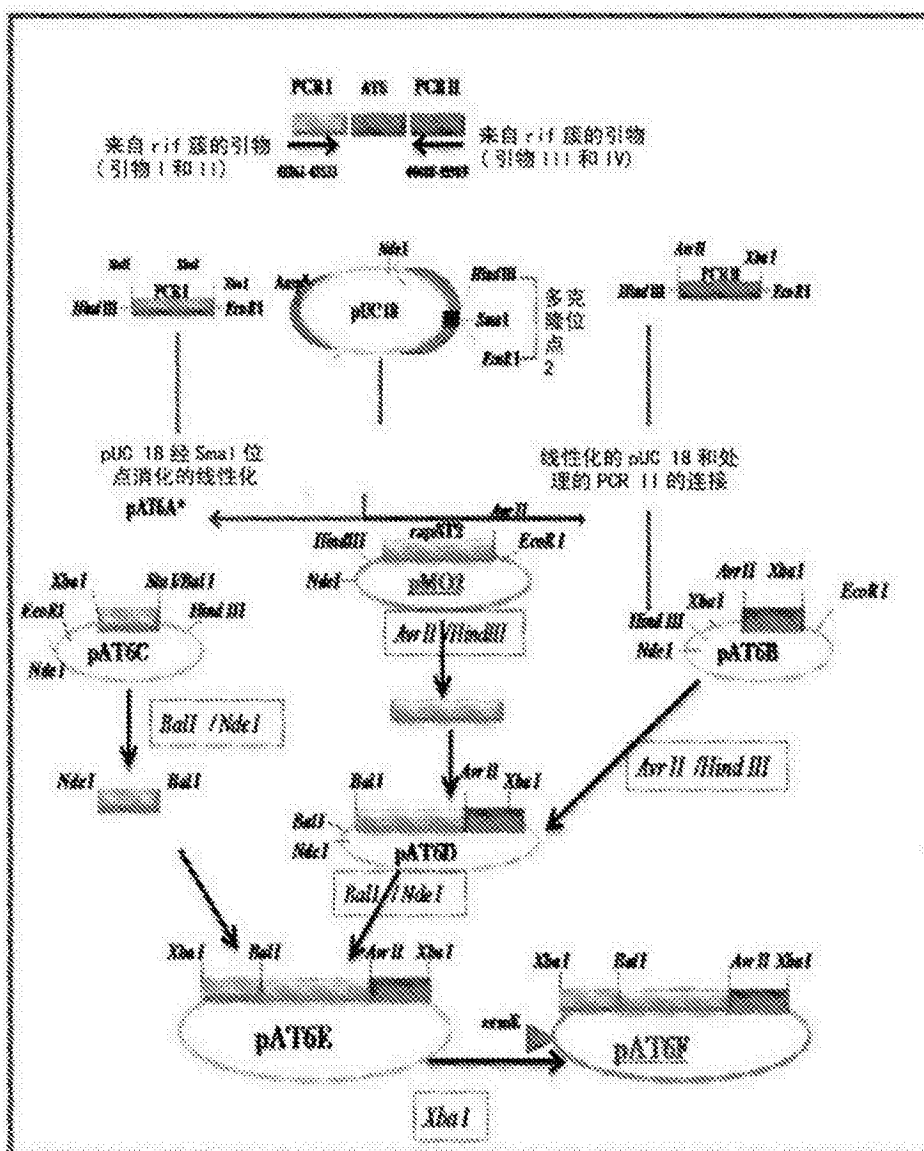


图 6

图 6: 质粒 pIJ4026 中功能性盒的构建策略, 该质粒电穿孔进入地中海拟无枝酸菌, 以便使用 rapAT2 交换 rifAT6。分别用引物对 I、II 和引物对 III、IV 扩增紧接的上游 (41862-43533bp-PCR I) 和下游 (44888-45989bp-PCR II) 侧翼区域。PCR I 和 PCR II 克隆入 pUC18, 并分别命名为 pAT6A\* 和 pAT6B。从 pAT6A\* 切下 PCR I, 并连接在 pUC19 中, 以得到 pAT6C。消化质粒 pMO2 以释放 rapAT2, 连接在线性化的 pAT6B 中形成 pAT6D。消化来自 pAT6C 的 PCR I 并连接入线性化的 pAT6D 中, 形成质粒 pAT6E。从 pAT6E 消化整个构建体 PCR I+rapAT2+PCR II, 并最终克隆在质粒 pIJ4026 中, 其将红霉素抗性赋予宿主有机体地中海拟无枝酸菌。此终构建体 pAT6F 转化入野生型菌株 (地中海拟无枝酸菌 S699)。pAT6A\*-pAT6A 向 pAT6C 的详细转换未示出。

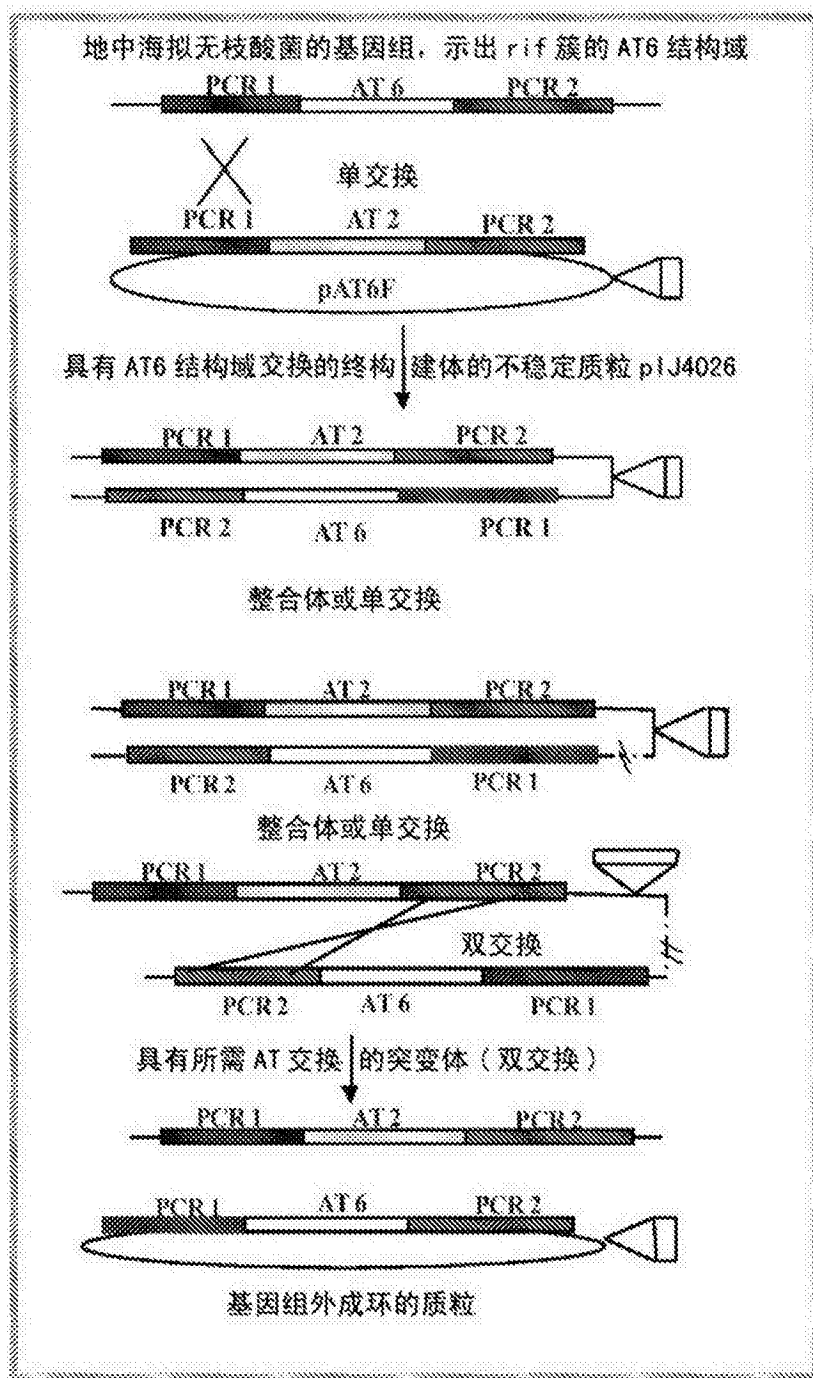


图 7

图 7:策略的图示,示出通过两步同源重组将 *rifAT6* 与 *rapAT2* 交换,导致发展出产生 24-脱甲基利福霉素 B 的地中海拟无枝酸菌 S699 突变体 3、34 和 36。

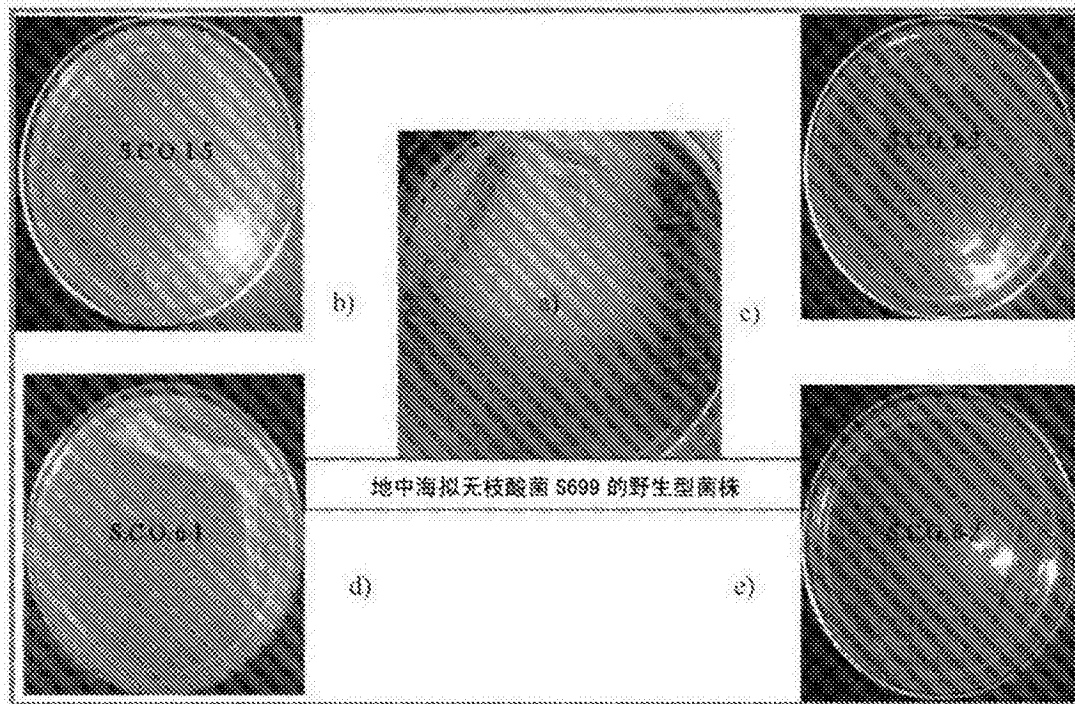


图 8

图 8 :研究中从地中海拟无枝酸菌 S699 产生的四个单交换克隆 (b) 1-5、(c) 2-2、(d) 6-1 和 (e) 6-2。SCO 周围未见着色,指示由于利福霉素生物合成通路被阻断,没有利福霉素产生。

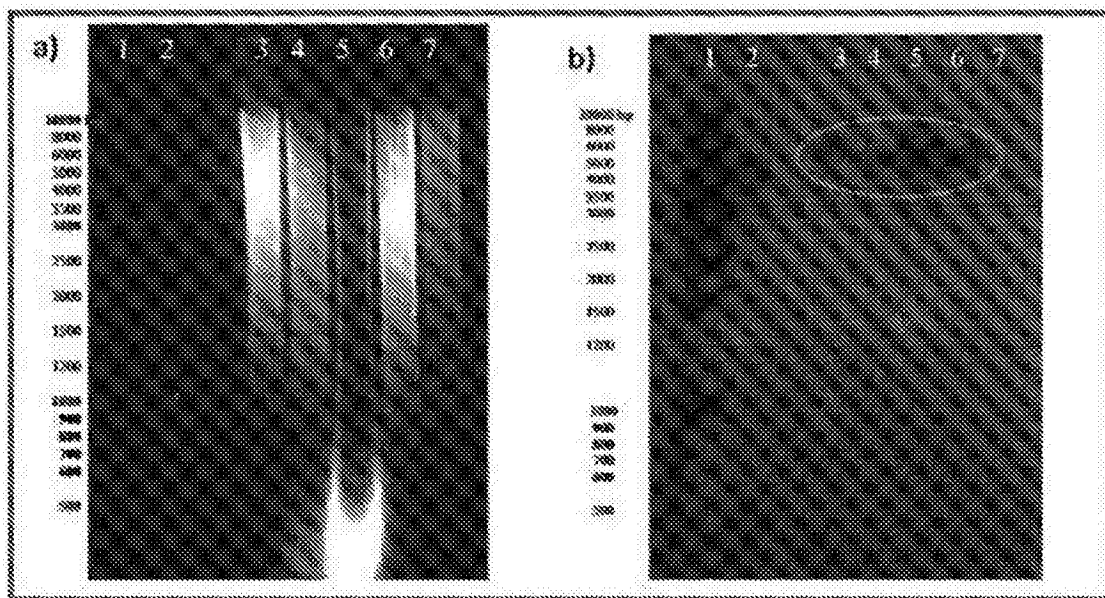


图 9

图 9 :a) BamHI 消化的 S. C. O. 克隆的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱。泳道 1- 基因标尺 (MBI Fermentas#SM0331), 泳道 2-BamHI 消化的 pIJ4026 (阳性对照), 泳道 3-6-BamHI 消化的 S. C. O. 1-5、2-2、6-1 和 6-2, 泳道 7-BamHI 消化的地中海拟无枝酸菌 S699 的 DNA。b) BamHI 消化的 4 个 S. C. O. 克隆的 DNA 用  $[\alpha -^{32}\text{p}]$ -dATP 标记的 pIJ4026 探测, 相应的 DNA 印迹杂交图谱。泳道 1- 基因标尺 (MBI Fermentas#SM0331), 泳道 2-BamHI 消化的 pIJ4026 (阳性对照), 泳道 3-6-BamHI 消化的 S. C. O. 1-5、2-2、6-1 和 6-2, 泳道 7-BamHI 消化的地中海拟无枝酸菌 S699 的 DNA。在所有 4 个 S. C. O. 中获得信号, 但在 BamHI 消化的地中海拟无枝酸菌 S699 的 DNA (阴性对照) 中未见信号。

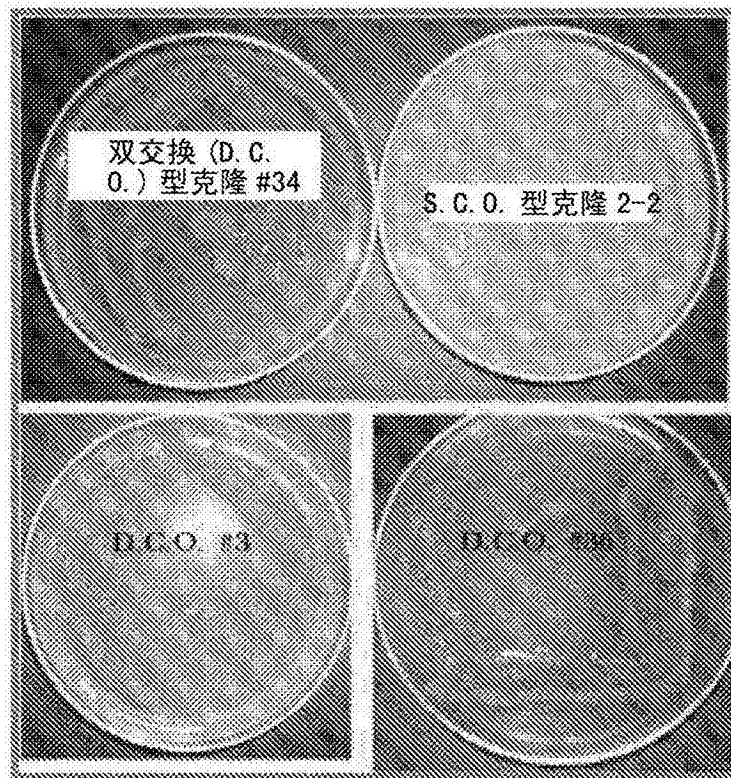


图 10

图 10 :从单交换 (SCO) 型克隆 2-2 产生的 3 个阳性双交换型克隆 (#3、#34 和 #36)。在培养物周围见到着色, 其指示 AT6 与 AT2 交换之后, 利福霉素的产生恢复。

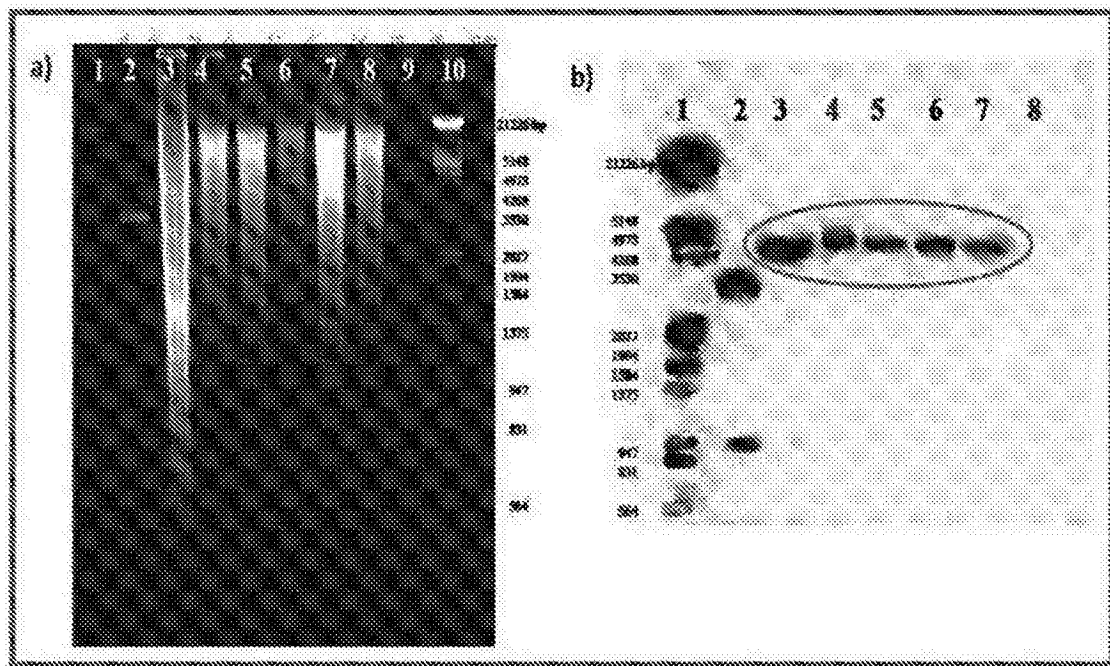


图 11

图 11 :BamHI 消化的 S. C. O. 2-2 的 D. C. O. 型克隆的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱。泳道 1- 标记, EcoRI/HindIII 消化的  $\lambda$  DNA(kb) (MBI Fermentas#SM0191), 泳道 2-EcoRI 和 HindIII 消化的 pM02, 泳道 3-7 分别有 S. C. O. 2-2, D. C. O. #3、#34、#36 和 #43, 泳道 8- 地中海拟无枝酸菌 S699(野生型), 泳道 10- 标记, EcoRI/HindIII 消化的  $\lambda$  DNA(kb) (MBI Fermentas#SM0191)。b) BamHI 消化的 4 个 D. C. O. 型克隆的 DNA 用 DIG-dUTP 标记的 rapAT2 探测, 相应的 DNA 印迹杂交的图谱。泳道 1- 标记, EcoRI/HindIII 消化的  $\lambda$  DNA(kb) (MBI Fermentas#SM0191), 泳道 2-EcoRI 和 HindIII 消化的 pM02, 泳道 3-7 分别有 S. C. O. 2-2, D. C. O. #3、#34、#36 和 #43, 泳道 8- 地中海拟无枝酸菌 S699(野生型), 泳道 10- 标记, EcoRI/HindIII 消化的  $\lambda$  DNA(kb) (MBI Fermentas#SM0191)。阳性信号在 S. C. O. 2-2 和所有 D. C. O. 型克隆中获得 (红色圈出)。

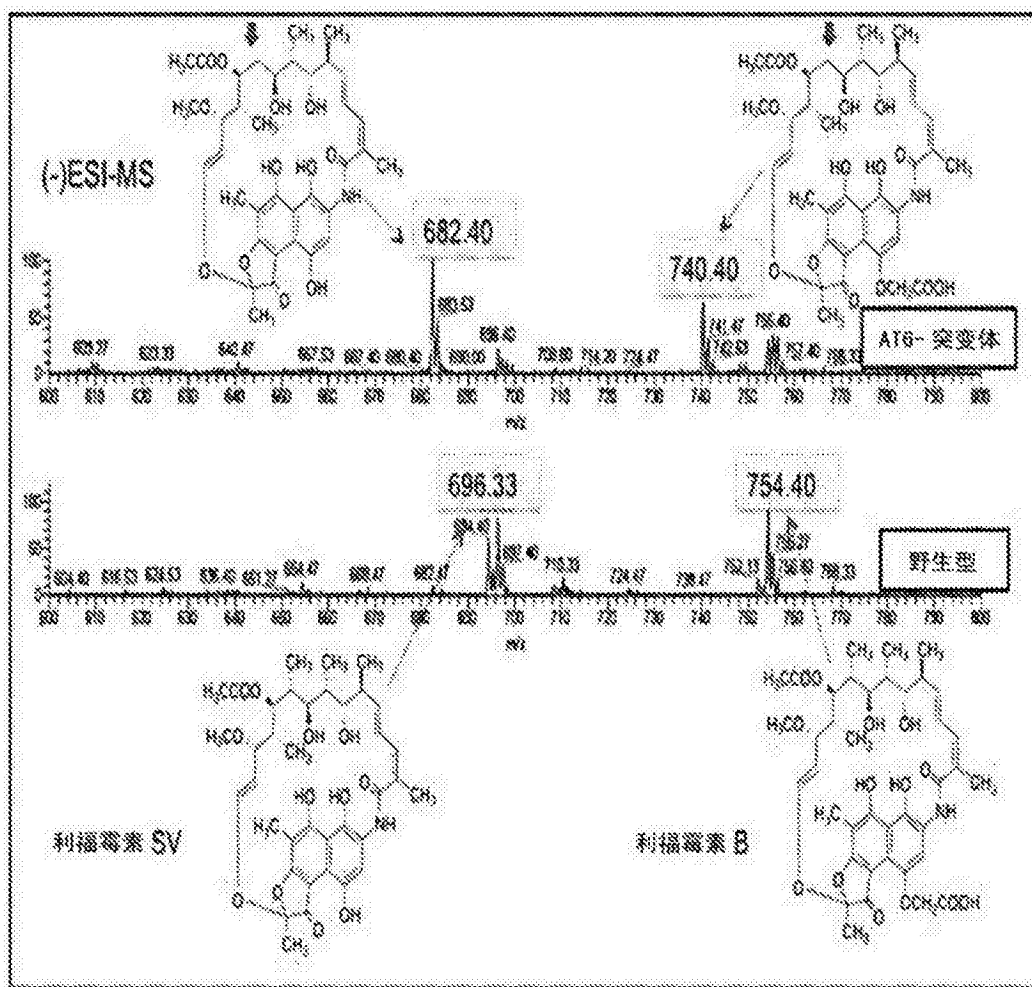


图 12

图 12: 从 DC0#36 提取的类似物 24- 脱甲基利福霉素 B 和利福霉素 B 天然分子的 LC-ESI-MS 图谱。同样突出显示的是利福霉素 SV, 即利福霉素 B 生物合成通路中的中间体以及其相对物脱甲基利福霉素 SV 的峰。

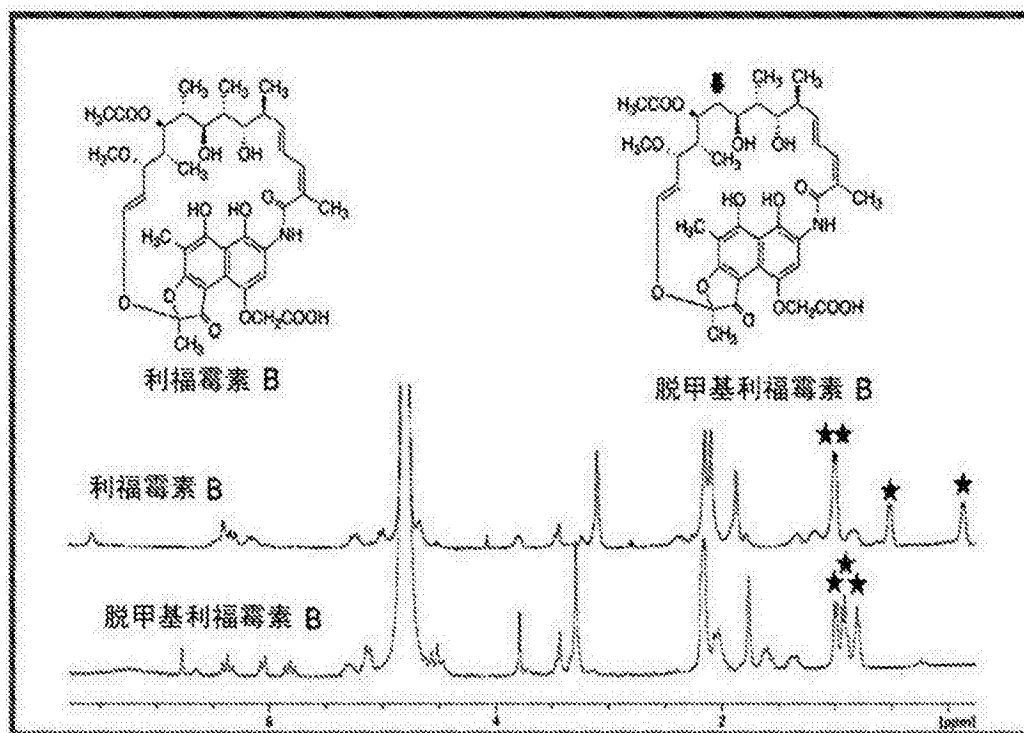


图 13

图 13 :利福霉素 B 及其类似物的 NMR 结果。类似物显示甲基信号组的缺失。这是由于 C-33 侧面的甲基的丢失。

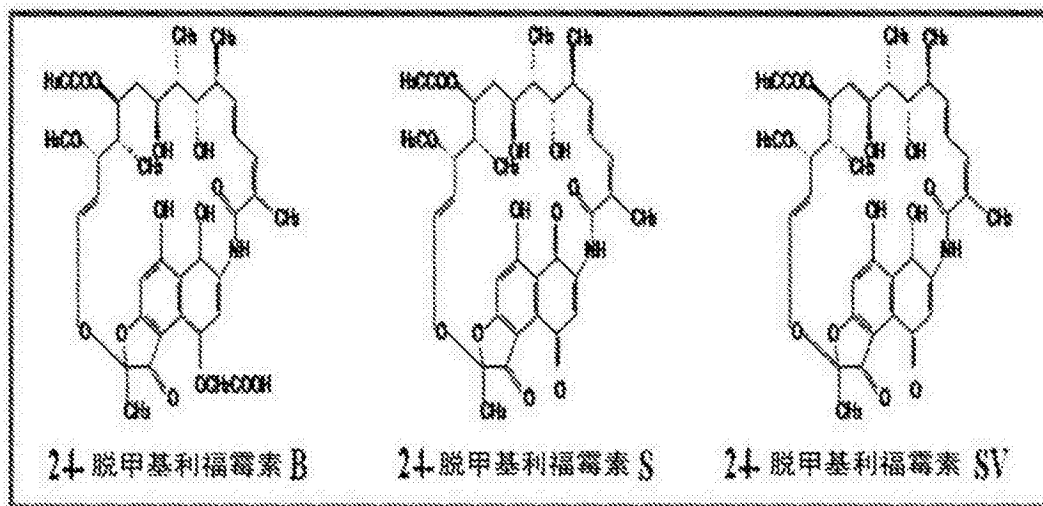


图 14

图 14 :24- 脱甲基利福霉素 B、24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福霉素 SV 的结构

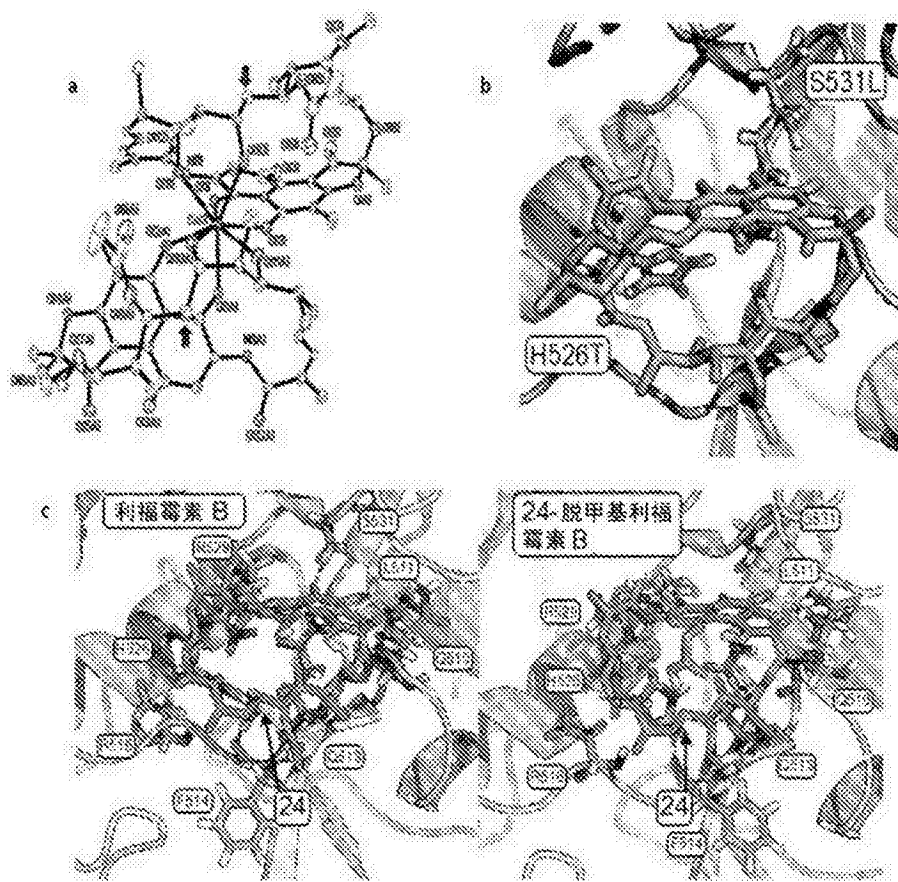


图 15

图 15 :24- 脱甲基利福霉素 S 的晶体结构和与 RNA 聚合酶的药物相互作用 (a) 与  $\text{Ca}^{2+}$  的复合物中的 24- 脱甲基利福霉素 S 二聚体的 X- 射线晶体结构。粗红色箭头指出缺失的甲基。(b) 示出 Ser 向 Leu 以及 His 向 Thr 的 RNAP 耐药突变,破坏氢键网络并诱导空间相互作用。(c) 示出在具有明确的极性相互作用的结合袋中利福霉素 B 和 24- 脱甲基利福霉素 B 的比较。

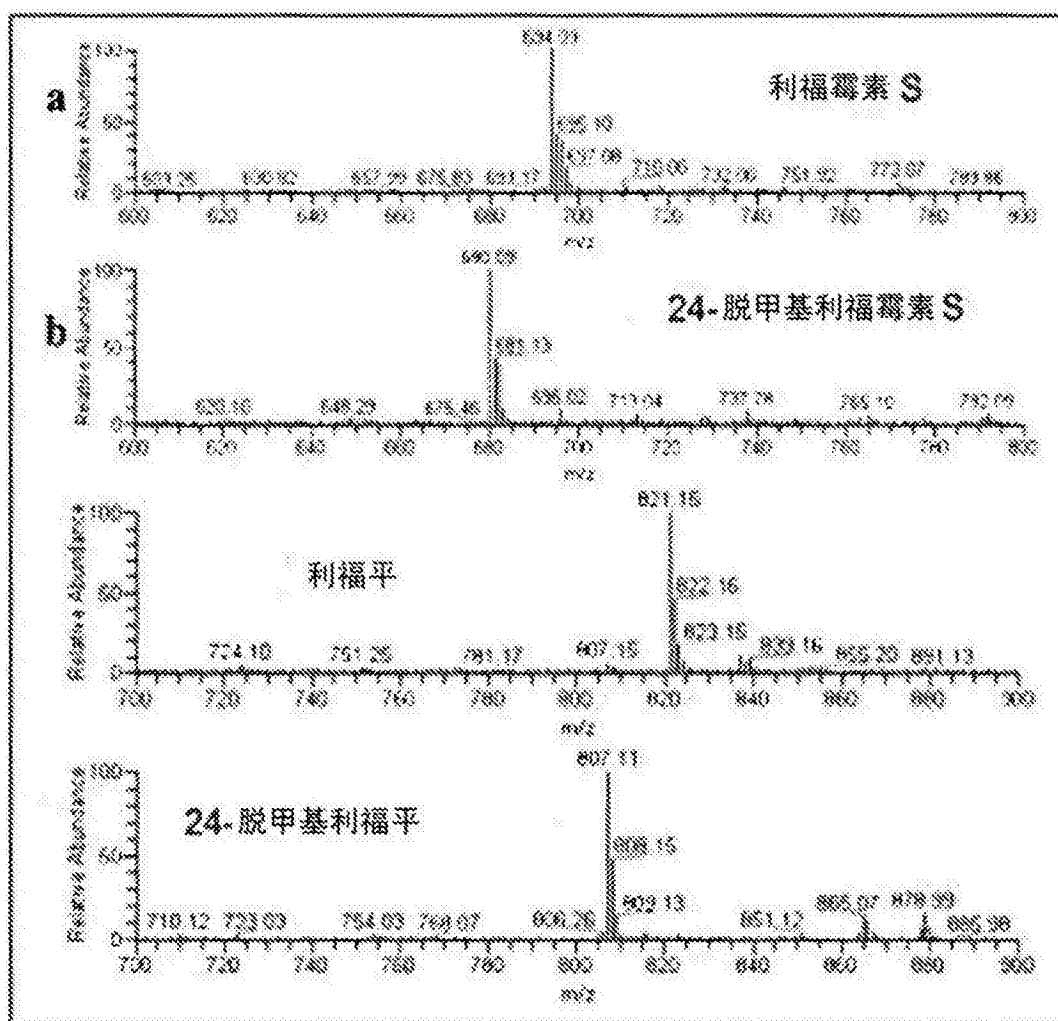


图 16

图 16 : (a) 利福霉素 S、(b) 24-脱甲基利福霉素 S、(c) 利福平、(d) 脱甲基利福平的 (-)-ESI-MS 谱。

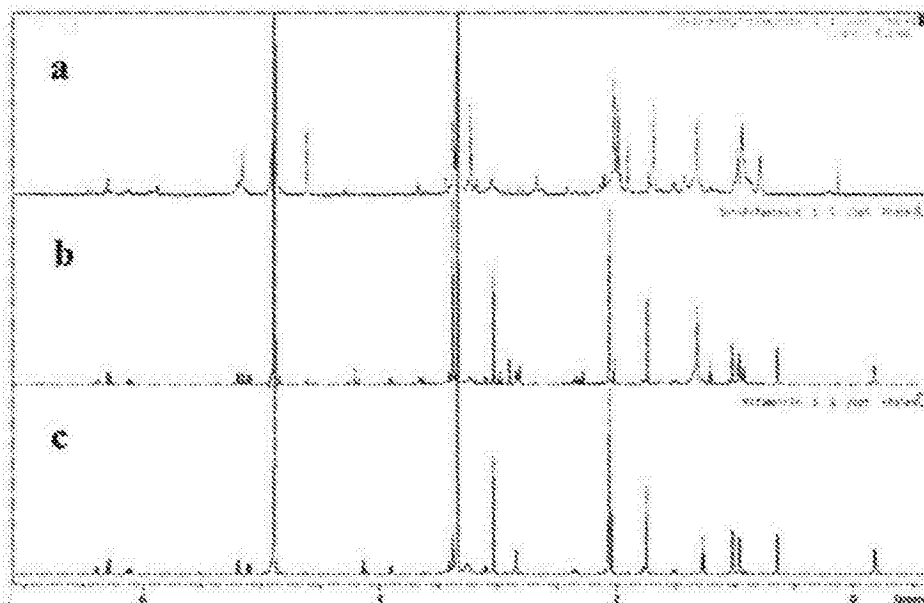


图 17

图 17 : (a) 24-脱甲基利福平、(b) 化学合成的利福平、(c) 商购的利福平的  $^1\text{H}$  NMR 谱。

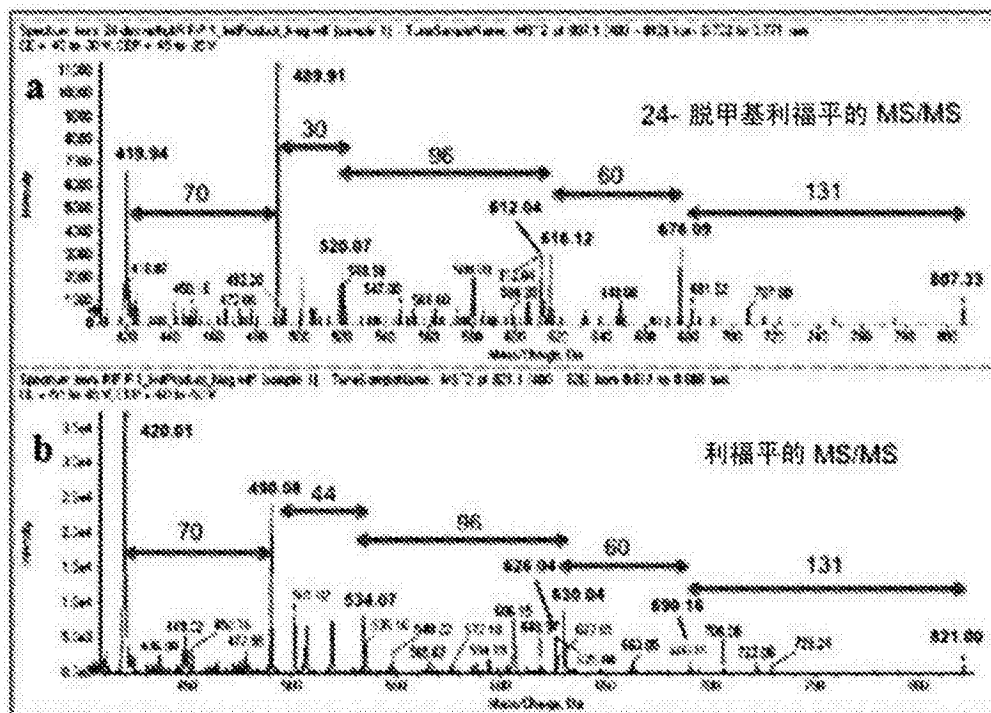


图 18

图 18 : (a) 24-脱甲基利福平和 (b) 利福平的比较 MS/MS 分析。

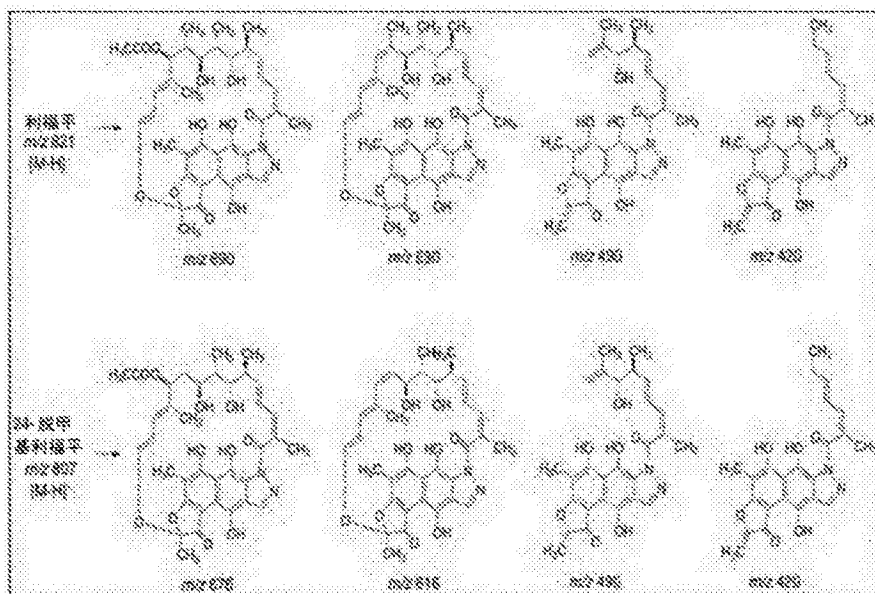


图 19

图 19 :利福平和 24- 脱甲基利福平在 ESI 阴离子模式中的特征性 MS 碎片。

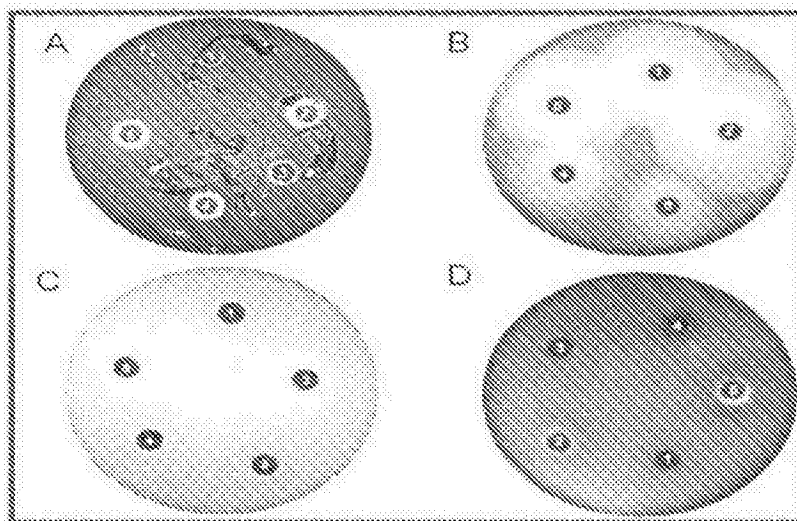


图 20

图 20 :新型利福霉素类似物的抗菌活性结果。(A) 耻垢分枝杆菌, (B) 金黄色葡萄球菌, (C) 枯草芽孢杆菌和 (D) 大肠杆菌。盘添加有 20  $\mu$  L 的 1mg/mL 的各化合物 : (1) 利福霉素 B, (2) 利福霉素 SV, (3) 24- 脱甲基利福霉素 SV, (4) 24- 脱甲基利福霉素 S 和 (5) 利福平。

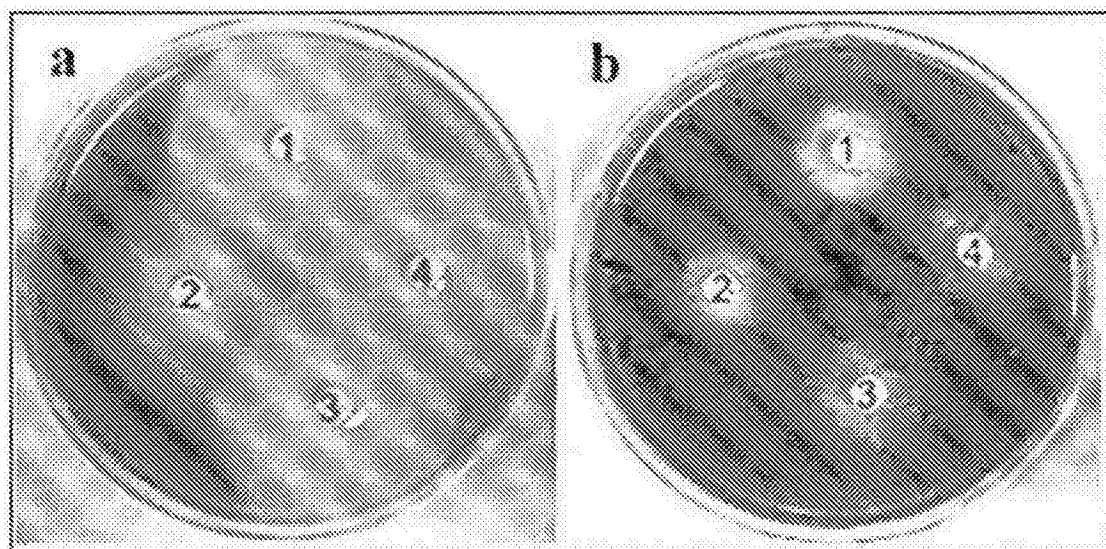


图 21

图 21 :利福霉素 S、利福平、24- 脱甲基利福霉素 S 和 24- 脱甲基利福平抗 : (a) 金黄色葡萄球菌, (b) 耻垢分枝杆菌的琼脂扩散试验。(1) 利福霉素 S, (2) 利福平, (3) 24- 脱甲基利福霉素 S, (4) 24- 脱甲基利福平。

图 22

50