

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 18 日 (18.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/119773 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 17/08 (2006.01) *A61K 38/04* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/124970

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 13 日 (13.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811521926.X 2018 年 12 月 13 日 (13.12.2018) CN

(71) 申请人: 上海医药工业研究院
(SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL
INDUSTRY) [CN/CN]; 中国上海市北京西路
1320 号, Shanghai 200040 (CN)。正大天晴药
业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING
PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN];
中国江苏省连云港市郁州南路 369 号, Jiangsu
222062 (CN)。上海多米瑞生物技术有限
公司 (SHANGHAI DUOMIRUI BIOTECHNOLOGY
LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国
(上海) 自由贸易试验区张衡路 1559 号 1
幢 2B15, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 东圆珍 (DONG, Yuanzhen); 中国上海市
浦东新区中国 (上海) 自由贸易试验区张衡
路 1559 号, Shanghai 201203 (CN)。冯军 (FENG,
Jun); 中国上海市浦东新区张江高科技园区
哥白尼路 285 号, Shanghai 201203 (CN)。张喜
全 (ZHANG, Xiquan); 中国江苏省南京市江宁区
福英路 1099 号 (江宁高新园), Jiangsu 211100
(CN)。张金华 (ZHANG, Jinhua); 中国上海市
浦东新区张江高科技园区哥白尼路 285 号,
Shanghai 201203 (CN)。赵文杰 (ZHAO, Wenjie);
中国上海市浦东新区张江高科技园区哥白
尼路 285 号, Shanghai 201203 (CN)。朱冰 (ZHU,
Bing); 中国上海市浦东新区张江高科技园区哥
白尼路 285 号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限
责任公司 (BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL

PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区知春路 9 号
坤讯大厦 1106 室, Beijing 100191 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) Title: AMPHOTERICIN B PEPTIDE DERIVATIVE

(54) 发明名称: 两性霉素 B 肽衍生物

(57) Abstract: The present disclosure relates to the field of medicine, and specifically relates to an amphotericin B peptide derivative and a preparation method therefor. The amphotericin B peptide derivative has a broad-spectrum and highly effective bactericidal effect on drug-resistant bacteria and fungi.

(57) 摘要: 属于医药领域, 具体涉及两性霉素 B 肽衍生物及其制备方法。所述两性霉素 B 肽衍生物对耐药细菌、真菌具有广谱、高效的杀菌效果。

WO 2020/119773 A1

两性霉素 B 肽衍生物

技术领域

本发明属于医药领域，涉及到两性霉素 B 肽衍生物及其制备方法与应用，具体而言涉及到一系列具有较高溶解性、低毒性、较好抗菌活性的两性霉素 B 肽衍生物及其合成制备与应用。

背景技术

两性霉素 B (Amphotericin B, AMB) 是一种多烯类广谱抗真菌药, 适用于下列真菌感染疾病的治疗: 念珠菌病 (Candidiasis)、隐球菌病 (Cryptococcosis)、芽生菌病 (Blastomycosis)、球孢子菌病 (Coccidioidomycosis), 由毛霉菌 (*Mucor*) 所致的毛霉菌病 (mucormycosis), 由孢子丝菌 (*Sporothrix*) 引起的孢子丝菌病 (Sporotrichosis), 由大部分曲霉菌 (*Aspergillus*) 所致的曲霉菌病 (aspergillosis) 等。

自 1955 年从链霉菌属代谢物中分离得到两性霉素 B 以来,该化合物就备受瞩目。一方面,两性霉素 B 是临床上治疗深部真菌感染及全身系统性感染的金标准,并且对于某些致命性全身真菌感染,它是唯一有效的治疗药物;另一方面,在治疗剂量时,两性霉素 B 有比较严重的毒副作用,例如溶血毒性、肾毒性、神经系统毒性等,而且两性霉素 B 水溶解性极差,口服该品后自胃肠道吸收少且不稳定,因此临床上两性霉素 B 的应用受到了极大的限制。

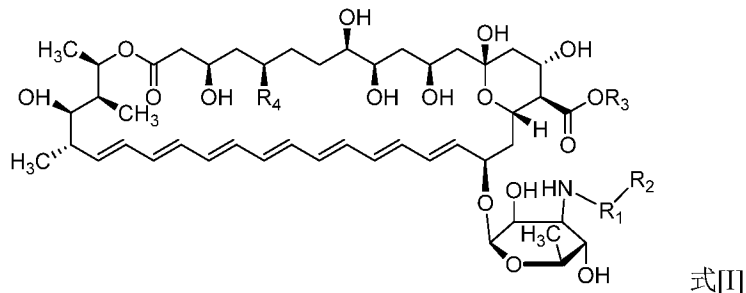
虽然研究表明,作为药物载体的脂质体可以显著降低两性霉素 B 的毒副作用,两性霉素 B 脂质体是利用磷脂双分子层膜形成的囊泡包裹药物分子而制成的具有靶向给药功能的新型药物,较普通制剂具有更好的耐受性,一方面它可以较多地分布在肝、脾、肺,而在其它脏器尤其在肾组织内的浓度较低,另一方面,脂质体中的胆固醇成分可降低药物与人体细胞中胆固醇的结合而增强对真菌细胞麦角固醇的结合,对肾脏等的副作用相对较小。但是两性霉素 B 脂质体类制剂也存在如下的缺点:一、脂质体类制剂的抗菌活性差于两性霉素 B,需要加大治疗剂量,二、脂质体类制剂成本较高,价格比较昂贵,三、脂质体本身的不稳定性,四、脂质体类制剂并没有从根本上消除两性霉素 B 的肾毒性等毒副作用。

鉴于两性霉素B所述的特点及两性霉素B化学结构改造的历史,结合发明人掌握的固相合成多肽技术:以两性霉素B为先导化合物,采用固相和液相联合的实验方法,对两性霉素B进行接肽反应,合成一系列两性霉素B肽衍生物,包括H-(Gly)_n-OH或由AEEAc与Gly组合而成的亲水性(n为整数,范围为2-10)系列的两性霉素B肽衍生物,在保留其抗菌活性的同时,提高其水溶性,甚至进一步降低其溶血毒性、肾毒性等毒副作用。

发明内容

一方面, 本发明涉及两性霉素 B 肽衍生物及其合成制备方法与应用, 具体而言涉及到改善两性霉素 B 溶解性, 降低两性霉素 B 毒性, 但同时保留两性霉素 B 抗菌活性的两性霉素 B 肽衍生物及其合成制备方法与应用。该两性霉素 B 肽衍生物特指: 以 R_2 -AEEAc-OH 及 R_2 -Gly-OH 为原料, 采用固相合成的方式, 合成 R_2 -(Gly) n -OH 或 AEEAc 与 Gly 组合而成的系列化合物, 然后通过酰胺键与两性霉素 B 进行偶联, 最后脱除氨基保护基, 再经过纯化即可得到目标化合物。

一方面，本发明涉及通式为II的化合物或其衍生物：



其中, R₁ 为亲水性多聚物部分; R₂ 为 Fmoc、Boc 等氨基保护基或 H; R₃ 为 H 或 C₁₋₄ 烷基或苯基; R₄ 为 OH 或 H; 可供选择地, 亲水性多聚物部分可以为含 H-Gly-OH 单体的 H-(Gly)_n-OH 多聚物的部分, 在这里 n 取 2-20 整数, 较优地, n 取 2-15 整数, 最优地, n 为 5; 亲水性多聚物部分也可为由 Gly 以及 AEEAc 通过肽键构成的多肽部分, 多肽部分的长度为 2-20 肽, 较优地为 2-15 肽, 最优地, 为 5 肽。

在一些方案中，本发明涉及到两性霉素 B 肽衍生物的合成制备方法。

在一些方案中，本发明涉及到该衍生物在保留抗真菌活性的同时，改善了溶解性，甚至进一步降低了毒性。

在一些方案中，本发明涉及到水溶性多肽化合物，包括但不限于 H-(Gly)*n*-OH 或 Gly 与 AEEAc 通过肽键构成的多肽。

在一些方案中, 本发明所指的两性霉素 B 衍生物是通过酰胺键连接的。

在一些方案中, 本发明所提到的两性霉素 B 衍生物包含: 水溶性的多肽部分, 该多肽部分通过一个稳定的酰胺键与两性霉素 B 上的糖胺结构相连, 因此该类化合物可以简称为两性霉素 B 多肽衍生物 (DTY-AMB)。在本发明中, 水溶性多肽指代 H-(Gly) n -OH 或 AEEAc 与 Gly 组合的多肽, 水溶性多肽部分是指相应的多肽中的末端氨基酸脱去 -OH 和 -H 之后形成的部分。

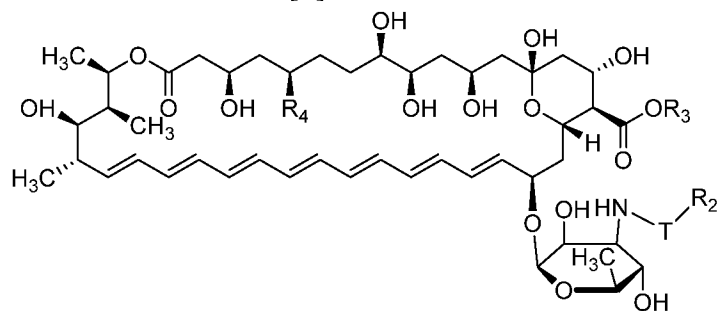
DTY-AMB 也包含 C₁₆ 上羧基被酯化的一类衍生物, 比如烃基类酯。T 是含有 Gly 或 Gly 衍生物、或由 AEEAc 及 Gly 构成的组合多肽及其衍生物的多聚物。

在一些优选方案中, R₁ 选自 -(Gly) n -、-(AEEAc) n -Gly-、-(AEEAc-Gly) n -AEEAc-、-AEEAc-Gly-、-(AEEAc-Gly) n -、-(Gly-AEEAc) n -Gly-、-(AEEAc) n -Gly-(AEEAc)m-、-(AEEAc) n -(Gly)m- 和 -(Gly) n -AEEAc-(Gly)m-, 其中, n 和 m 各自独立地为 2-9 的整数。优选地, R₁ 选自 -(AEEAc) n -Gly-、-(AEEAc-Gly) n -AEEAc-、-(AEEAc-Gly) n -、-(Gly-AEEAc) n -Gly- 和 -(AEEAc) n -Gly-(AEEAc)m-, 其中, n 和 m 各自独立地为 2-9 的整数且同时满足 R₁ 中的 AEEAc 的数量大于等于 3。

在一些优选方案中, R₂ 为 H。

在一些优选方案中, R₃ 为 H。

一方面, 本发明中 DTY-AMB 的结构为 [III]:



式 [III]

R₂ 为 Fmoc、Boc 等氨基保护基或者 H; R₃ 为 H 或 C₁₋₄ 烃基或苯基; R₄ 为 OH 或 H; 可供选择地, 亲水性多肽部分可以为 T (T 由 Gly 或 AEEAc 及 Gly 组合而成), 在这里 T 的长度范围为 2-10 肽, 较优地, 为 3-7 肽, 最优地, 为 5 肽。

在一些方案中, DTY-AMB 中亲水性多肽部分有不同的长度, 可能含有 2-20 个单体, 较优地, 含有 2-10 个单体, 最优地, 含有 5 个单体, 在本发明中, DTY-AMB 可以含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 个单体。该单体可能为 Gly、或 Gly 及 AEEAc。

在一些方案中, DTY-AMB 中亲水性多肽部分是 T, T 有不同的长度, 可能含有 2-10 个单体, 较优地, 含有 3-7 个单体, 最优地, 含有 5 个单体, 在一些具体实施方案中, DTY-AMB 可以含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个单体。该单体可能为 Gly、或 Gly 及 AEEAc。

在一些方案中, DTY-AMB 的 C₁₆ 位上含有一个游离羧基或者羧基的烃基酯, 包括甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、苯酯等。

本发明中, 含有亲水性多肽部分 T 的 DTY-AMB 具有较好的抑菌活性, 同时由于是通过酰胺键连接的而不易被酶水解。

另一方面, 本发明涉及式 [II] 的化合物或其衍生物, 其中: R₃ 为 H; R₂-T 选自:

H-AEEAc-Gly-,

H-Gly-Gly-,

H-AEEAc-AEEAc-Gly-,

H-(Gly)₅-,

H-AEEAc-AEEAc-Gly-Gly-Gly-,

H-Gly-Gly-AEEAc-Gly-Gly-,

H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-,

H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-,

H-AEEAc-AEEAc-Gly-AEEAc-AEEAc-,

H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-,

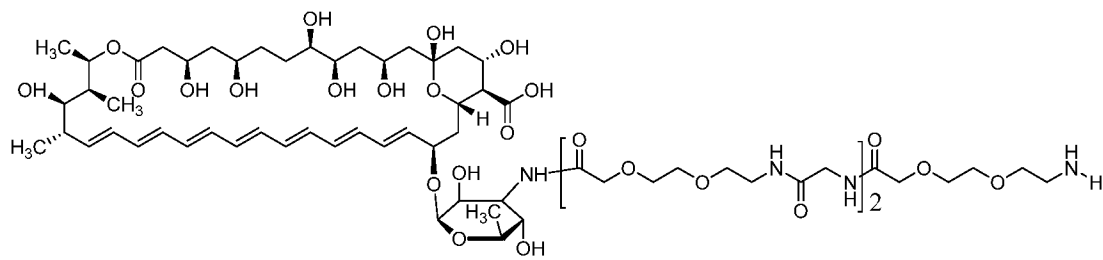
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-,

H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-, 或

H-(AEEAc)₉-Gly-。

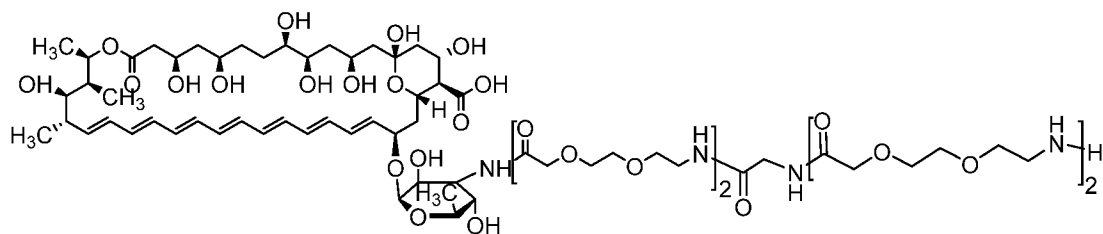
在一些方案中，本发明涉及式[III]的化合物或其衍生物，其中， R_3 为 H； R_2 -T- 为 H-AEEAc-X-Y-Z-AEEAc-；X 为 AEEAc 或 Gly，Y 为 AEEAc 或 Gly，且 Z 为 AEEAc 或 Gly。

在一些方案中，本发明涉及式[III]的化合物或其衍生物：



式[III]。

在一些方案中，本发明涉及式[IV]的化合物或其衍生物：



式[IV]。

在一些方案中，本发明的化合物是下式的化合物或其衍生物，其中肽修饰位点可以为 AMB 中的氨基，即糖胺基的氨基：

H-AEEAc-Gly-AMB,
H-Gly-Gly-AMB,
H-AEEAc-AEEAc-Gly-AMB,
H-(Gly)₅-AMB,
H-AEEAc-AEEAc-Gly-Gly-Gly-AMB,
H-Gly-Gly-AEEAc-Gly-Gly-AMB,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AMB,
H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-AMB (式[III], DMR078),
H-AEEAc-AEEAc-Gly-AEEAc-AEEAc-AMB (式[IV], DMR079),
H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AMB,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-AMB,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AMB, 或
H-(AEEAc)₉-Gly-AMB。

在一些方案中，本发明涉及包含上述化合物或其药用盐的药物组合物。

在一些方案中，本发明涉及对有需要的受试者预防和/或治疗真菌感染的方法，其中，向所述受试者给予治疗有效量的上述化合物或其药用盐。在优选的方案中，所述真菌感染选自如下真菌的感染：例如隐球菌 (*Cryptococcus*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、克柔念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、毛霉菌 (*Mucor*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*) 和烟曲菌 (*Aspergillus fumigatus*)。例如，所述受试者患有隐球菌病 (*Cryptococcosis*)、芽生菌病 (*Blastomycosis*)、念珠菌病 (*Candidiasis*)、球孢子菌病 (*Coccidioidomycosis*)，由毛霉菌所致的毛霉菌病 (*mucormycosis*)，由孢子丝菌 (*Sporothrix*) 引起的孢子丝菌病 (*Sporotrichosis*)，由大部分曲霉菌 (*Aspergillus*) 所致的曲霉菌病 (*aspergillosis*)。

在一些方案中，本发明涉及上述化合物或其药用盐用于制备药物、例如抗真菌药物的用途。优选地，所述真菌选自例如隐球菌、皮炎芽生菌、白色念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、粗球孢子菌、毛霉菌、申克孢子丝菌和烟曲菌。优选地，与两性霉素 B 相比，本发明的上述化合物或其药用盐具有相当的抗真菌活性，并具有改善的溶解性，甚至可进一步具有降低的毒性。

在一些方案中，本发明涉及用于预防和/或治疗真菌感染的上述化合物或其药用盐。优选地，所述真菌感染选自如下真菌的感染：例如隐球菌、皮炎芽生菌、白色念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、粗球孢子菌、毛霉菌、申克孢子丝菌或烟曲菌。进一步优选地，上述化合物或其药用盐用于治疗真菌感染引起的选自如下的疾病：隐球菌病、芽生菌病、念珠菌病、球孢子菌病，由毛霉菌所致的毛霉菌病，由孢子丝菌引起的孢子丝菌病，由大部分曲霉菌所致的曲霉菌病。优选地，与两性霉素 B 相比，本发明的上述化合物

或其药用盐具有相当的抗真菌活性，并具有改善的溶解性，甚至可进一步具有降低的毒性。

在一些方案中，本发明涉及制备上述化合物或其药用盐的方法，优选地，所述方法包括：(1) 在树脂上固相合成多肽，将得到的多肽产物用弱酸进行裂解，过滤，旋蒸，然后加入第一有机溶剂溶解，旋蒸，用第二有机溶剂沉淀，干燥，得到含有氨基保护基的多肽；(2) 将所述含有氨基保护基的多肽进行活化，然后在无水溶剂中与两性霉素 B 在催化剂量的碱存在下进行反应；以及任选地，(3) 脱除含有氨基保护基的多肽部分的氨基保护基。

步骤(1)所述的弱酸包括但不限于三氟乙醇，并且该弱酸可与二氯甲烷按 1:4 (V/V) 进行配制作作为弱酸溶液。

步骤(1)所述的第一有机溶剂可选自 DCM 和 THF。

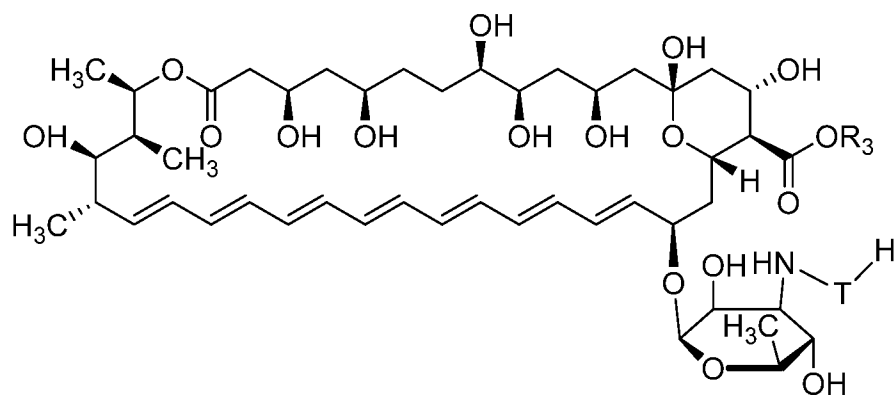
步骤(1)所述的第二有机溶剂可选自乙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚。

步骤(2)所述的无水溶剂选自 DMF 和 DMSO。

步骤(2)所述的碱包括但不限于 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA)。

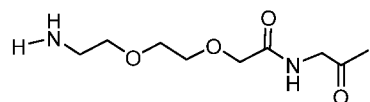
在步骤(3)中，采用选自如下的脱除剂来脱除氨基保护基：哌啶 (PIP) 溶液，优选 10wt%-40wt% 的 PIP 的 DMF 溶液，更优选 20wt%-25wt% 的 PIP 的 DMF 溶液。

在一些方案中，本发明涉及选自如下的化合物或其药用盐：

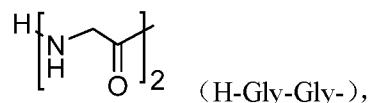


式[V]

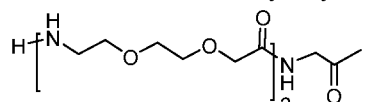
其中，R₃ 为 H；H-T 为选自如下中的任一种：



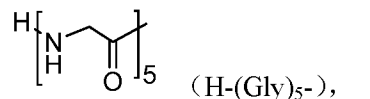
(H-AEEAc-Gly-),



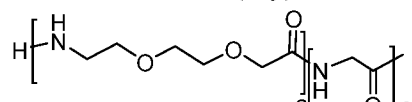
(H-Gly-Gly-),



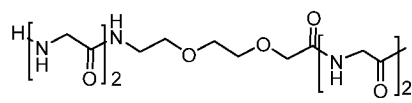
(H-AEEAc-AEEAc-Gly-),



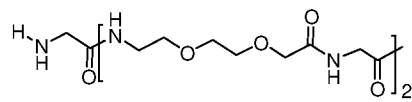
(H-(Gly)₅-),



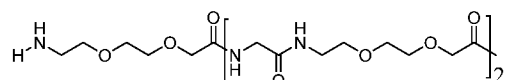
(H-AEEAc-AEEAc-Gly-Gly-Gly-),



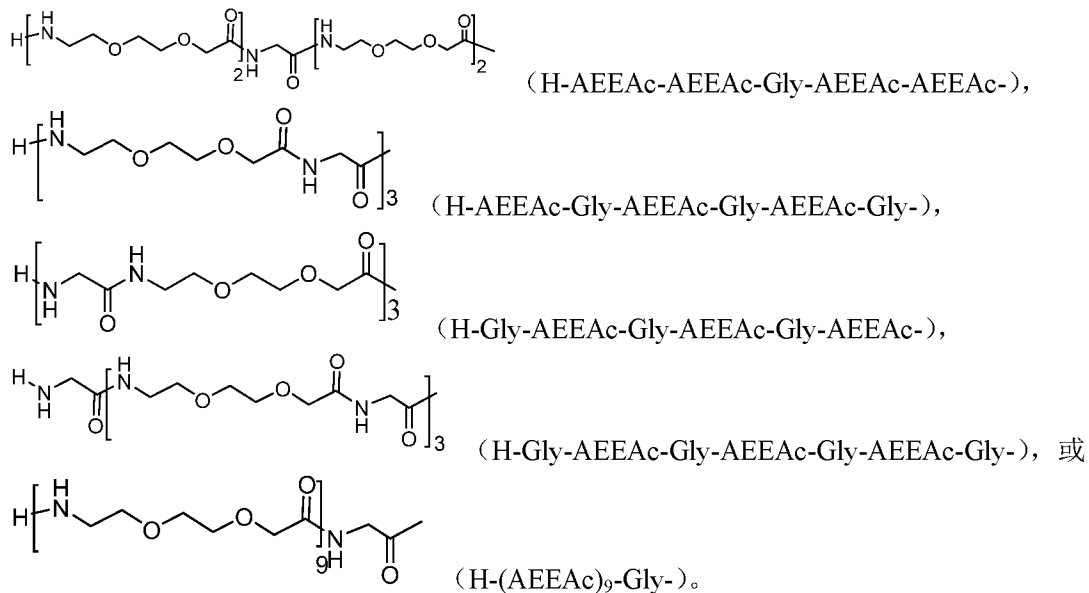
(H-Gly-Gly-AEEAc-Gly-Gly-),



(H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-),



(H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-),



目前深部真菌感染的主要病原菌仍然是白色念珠菌，耐药现象也最为突出，因此白色念珠菌深部感染的防治也是抗真菌感染研究领域的重点，本发明中，含有水溶性多聚物部分 T 的 DTY-AMB 对白色念珠菌具有良好的抑菌效果。

DTY-AMB 可以是药理学上可接受的盐的形式。

DTY-AMB 可以作为口服制剂的有效药物成分；也可以充当注射用药的有效药物成分，如静脉注射、皮下注射、肌肉注射等；也可以作为局部用药的有效药物成分。

DTY-AMB 可以通过现有的医药学技术制成药物有效剂量单位，该有效剂量单位的形式可以为口服、药片、胶囊或液体等剂型。

药物成分可制成含水的制剂，其中水分不低于 50%。

口服制剂可以为液体、悬浮液、粉末、药片及胶囊等形式；其中包含各种不同赋形剂（比如：碳酸钙、磷酸钙等）的药片也可以做成崩解制剂。

药物成分可以通过可控的方式进行释放，包括缓释或快速释放，相关药物成分的可控释放剂量可以通过已知的医药学技术进行实现。

药物成分可以包含有 0.1%-99.9% 的 DTY-AMB（DTY-AMB 按重量计算），较优含量为 1%-70%。

图 3 为 DTY-AMB 化学合成的总路线图，DTY-AMB 的化学合成包括下文的第一步、第二步及第三步。

第一步包括固相合成多肽 R_2 -T 及该系列多肽的活化，本发明提供了一种该系列多肽的合成方法。在一些方案中，所述方法包括：合成该系列多肽。在一些方案中，可采用固相合成技术制备该系列多肽，包括：

- (1) 在树脂上固相合成多肽；
- (2) 将步骤 (1) 的产物用弱酸进行裂解，过滤，旋蒸，然后加入适量的有机溶剂溶解多肽，再次旋蒸，重复 2-3 次，最后用有机溶剂沉淀，干燥，得到目标多肽。

任选地，所述步骤 (1) 包括如下步骤：

(a) 浸泡树脂—投料（首个氨基酸及高位阻碱）—测定树脂取代值—脱除氨基保护基—洗涤—监测—偶联氨基酸—监测—洗涤—脱除氨基保护基—顺序偶联剩余氨基酸—直到最后一个氨基酸，而后进行洗涤不进行脱除氨基保护基；其中，氨基保护基是指为保护参与缩合反应的氨基而引入的化学基团。所述的氨基保护基包括但不限于叔丁氧羰基（Boc）、苄氧羰基（Z）或 9-苄基-甲基羰基（Fmoc），优选 9-苄基-甲基羰基（Fmoc）等，所述保护基包括但不限于此，可根据具体情况进行合理选择。

所述步骤 (a) 的投料，即称取适量的 R_2 -AEEAc-OH 或 R_2 -Gly-OH 及吸取适量的高位阻碱，加入 DCM，例如 10mL DCM 溶解后，投入到反应器中。

所述高位阻碱试剂包括但不限于 N,N-二异丙基乙胺（DIEA）。

所述步骤 (a) 的测定树脂取代值，即分别取适量的偶联上首个氨基酸的树脂于两个 EP 管中，干燥称重（W），分别加入氨基保护基的脱除剂（例如 1mL 20%PIP/DMF）进行反应（例如反应 30min）以脱除氨基保护基，取该脱保护液（例如 100μL），加入有机溶剂（例如 10mL DMF；稀释倍数为 S，例如 101 倍），测定 301nm 的吸光值 A（在本文中，也称为“A₃₀₁”），取代值（SD）公式为：SD = A₃₀₁*S/(7800*W)，W

的单位为 g。

所述步骤 (a) 的液相环境所用溶剂选自：二甲基甲酰胺 (DMF)、二氯甲烷 (DCM)、N-甲基吡咯烷酮 (NMP)，优选 DCM 及 DMF。

所述步骤 (a) 中脱除氨基保护基需要加入氨基保护基的脱除剂，氨基保护基的脱除剂选用哌啶 (PIP) 溶液，浓度 10%-40% (PIP/DMF)，脱除时间为 20-50min；优选浓度为 20%-25% (PIP/DMF)，脱除时间 25-35min。

所述步骤 (a) 中氨基酸的偶联需要加入偶联试剂，偶联试剂由碳二亚胺型试剂或者苯并三氮唑鎓盐型试剂和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 组成。

所述碳二亚胺型试剂包括但不限于二环己基碳二亚胺 (DCC)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) 或 N-二氨基丙基-N-乙基碳二亚胺 (EDC)。

所述苯并三氮唑鎓盐型试剂包括但不限于 2-(1H-苯并三偶氮 L-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU)、O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU)、六氟磷酸苯并三唑-1-氧基三(二甲氨基)磷 (BOP) 或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (PyBOP)。

所述偶联试剂优选二异丙基碳二亚胺 (DIC) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt)、或 2-(1H-苯并三偶氮 L-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt)，进一步优选 DIC (二异丙基碳二亚胺) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt)。

所述步骤 (a) 中的“监测”采用茚三酮检测法监测多肽的缩合反应。

所述步骤 (a) 中的顺序偶联氨基酸是指根据多肽氨基酸序列从 C 端向 N 端逐个连接氨基酸。

步骤 (2) 所述的弱酸包括但不限于三氟乙醇，并且该弱酸可与二氯甲烷按 1:4 (V/V) 进行配制作作为弱酸溶液。

第一步反应中的另一部分为含有氨基保护基的多肽的活化，其中多肽 T 为 2-10 肽，较优地，为 3-7 肽，最优地，为 5 肽。多肽羧基的活化包括：活化酯法、对称酸酐法、叠氮化法等，优选较为温和的活化酯法；所用的活化试剂：由碳二亚胺型试剂或者苯并三氮唑鎓盐型试剂和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 或琥珀酰亚胺 (HOSU) 组成。所述碳二亚胺型试剂包括但不限于二环己基碳二亚胺 (DCC)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) 或 N-二氨基丙基-N-乙基碳二亚胺 (EDC)。所述苯并三氮唑鎓盐型试剂包括但不限于 2-(1H-苯并三偶氮 L-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU)、O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU)、六氟磷酸苯并三唑-1-氧基三(二甲氨基)磷 (BOP) 或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (PyBOP)，优选二异丙基碳二亚胺 (DIC) 和羟基琥珀酰亚胺 (HOSU)；活化时所用的液相体系中的溶剂优选有机溶剂，包括 DMF、DMSO、DCM、THF 等，优选 THF (四氢呋喃)。所述的氨基保护基包括但不限于叔丁氧羰基 (Boc)、苄氧羰基 (Z) 或 9-苄基-甲基羰基 (Fmoc)，优选 9-苄基-甲基羰基 (Fmoc)；酯的活化在 30℃ 下，1-2 小时，加入催化剂量的碱，有利于活化完全，所述碱试剂包括但不限于 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA)；经过旋蒸，除去有机溶剂即可得到化合物 2。

第二步，化合物 2 在无水溶剂中，如 DMF、DMSO，室温下与两性霉素 B 进行 1-2 小时的反应。反应要求避光，较优地，加入催化剂量的碱，有利于反应完全，所述碱试剂包括但不限于 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA)；即可得到化合物 4，化合物 4 可以通过半制备型 RP-HPLC 进行制备纯化。

第三步，对含有氨基保护基的多肽进行脱氨基保护基，所述的氨基保护基包括但不限于叔丁氧羰基 (Boc)、苄氧羰基 (Z) 或 9-苄基-甲基羰基 (Fmoc)，优选 9-苄基-甲基羰基 (Fmoc)；脱除氨基保护基需要加入氨基保护基的脱除剂，氨基保护基的脱除剂选用哌啶 (PIP) 溶液，浓度 10%-40% (PIP/DMF)，脱除时间为 20-50min；优选浓度为 20%-25% (PIP/DMF)，脱除时间 25-35min。通过纯化，即可得到化合物 5 (即，DTY-AMB)。

另外，5-脱氧两性霉素 B 也可以代替两性霉素 B 来充当起始原料，5-脱氧两性霉素 B 即两性霉素 B 的 R₄ 位置的基团 OH 变为 H；相关的 5-脱氧两性霉素 B 可以通过合成得到。

特别有益的是为满足医药用途的质量要求，本发明所提供的两性霉素 B 肽衍生物的制备方法还可以进一步包括纯化步骤。所采用的纯化方法包括但不限于反相色谱法或离子交换色谱法，优选反相色谱法。

本发明所涉及两性霉素 B 肽衍生物的体外抗菌活性可以通过测定其最低抑菌浓度 (MIC) 来鉴定。美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐采用微量肉汤稀释法来测定各抗菌药物的最低抑菌浓度 (MIC)，培养基采用改良型 RPMI-1640 培养基。以两性霉素 B 作为阳性对照。体外活性测定表明，本发明提供的两性霉素 B 肽衍生物具有较好的抗白色念珠菌活性。

定义

除非另有说明，本申请中所用的下列术语具有下列含义。一个特定的术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照本领域普通的含义去理解。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

术语“任选”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生，该描述包括发生所述事件或情况和不发生所述事件或情况。例如，乙基“任选”被卤素取代，指乙基可以是未被取代的(CH_2CH_3)、单取代的(如 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$)、多取代的(如 CHFCH_2F 、 CH_2CHF_2 等)或完全被取代的(CF_2CF_3)。本领域技术人员可理解，对于包含一个或多个取代基的任何基团，不会引入任何在空间上不可能存在和/或不能合成的取代或取代模式。

本文所用的 C_{m-n} 指该部分中具有 $m-n$ 个碳原子。例如，“碳₃₋₁₀环烷基”指该环烷基具有 3-10 个碳原子。“碳₀₋₆亚烷基”指该亚烷基具有 0-6 个碳原子，当亚烷基具有 0 个碳原子时，该基团为键。

本文中的数字范围，是指给定范围中的各个整数。例如“ C_{1-6} ”是指该基团可具有 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子、4 个碳原子、5 个碳原子或 6 个碳原子。

当任何变量(例如 R)在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 2 个 R 所取代，则每个 R 都有独立的选项。

术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

术语“酰基”指-CO-基团。

术语“羧基”指-COOH 基团。

术语“羟基”指-OH 基团。

术语“氨基”指-NH₂ 基团。

术语“烷基”是指通式为 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 的烃基。该烷基可以是直链或支链的。例如，术语“烃₁₋₆烷基”指含有 1 至 6 个碳原子的单价直链或支链脂肪族基团(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、新戊基、3,3-二甲基丙基、己基、2-甲基戊基等)。类似地，烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、烷基磺酰基和烷硫基的烷基部分(即烷基)具有上述相同定义。

术语“烷氧基”指-O-烷基。术语“烷硫基”指-S-烷基。术语“烷基氨基”指-NH(烷基)。

术语“环烷基”指完全饱和的并且可以以呈单环、稠环或螺环存在的碳环。除非另有指示，该碳环通常为 3 至 10 元环，优选为 3 至 8 元环。环烷基非限制性实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、降冰片基(双环[2.2.1]庚基)、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基等。

术语“芳基”是指具有共轭的 π 电子体系的全碳单环或稠合多环的芳香环基团。例如，芳基可以具有 6-20 个碳原子、6-14 个碳原子或 6-12 个碳原子。芳基的非限制性实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基等。

术语“杂芳基”是指单环或稠合多环体系，其中含有至少一个选自 N、O、S 的环原子，其余环原子为 C，并且具有至少一个芳香环。优选的杂芳基具有单个 4 至 8 元环、尤其是 5 至 8 元环，或具有包含 6 至 14 个、尤其是 6 至 10 个环原子的多个稠合环。杂芳基的非限制性实例包括但不限于吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基、四唑基、三唑基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、异吲哚基等。

术语“被取代”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧代(即=O)时，意味着两个氢原子被取代，氧代不会发生在芳香基上。

术语“药学上可接受的”是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。金属盐的非限制性实例包括但不限于碱金属的盐，例如钠盐、钾盐等；碱土金属的盐，例如钙盐、镁盐、钡盐等；铝盐等。与有机碱形成的盐的非限制性实例包括但不限于与三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、环己胺、二环己基胺等形成的盐。与无机酸形成的盐的非限制性实例包括但不限于与盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸等形成的盐。与有机酸形成的盐的非限制性实例包括但不限于与甲酸、乙酸、三氟乙酸、富马酸、草酸、苹果酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、甲磺酸、苯磺酸、对甲基苯磺酸等形成的盐。与碱性氨基酸形成的盐的非限制性实例包括但不限于与精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸等形成的盐。与酸性氨基酸

形成的盐的非限制性实例包括但不限于与天冬氨酸、谷氨酸等形成的盐。

术语“药物成分”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与在本领域中通常接受的用于将生物活性化合物输送至有机体（例如人）的赋形剂、稀释剂、或载体的制剂。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

术语“药学上可接受的赋形剂、稀释剂、或载体”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些赋形剂、稀释剂、或载体。合适的载体、稀释剂及赋形剂是本领域技术人员熟知的，并且包括诸如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等原料。

术语“多肽”是指由 2 个以上的氨基酸通过肽键连接而形成的化合物，例如但不限于 2 肽、3 肽、4 肽、5 肽、6 肽、7 肽、8 肽、9 肽、10 肽、15 肽、20 肽。

在本文中，除非另有说明，否则术语“包含、包括和含有（comprise、comprises 和 comprising）”或等同物为开放式表述，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

术语“AEEAc”是指 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸。术语“Gly”是指甘氨酸。

本申请还包括与本文中记载的那些相同的，但一个或多个原子被原子量或质量数不同于自然中通常发现的原子量或质量数的原子置换的同位素标记的本申请化合物。可结合到本申请化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素，诸如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{36}Cl 等。

某些同位素标记的本申请化合物（例如用 ^3H 及 ^{14}C 标记的那些）可用于化合物和/或底物组织分布分析中。氘化（即 ^3H ）和碳-14（即 ^{14}C ）同位素由于它们易于制备和检测是尤其优选的。此外，用较重同位素（诸如氙（即 ^2H ））取代可以提供某些由更高的代谢稳定性产生的治疗优点（例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求），并且因此在某些情形下可能是优选的。正电子发射同位素，诸如 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{11}C 和 ^{18}F 可用于正电子发射断层扫描（PET）研究以测定底物占有率。通常可以通过与公开于下文的方案和/或实施例中的那些类似的下列程序，通过同位素标记试剂取代未经同位素标记的试剂来制备同位素标记的本申请化合物。

本申请的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其它化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本申请的实施例。

本申请具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的，所述的溶剂须适合于本申请的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本申请的化合物，有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。

以下实施例仅代表本发明阐述的一个方面，不是本发明主题的局限。

附图说明

图 1 为两性霉素 B 的化学结构。

图 2 为包含 T 的 DTY-AMB 整体化学结构，此结构中包含了一个糖胺结构，糖胺中有一个氨基，亲水性多肽部分 T（T 由 Gly-OH 或 AEEAc-OH 及 Gly-OH 组合而成）可以通过稳定的酰胺键与两性霉素 B 偶联，该酰胺键不容易被酶水解，在体内较稳定，一方面改善了两性霉素 B 的溶解性，另一方面降低了两性霉素 B 的毒性。

图 3 描述了 DTY-AMB 化学合成总路线图。

图 4 为目标产物 DMR078 的化学结构图。

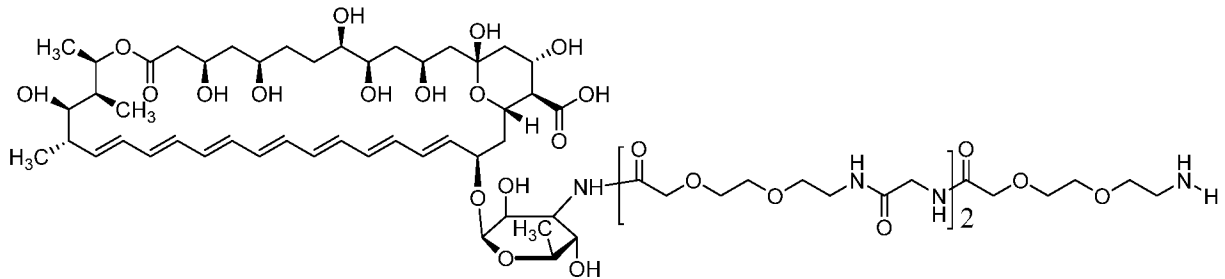
图 5 为 DMR078 及 AMB 的吸收光谱图；其中图 5A 示出了处于甲醇中的 DMR078 及 AMB（12.7 $\mu\text{g/mL}$ ）的吸收光谱图；图 5B 示出了处于 PBS 缓冲液中的 DMR078 及 AMB（12.7 $\mu\text{g/mL}$ ）的吸收光谱图；图 5C 示出了处于 PBS 缓冲液中的 DMR078（62.4 $\mu\text{g/mL}$ ）的吸收光谱图。

具体实施方式

实施例 1： DMR078 的制备与纯化

亲水多肽结构: H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-OH

DMR078结构:



(1) 材料及试剂

2-CTC树脂, 取代值0.945mmol/g。

氨基酸为: Fmoc-AEEAc-OH及Fmoc-Gly-OH

合成试剂: HATU、DMF、DCM、DIEA、哌啶。

(2) 仪器

CS-BIO型多肽合成仪、Waters600半制备型高效液相色谱仪、Beckman离心机、Buchi旋蒸仪。

(3) 操作步骤 (以1g树脂为例)

a. 固相化学合成多肽

称取2-CTC树脂1.00g, 置于多肽合成仪反应器中, 加入10mL DCM, 浸泡1h, 称取2-3倍量的Fmoc-AEEAc-OH及吸取4-6倍量的DIEA加入10mL DCM溶解后, 投入反应器中, 进行反应, 反应温度为室温 (25℃及其以上, 否则延长反应时间), 反应二小时, 即第一个氨基酸偶联到了树脂上, 然后DCM洗涤树脂6次, 测定此时树脂的取代值 (SD); 随后加入20% PIP/DMF溶液10mL, 混合30min脱除氨基保护基, DMF洗涤树脂6次, 偶联第二个氨基酸, 称取三倍量的Fmoc-Gly-OH、HATU及吸取六倍量的DIEA, 加入10mL DMF溶解后, 进行反应, 反应温度为室温, 以茚三酮反应监测反应进程, 监测无色则为反应完成, 用DMF洗涤树脂6次。而后, 即可按照上述偶联第二个氨基酸的方法继续进行下一个氨基酸的偶联反应, 如此循环, 直至全部氨基酸偶联完成。

b. 裂解及沉淀

多肽合成结束后, 称湿重。按照5mL裂解试剂/1g树脂的比例加入裂解试剂, 试剂配比为TFE: DCM=1:4 (V:V), 室温搅拌反应1小时, 过滤至25mL的旋蒸瓶中, 40℃将液体蒸干, 然后向旋蒸瓶中加入10mL DCM, 再次将液体旋蒸至干, 反复进行2-3次, 最后加入3mL DCM, 溶解切割的多肽, 并将溶液转移至50mL离心管中, 加入40mL乙醚, 放置-20℃冰箱中20min, 离心, 真空干燥, 称重粗肽。

c. 液相反应制备两性霉素B肽衍生物

称取干燥后的粗肽0.1mmol、HOSU 0.095mmol、DIC 15μL, 并加入5mL THF (25℃, 反应2小时), 旋蒸除去THF; 加入5mL DMSO溶解反应产物, 加入0.095mmol两性霉素B以及7μL DIEA室温下反应1~2小时, 加入20% PIP/DMF溶液4mL, 反应10~20min, 即得到粗产物。

按如下条件, 用半制备型RP-HPLC, 对粗产物进行纯化。

纯化

色谱柱: Nano Micro C18制备柱 (10mm×250mm, 10μm)

流速: 5mL/min

检测波长: 409nm

流动相: A相: 1% HAC/水

B相: 1% HAC/乙腈

梯度洗脱程序如表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	74	26
20	73	27
120	73	27

按如下条件，用安捷伦1260 HPLC，对收集产物进行分析。

色谱柱：YMC-pack ODS-AQ C18分析柱（4.6mm×250mm，5μm）

流速：1mL/min

检测波长：215 nm、383 nm及405nm

流动相：A相：0.05% TFA/水

B相：0.05% TFA/乙腈

梯度洗脱程序如表2。

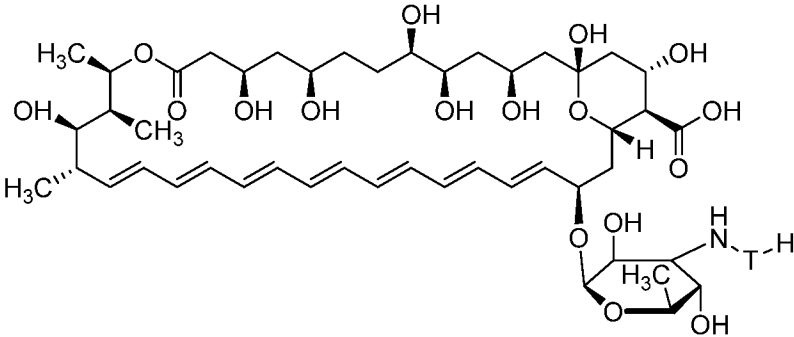
表2 梯度洗脱程序

时间（min）	A（%）	B（%）
0	80	20
5	80	20
25	20	80
26	10	90
31	10	90
32	80	20
38	80	20

收集纯度大于90%的目标组分，旋蒸，冷冻干燥。经ESI-MS进行分子量确证，M/Z=1473(M+H)⁺与理论分子量相符。

实施例 2：含有 T 的其它两性霉素 B 肽衍生物的制备与纯化

氨基酸序列：为含有Gly-OH、或AEEAc-OH及Gly-OH的2-10肽



产物结构：

合成H-T-AMB的两性霉素B肽衍生物，合成方法参照化合物DMR078，即①采用固相合成法合成Fmoc-T（T为Gly、或AEEAc及Gly组合而成的亲水性多肽，肽的长度范围为2-10）；②制备Fmoc-T-Osu；③Fmoc-T-Osu修饰两性霉素B的氨基，哌啶脱除Fmoc，最终得到H-T-AMB的两性霉素B肽衍生物粗品。采用RP-HPLC对粗产物进行纯化；根据化合物通式[II]，表3列举了该实施例的化合物的简称及相对分子质量：

表3 化合物简称及相对分子质量

名称	相对分子质量
H-(Gly-Gly)-AMB	1038
H-(AEEAc) ₉ -Gly-AMB	2287

实施例 3：两性霉素 B 肽衍生物溶解性的测定

两性霉素B及两性霉素B肽衍生物（采用与实施例1相同的方法制备）溶解性的测定，本发明中，采用双蒸水对它们的溶解性进行了测定，结果如表4。

表4 溶解性测定结果

化合物	溶解性（mg/mL）
AMB	<0.001
H-A-G-AMB	<0.5
H-G-G-AMB	<0.5
H-A-A-G-AMB	<0.5
H-(Gly) ₅ -AMB	<0.5
H-A-A-G-G-G-AMB	<0.5
H-G-G-A-G-G-AMB	<0.5

H-G-A-G-A-G-AMB	<0.5
H-A-G-A-G-A-AMB (DMR078)	>60
H-A-A-G-A-A-AMB (DMR079)	>60
H-A-G-A-G-A-G-AMB	>60
H-G-A-G-A-G-A-AMB	>60
H-G-A-G-A-G-A-G-AMB	>70
H-(AEEAc) ₉ -Gly-AMB	>100

注：A指代AEEAc；G指代Gly

结果显示，AMB几乎不溶于水；当AEEAc个数少于3时，增加Gly，溶解度没有改善，如若全部为Gly时，H-(Gly)₅-AMB，其溶解于水后，室温放置半小时，会形成胶束；当AEEAc的个数多于3时，Gly的量增加与减少，AMB肽衍生物均有较高的溶解度，DMR078明显改善了水溶解性；然而，随着亲水性多肽的延长，两性霉素B肽衍生物的溶解度增大，抑菌活性却可明显下降，甚至无抑菌活性。

实施例4：两性霉素B肽衍生物的稳定性

AMB母体结构的三个不稳定部位分别为C₁₃位半缩酮结构、七个共轭双键结构及C₁₉位的β-糖苷键，故中国药典中规定两性霉素B采用避光、冷藏的方式进行贮藏。本发明制备的两性霉素B肽衍生物是在两性霉素B结构上进行了修饰，故也存在相似的降解途径。①在甲醇溶液中（室温12h），两性霉素B肽衍生物C₁₃位半缩酮结构会被甲基化；②在低pH（如TFA）下，容易产生m/z 801的杂质，推测其C₁₉的β-糖苷键断裂；③在避光室温条件下，其水溶液共轭七烯键很容易氧化，而低温（-20℃）避光条件下，化合物共轭七烯键只有轻微的氧化，故制备的两性霉素B肽衍生物也采取避光、冷藏的方式进行贮藏；同时试验表明两性霉素B与亲水性多肽之间的酰胺键非常稳定，在4℃、25℃下，以水、PBS为溶剂，样品在放置4h、12h、24h、48h后，采用RP-HPLC（215nm、383nm、405nm）未检测到断裂的亲水性多肽。

实施例5：体外抗菌活性测定

根据美国临床实验室标准化委员会（NCCLS）推荐的微量肉汤稀释法测定各抗菌药物的最低抑菌浓度（MIC），细菌培养基采用Mueller-Hinton（MH）肉汤培养基，白色念球菌培养基采用Hyclone改良型RPMI-1640培养基。

具体步骤为：

（1）抗菌药物贮存液制备：

精确配制浓度为320μg/mL的AMB肽衍生物和阳性对照品两性霉素B的各贮存液，置于-20℃环境中避光保存备用。

（2）培养基的配制：

真菌生长培养基采用改良马丁培养基，具体配制方法如下：1L培养基中含有2%葡萄糖、0.2%酵母浸出粉、0.5%鱼粉蛋白胨、0.05%硫酸镁、0.1%磷酸氢二钾，按上述比例称取相应量的各物质，溶解于一定量纯净水之后，定容至1L，调pH至7.2，加入2%琼脂，121℃高温灭菌30min。

真菌MIC测试采用Hyclone改良型RPMI-1640培养基，具体配制方法如下：称取18.00g葡萄糖溶于一定量纯净水中，定容到500mL，115℃高温灭菌15min。在无菌环境中，向已灭菌的葡萄糖溶液中加入500mL RPMI-1640培养基，混合后4℃贮存备用。

（3）接种物的制备：

挑取在平板上生长48h的真菌单菌落，转接到改良型马丁培养基的斜面培养基上，28℃孵育24h，增菌后处于对数生长期的菌液用Hyclone改良型RPMI-1640液体培养基调整其浊度达到0.5麦氏标准，相当于每毫升含 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ CFU（colony-forming unit），取此菌悬液用Hyclone改良型RPMI-1640液体培养基进行1:20稀释后，再进行1:50稀释作为待接种物，菌悬液浓度相当于 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ CFU/ml。

（4）稀释抗菌药物的制备及菌液接种：

取一块96孔板，在第1孔中加入160μL RPMI-1640液体培养基，第2-12孔中各加入100μL RPMI-1640液体培养基，然后向第1孔加入抗菌药物原液（320μg/mL）40μL，混匀，接着吸取100μL至第2孔，混匀后再从第2孔中吸取100μL至第3孔，如此连续倍比稀释至第10孔，并从第10孔中吸取100μL弃去，然后向第1-10孔及第12孔中加入上述制备好的接种物各100μL，使各孔的最终菌液浓度约为 2.5×10^3 CFU/ml。第1-10孔药物浓度分别为32μg/mL、16μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL、0.25μg/mL、0.125μg/mL、0.0625μg/mL，第11孔为不含抗菌药物及接种物的空白对照，第12孔为不含抗菌药物的阴性对照。

（5）孵育

接种真菌的96孔板置于28℃空气孵箱中孵育40~50h。

(6) 结果

以肉眼观察，无真菌生长的最低药物浓度即为该样品的最低抑菌浓度（MIC）。各抗菌药物的MIC测定结果如表5所示。

表5 MIC测定结果

化合物	MIC (μmol/L)
AMB	1.08
H-A-G-AMB	1.78
H-G-G-AMB	1.93
H-A-A-G-AMB	1.69
H-(Gly) ₅ -AMB	1.65
H-A-A-G-G-G-AMB	1.44
H-G-G-A-G-G-AMB	1.54
H-G-A-G-A-G-AMB	1.44
H-A-G-A-G-A-AMB (DMR078)	1.36-2.72
H-A-A-G-A-A-AMB (DMR079)	2.56
H-A-G-A-G-A-G-AMB	2.61
H-G-A-G-A-G-A-AMB	5.22-10.46
H-G-A-G-A-G-A-G-AMB	5.03-10.08

注：A指代AEEAc；G指代Gly

实施例 6：体外溶血活性测定

1.材料及试剂

无菌脱纤维羊血，NaH₂PO₄·2H₂O，Na₂HPO₄·12H₂O，NaCl

2.仪器设备

Allegra X-22R型低温高速离心机，电子天平，微量移液器，SHP-150型生化培养箱，96well板，酶标仪

3.实验方法

(1) PBS（磷酸缓冲盐生理盐水）缓冲液的配制

0.2mol/L NaH₂PO₄·2H₂O母液配制：准确称取NaH₂PO₄·2H₂O 3.12g，加纯净水搅拌溶解后，定容至100mL。

0.2mol/L Na₂HPO₄·12H₂O母液配制：准确称取Na₂HPO₄·12H₂O 14.32g，加纯净水搅拌溶解后，定容至200mL。

0.01 mol/L pH7.4的PBS缓冲液：取100mL 0.2mol/L Na₂HPO₄·12H₂O母液，用0.2mol/L NaH₂PO₄·2H₂O母液将其pH值调至7.4，量取50mL上述缓冲液用纯净水稀释20倍，再称取9.00g NaCl加入其中。

0.01 mol/L pH8.0的PBS缓冲液：取100mL 0.2mol/L Na₂HPO₄·12H₂O母液，用0.2mol/L NaH₂PO₄·2H₂O母液将其pH值调至8.0，量取50mL上述缓冲液用纯净水稀释20倍，再称取9.00g NaCl加入其中。

(2) 受试物的制备

准确称量待检测的两性霉素B肽衍生物样品，用pH 8.0的PBS缓冲液配制成浓度为2.56mg/mL的待测液（由于衍生物样品中有分离纯化时残留的HAC，用pH 8.0的PBS缓冲液配制可以使得最终溶液pH达到7.3-7.4，另外溶解度较差的衍生物不再测定溶血毒性），-20℃冷藏备用。准确称取两性霉素B，首先用DMSO配置成5.12mg/mL，然后用pH 7.4的PBS缓冲液稀释成51.2μg/mL的待测液。

(3) 羊血红细胞的处理

取无菌脱纤维羊血数毫升，加入约10倍量的pH 7.4的PBS缓冲液，摇匀，1500r/min离心15分钟，除去上清液，沉淀的红细胞再用pH 7.4的PBS缓冲液按照上述方法洗涤2-3次，至上清液不显红色为止。将所得红细胞用pH 7.4的PBS缓冲液配成2%的混悬液，供试验用。

(4) 溶血毒性测定步骤

取一块96孔板，在第1-11孔中加入100μL pH 7.4的PBS缓冲液，在12孔加入100μL双蒸水，然后向第1孔加入抗菌药物原液（2560μg/mL）或两性霉素B原液（51.2μg/mL）100μL，混匀，接着吸取100μL至第2孔，混匀后再从第2孔中吸取100μL至第3孔，如此连续倍比稀释至第10孔，并从第10孔中吸取100μL弃去，然后向第1-10孔及第11-12孔中加入上述制备好的接种物各100μL 2%的红细胞混悬液，使每孔最终红细胞浓

度约为 1×10^8 细胞/孔。抗菌药物的第1-10孔药物浓度分别为640 $\mu\text{g/mL}$ 、320 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ ，对照药物两性霉素B的第1-10孔药物浓度分别为12.8 $\mu\text{g/mL}$ 、6.4 $\mu\text{g/mL}$ 、3.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.025 $\mu\text{g/mL}$ ，第11孔为红细胞混悬液+PBS的阴性对照，第12孔为红细胞混悬液+双蒸水的阳性对照。最后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中温育1h。

(5) 孵育

温育1h后，取出96well板，600r/min离心15分钟，取上清用酶标仪测定540nm下的OD值。按照下列公式计算溶血率，其中阴性对照为PBS，阳性对照为双蒸水。溶血率=(试品OD-阴性OD)/(阳性OD-阴性OD)

(6) 结果

两性霉素B肽衍生物的体外溶血毒性结果见表6。

表6 体外溶血毒性结果

化合物	体外溶血毒性($\mu\text{g/mL}$)
AMB	6.4
H-A-G-A-G-A-AMB (DMR078)	>640
H-A-A-G-A-A-AMB (DMR079)	>640
H-A-G-A-G-A-G-AMB	>640
H-G-A-G-A-G-A-AMB	>640
H-G-A-G-A-G-A-G-AMB	>640

注：A指代AEEAc；G指代Gly

实施例7：AMB及DMR078光谱性质和自聚集特征

1.材料及试剂

NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , DMSO, CH_3OH 。

2.仪器设备

电子天平，恒温水浴槽，UV1800紫外可见分光光度计

3.实验方法

(1) PBS（磷酸缓冲盐生理盐水）缓冲液的配制

PBS, pH 7.4, 1L

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4): 0.27g

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 3.58g

氯化钠 (NaCl): 8.00g

氯化钾 (KCl): 0.20g

加水约800mL充分搅拌溶解，然后加入盐酸调pH至7.4，定容到1L

(2) 受试物的制备

准确称量待检测的DMR078，分别用DMSO、pH 7.4的PBS缓冲液配制成浓度为1.28和2.56mg/mL的待测液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。准确称取AMB，用DMSO配置成1.28 mg/mL，-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

(3) 测定步骤

首先，将20 μL 等份的每种DMSO溶液加入到2mL甲醇或2mL PBS缓冲盐中（消除DMSO的影响），另外分别取20 μL 、30 μL 、40 μL 及50 μL 的DMR078 2.56mg/mL溶液加入到2mL PBS缓冲盐中；其次，上述溶液在30 $^{\circ}\text{C}$ 温育30分钟；最后，记录每个样品300-430nm范围内UV-Vis光谱数据。

4) 结果

AMB及DMR078 (H-A-G-A-G-A-AMB) 的光谱图结果见图5。图5A示出了处于甲醇中的DMR078及AMB (12.7 $\mu\text{g/mL}$) 的光谱图；图5B示出了处于PBS缓冲液中的DMR078及AMB (12.7 $\mu\text{g/mL}$) 的光谱图；图5C示出了处于PBS缓冲液中的DMR078 (62.4 $\mu\text{g/mL}$) 的光谱图。

文献报道AMB在PBS缓冲液中存在多个形式，即单体形式、可溶性自聚集以及不可溶的自聚集。而吸光度A348/A409的比率已被用作AMB自聚集(s)的衡量指标；由上图可知，AMB以及DMR078在甲醇溶液中不会产生自聚集(图5A)；在相同的浓度(12.7 $\mu\text{g/mL}$)下，AMB在409nm处的吸收和光谱形状显示：AMB具有明显的自聚集现象，然而，衍生物DMR078单体形式的比例很高，不存在自聚集现象(图5B)；

在更高的浓度（62.4μg/mL）下，在409nm处的吸收和光谱形状显示：衍生物DMR078单体形式的比例仍很高，略微存在自聚集现象（图5C）。

实施例 8：体外 HEK293T 细胞毒性测定

1.材料及试剂

HEK293T细胞，NaCl，KCl，Na₂HPO₄·12H₂O，KH₂PO₄，MTT，DMEM

2.仪器设备

电子天平，微量移液器，多功能酶标仪，A2型生物安全柜，微孔板恒温振荡器，CO₂培养箱，离心机，倒置显微镜，恒温水浴槽

3.实验方法

（1）PBS（磷酸缓冲盐生理盐水）缓冲液的配制

PBS，pH 7.4，1L

磷酸二氢钾（KH₂PO₄）：0.27g

磷酸氢二钠（Na₂HPO₄·12H₂O）：3.58g

氯化钠（NaCl）：8.00g

氯化钾（KCl）：0.20g

加水约800mL充分搅拌溶解，然后加入盐酸调pH至7.4，定容到1L

（2）受试物的制备

准确称量待检测的DMR078，用无菌pH 7.4的PBS缓冲液配制成浓度为3.00mg/mL的待测液（使用无菌注射器及0.22μm滤头，在超净工作台中过滤），-20℃冷藏备用。准确称取两性霉素B，用DMSO配置成10.24 mg/mL，然后用pH 7.4的PBS缓冲液稀释成1.024 mg/mL的待测液（用无菌pH 7.4的PBS缓冲液在超净工作台中稀释）。

（3）细胞肾毒性测定步骤及孵育

收集对数期细胞，调整细胞悬液浓度，每孔加入100 μL，铺板使待测细胞调密度至0.5×10⁴细胞/孔（边缘孔用无菌PBS填充），5% CO₂，37℃孵育过夜。至细胞单层铺满孔底（96孔平底板），弃去上清液，再加入梯度浓度的药物，共8个浓度梯度，每孔100 μL，设1个复孔，5% CO₂，37℃孵育24-48小时，倒置显微镜下观察。弃去上清液，再每孔加入10 μL MTT溶液（5mg/mL，即0.5% MTT），继续培养4-6 h。吸去孔内培养液，每孔加入100 μL二甲基亚砷，置微孔振荡器上低速振荡10 min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD 580nm处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔（培养基、MTT、二甲基亚砷），阳性对照孔（细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养基、MTT、二甲基亚砷），1%二甲基亚砷对照孔（细胞、培养基、MTT、二甲基亚砷）。

（4）结果

AMB及DMR078的体外肾毒性结果见表7。

表7 体外肾毒性结果

化合物	EC50（μg/mL）
AMB	25.6
DMR078	1500

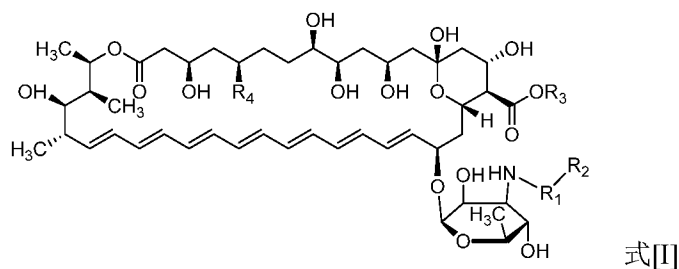
由EC50的数据可得：与AMB相比，化合物DMR078的体外肾细胞毒性明显降低。

根据本发明所公开的内容，在此所公开并要求保护的所有组合物和/或方法均无需进行过多实验即可进行制备和实施。虽然根据优选实施方案对本发明的组合物和方法进行了描述，但对本领域技术人员而言，在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下，可对在此所述的组合物和/或方法以及所述方法的步骤或步骤的顺序进行改变。

本文所引用的所有文献的公开内容通过引用结合于此，引用程度为，他们提供示例性的、程序上和其他的细节补充本文所述内容。

权利要求书

1. 式[I]所示的化合物或其药用盐:



其中, R_1 选自亲水性多聚物部分;

R_2 选自氨基保护基或 H;

R_3 选自 H 或 C_{1-4} 烷基或苯基;

R_4 为 OH 或 H;

可选择地, 所述亲水性多聚物部分可以为 $H-(Gly)_n-OH$ 多聚物的部分, 其中 n 取 1-20 的整数, 较优地, n 取 2-15 的整数, 最优地, n 为 5;

可选择地, 所述亲水性多聚物部分可以由 Gly 与 AEEAc 通过肽键构成的多肽部分, 多肽部分的长度为 2-20 肽, 较优地为 2-15 肽, 最优地, 为 5 肽;

可选择地, 所述氨基保护基为 Fmoc 或 Boc。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药用盐, 所述亲水性多聚物部分是 $H-(Gly)_n-OH$ 多聚物的部分, 其中 n 取 2-20 的整数, 较优地, n 取 2-15 的整数, 最优地, n 为 5。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药用盐, 所述亲水性多聚物部分是由 Gly 与 AEEAc 通过肽键构成的 5 肽部分。

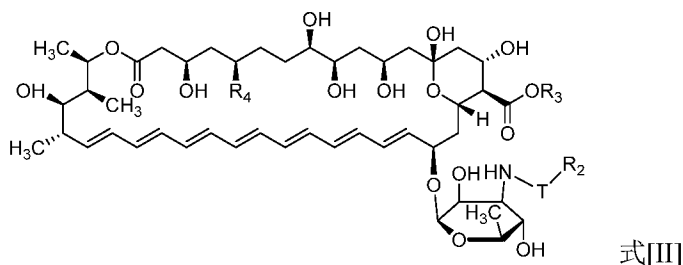
4. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药用盐, 所述 R_1 选自 $-(Gly)_n-$ 、 $-(AEEAc)_n-Gly-$ 、 $-(AEEAc-Gly)_n-AEEAc-$ 、 $-AEEAc-Gly-$ 、 $-(AEEAc-Gly)_n-$ 、 $-(Gly-AEEAc)_n-Gly-$ 、 $-(AEEAc)_n-Gly-(AEEAc)_m-$ 、 $-(AEEAc)_n-(Gly)_m-$ 和 $-(Gly)_n-AEEAc-(Gly)_m-$, 其中, n 和 m 各自独立地为 2-9 的整数。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的化合物或其药用盐, 所述 R_1 选自 $-(AEEAc)_n-Gly-$ 、 $-(AEEAc-Gly)_n-AEEAc-$ 、 $-(AEEAc-Gly)_n-$ 、 $-(Gly-AEEAc)_n-Gly-$ 和 $-(AEEAc)_n-Gly-(AEEAc)_m-$, 其中, n 和 m 各自独立地为 2-9 的整数且同时满足 R_1 中的 AEEAc 的数量大于等于 3。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其药用盐, 其中, R_2 为 H。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的化合物或其药用盐, 其中, R_3 为 H。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的化合物或其药用盐, 所述化合物具有式[II]:



其中, R_2 为 Fmoc、Boc 或者 H;

R_3 为 H 或 C_{1-4} 烷基或苯基;

R_4 为 OH 或 H;

可选择地, T 是含有 Gly 或其衍生物、或者由 AEEAc 及 Gly 构成的组合多肽及其衍生物的多聚物部分, 在这里 T 的长度范围为 2-10 肽, 较优地, 为 3-7 肽, 最优地, 为 5 肽。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的化合物或其药用盐, 其中, R_3 选自 H、甲基、乙基、丙基、1-甲基乙基、丁基、1-甲基丙基、2-甲基丙基、1,1-二甲基乙基或苯基。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的化合物或其药用盐, 其中, R_3 为 H; R_2-T 选自:

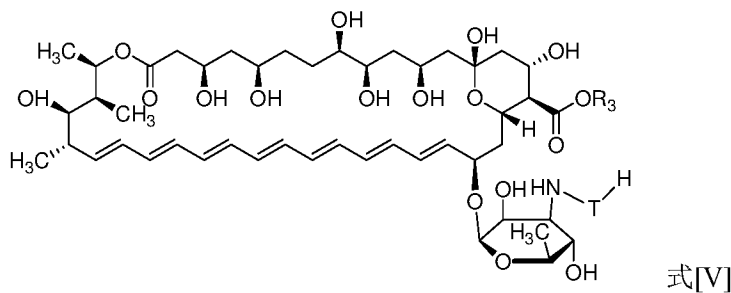
$H-AEEAc-Gly-$,

$H-Gly-Gly-$,

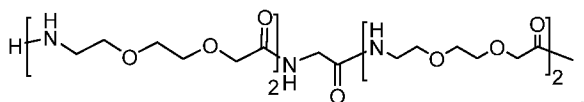
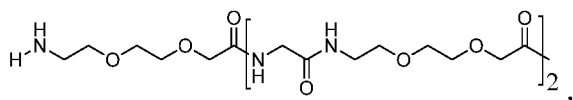
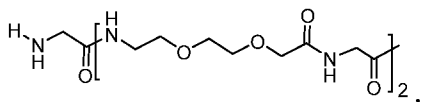
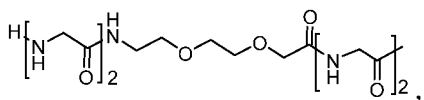
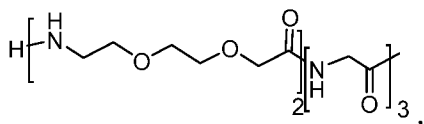
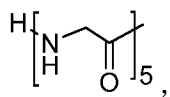
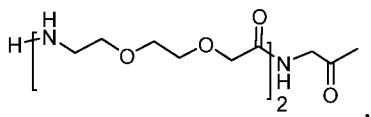
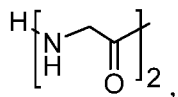
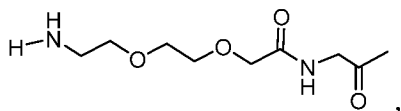
$H-AEEAc-AEEAc-Gly-$,

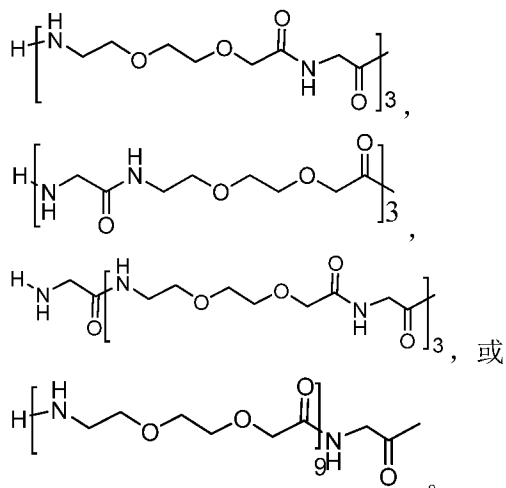
H-(Gly)₅-,
H-AEEAc-AEEAc-Gly-Gly-Gly-,
H-Gly-Gly-AEEAc-Gly-Gly-,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-,
H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-,
H-AEEAc-AEEAc-Gly-AEEAc-AEEAc-,
H-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-,
H-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-AEEAc-Gly-,
或 H-(AEEAc)₉-Gly-。

11. 根据权利要求 8-10 任一项所述的化合物或其药用盐, 其中, R₃ 为 H; R₂-T-为 H-AEEAc-X-Y-Z-AEEAc-;
X 为 AEEAc 或 Gly, Y 为 AEEAc 或 Gly, 且 Z 为 AEEAc 或 Gly。
12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的化合物或其药用盐, 所述化合物具有式[V]:

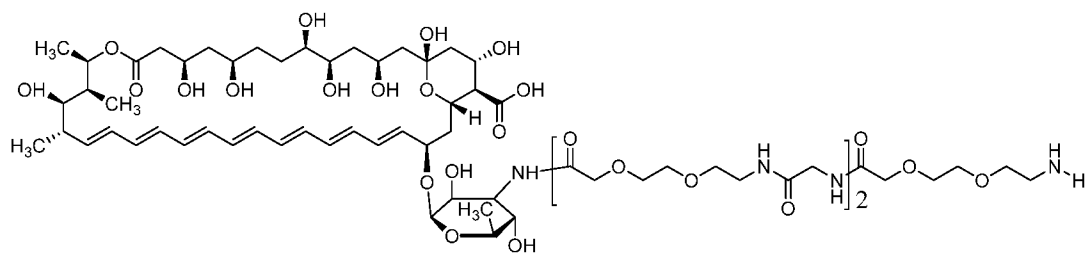


其中, R₃ 为 H; H-T-为选自如下中的任一种:

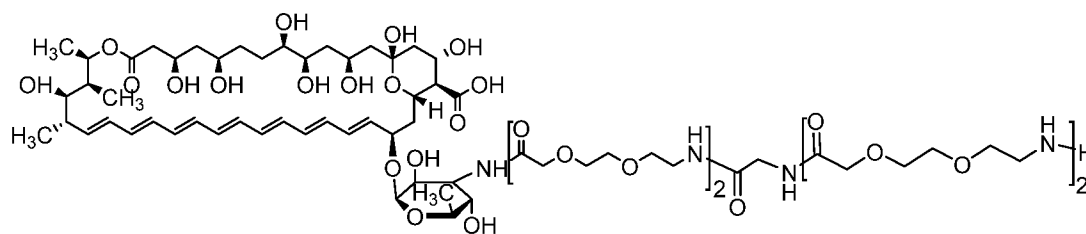




13. 根据权利要求 1-12 任一项所述的化合物或其药用盐, 其中, 所述化合物选自:



式[III], 或



式[IV]。

14. 制备权利要求 1-13 任一项所述的化合物或其药用盐的方法, 包括: (1) 在树脂上固相合成多肽, 将得到的多肽产物用弱酸进行裂解, 过滤, 旋蒸, 然后加入第一有机溶剂溶解, 旋蒸, 用第二有机溶剂沉淀, 干燥, 得到含有氨基保护基的多肽; (2) 将所述含有氨基保护基的多肽进行活化, 然后在无水溶剂中与两性霉素 B 在催化剂量的碱存在下进行反应; 以及任选地, (3) 脱除含有氨基保护基的多肽部分的氨基保护基。
15. 一种药物组合物, 其中, 所述组合物包含权利要求 1-13 任一项所述的化合物或其药用盐的药物组合物。
16. 权利要求 1-13 任一项所述的化合物或其药用盐用于制备药物、优选抗真菌药物的用途。
17. 权利要求 16 所述的用途, 与两性霉素 B 相比, 所述化合物或其药用盐具有相当的抗真菌活性, 并具有改善的溶解性。
18. 权利要求 16 或 17 所述的用途, 所述真菌选自例如隐球菌、皮炎芽生菌、白色念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、粗球孢子菌、毛霉菌、申克孢子丝菌和烟曲菌。
19. 一种对有需要的受试者预防和/或治疗真菌感染的方法, 其中, 向所述受试者给予治疗有效量的权利要求 1-13 任一项所述的化合物或其药用盐。
20. 权利要求 19 所述的方法, 其中, 所述真菌感染选自如下真菌的感染: 隐球菌 (*Cryptococcus*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、克柔念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、毛霉菌 (*Mucor*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*) 和烟曲菌 (*Aspergillus fumigatus*)。

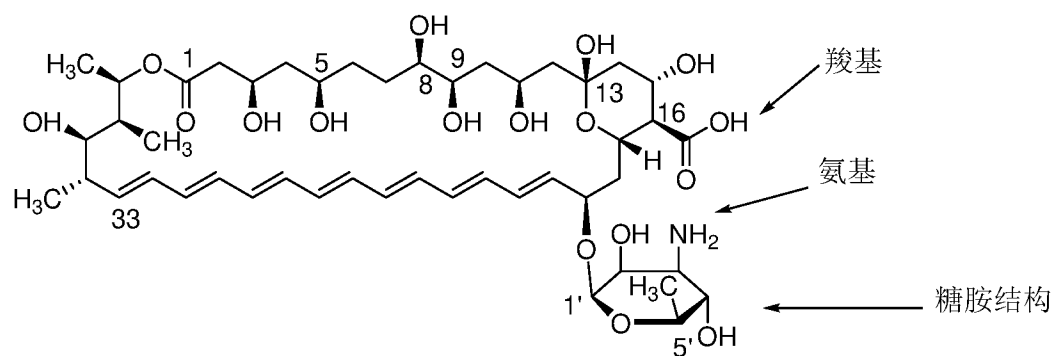


图 1

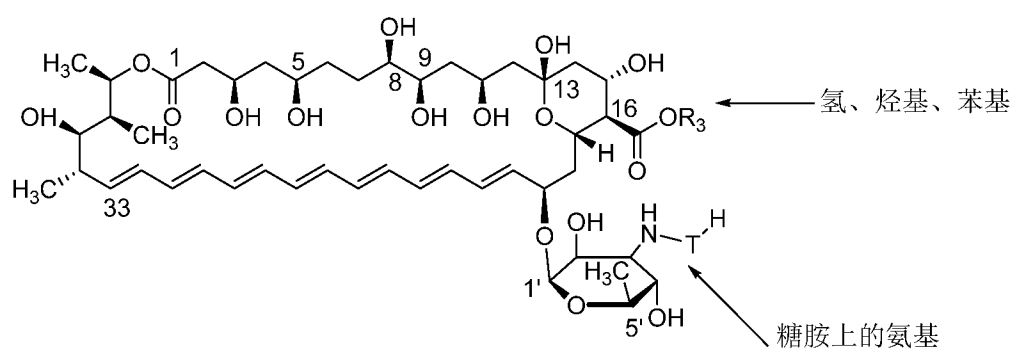


图 2

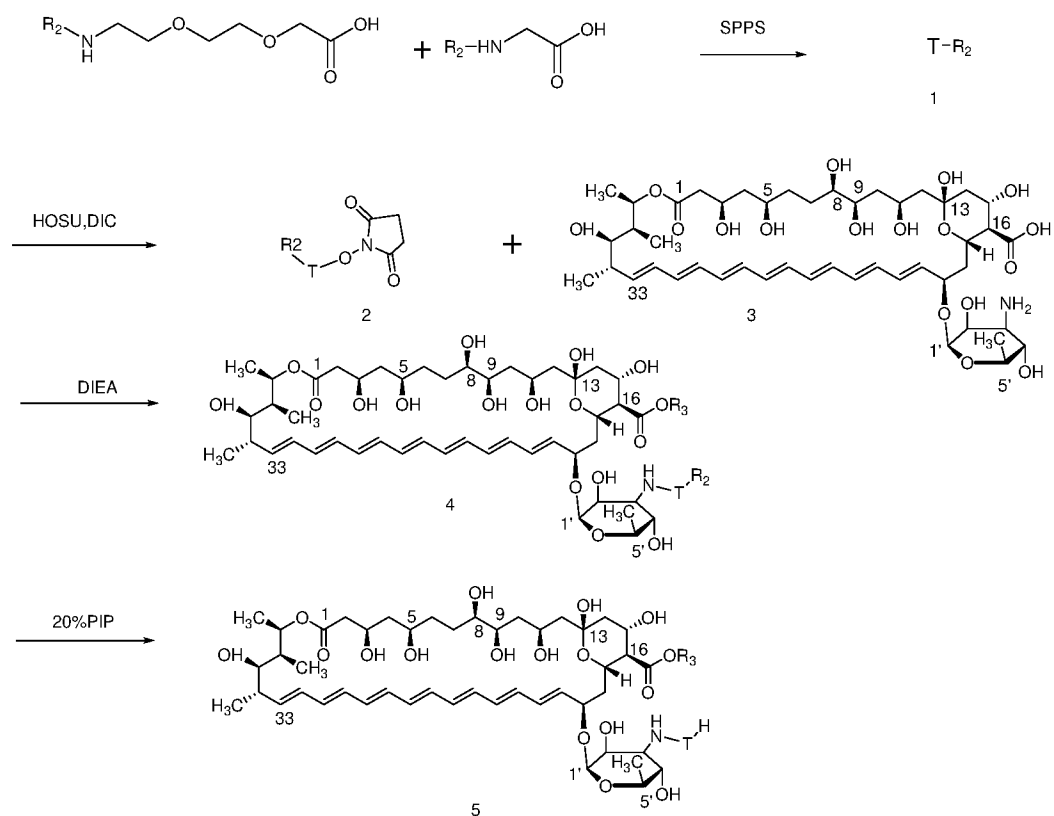


图 3

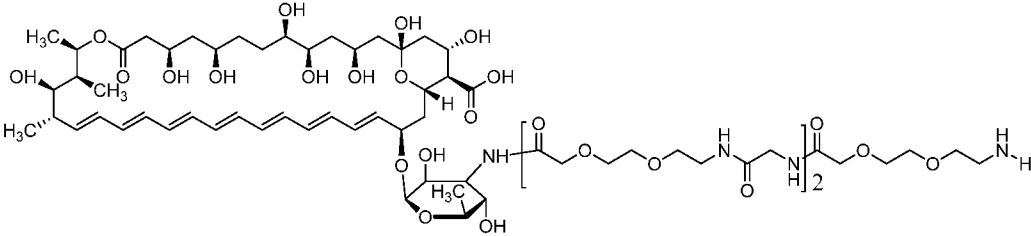
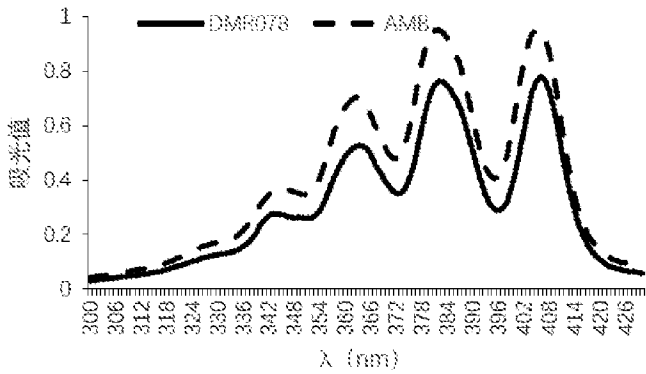
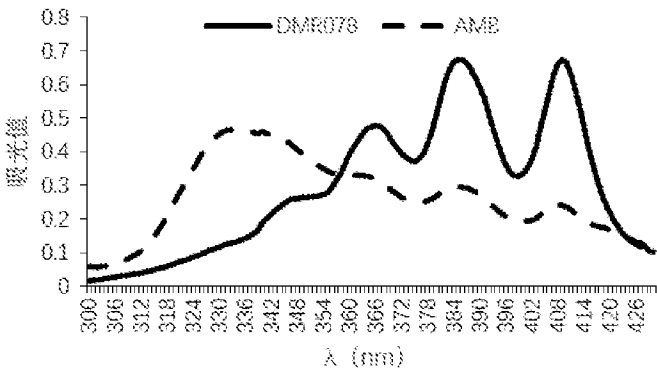


图 4

(A)



(B)



(C)

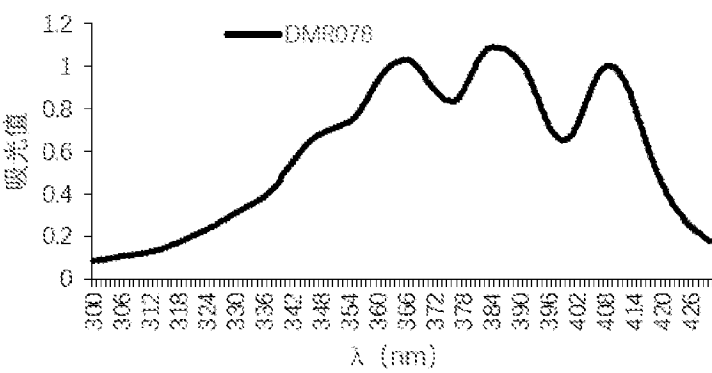


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/124970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 17/08(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 38/04(2006.01)i; A61P 31/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H17/-; A61K31/-; A61K38/-; A61P31/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, WOTXT, EPTXT, USTXT, REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CNKI: 上海医药工业研究院, 正大天晴药业集团股份有限公司, 两性霉素B, 肽, 多肽, 甘氨酸, 多烯, 抗真菌, Amphotericin, AMB, AEEAc, glycine, Gly, peptide, fungal, antifungal, infection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107375939 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 24 November 2017 (2017-11-24) claims 1-2, 4 and 13, and embodiments 1-3	1-20
A	CN 108714151 A (CHANGCHUN INSTITUTE OF APPLIED CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 30 October 2018 (2018-10-30) claims 1 and 4, and embodiments 1-4	1-20
A	WO 03000738 A2 (FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH) 03 January 2003 (2003-01-03) claim 1, and embodiments 1-3	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2020

Date of mailing of the international search report

13 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/124970

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 19 and 20 relate to a subject matter of a method for treating diseases of a human or animal body, and the present search report is made based on a use of a compound or a pharmaceutical salt thereof in the preparation of a drug.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/124970

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
CN	107375939	A	24 November 2017	None		
CN	108714151	A	30 October 2018	None		
WO	03000738	A2	03 January 2003	US	7115576 B2	03 October 2006
				US	2004180858 A1	16 September 2004
				DE	10129369 C1	06 March 2003
				CN	1596129 A	16 March 2005
				AU	2002328294 A1	08 January 2003
				EP	1397162 A2	17 March 2004
				JP	2004534086 A	11 November 2004
				CA	2446205 A1	03 January 2003
				PL	366438 A1	07 February 2005
				WO	03000738 A3	28 August 2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/124970

A. 主题的分类

C07H 17/08(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 38/04(2006.01)i; A61P 31/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H17/-; A61K31/-; A61K38/-; A61P31/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPDOC, CNPAT, WOTXT, EPTXT, USTXT, REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CNKI: 上海医药工业研究院, 正大天晴药业集团股份有限公司, 两性霉素B, 肽, 多肽, 甘氨酸, 多烯, 抗真菌, Amphotericin, AMB, AEEAc, glycine, Gly, peptide, fungal, antifungal, infection

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107375939 A (中国药科大学) 2017年 11月 24日 (2017 - 11 - 24) 权利要求1-2、4和13, 实施例1-3	1-20
A	CN 108714151 A (中国科学院长春应用化学研究所) 2018年 10月 30日 (2018 - 10 - 30) 权利要求1、4, 实施例1-4	1-20
A	WO 03000738 A2 (FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH) 2003年 1月 3日 (2003 - 01 - 03) 权利要求1, 实施例1-3	1-20

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 2月 27日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

云益鸣

电话号码 86-(10)-53962157

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 19-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求19-20涉及对人体或动物体的疾病治疗方法的主题，本检索报告是基于化合物或其药用盐在制备药物中的应用做出的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/124970

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
CN	107375939	A	2017年 11月 24日	无		
CN	108714151	A	2018年 10月 30日	无		
WO	03000738	A2	2003年 1月 3日	US	7115576	B2 2006年 10月 3日
				US	2004180858	A1 2004年 9月 16日
				DE	10129369	C1 2003年 3月 6日
				CN	1596129	A 2005年 3月 16日
				AU	2002328294	A1 2003年 1月 8日
				EP	1397162	A2 2004年 3月 17日
				JP	2004534086	A 2004年 11月 11日
				CA	2446205	A1 2003年 1月 3日
				PL	366438	A1 2005年 2月 7日
				WO	03000738	A3 2003年 8月 28日