



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117683084 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202311701040.4

A61K 47/55 (2017. 01)

(22) 申请日 2023. 12. 12

A61K 38/08 (2019. 01)

(71) 申请人 中南大学

A61K 41/00 (2020. 01)

地址 410083 湖南省长沙市岳麓区麓山南路932号

A61P 31/04 (2006. 01)

(72) 发明人 曾文彬 范多阳 陈飞 刘小辉
董界 罗子恒 李艳冰

(74) 专利代理机构 长沙永星专利商标事务所
(普通合伙) 43001

专利代理师 彭红梅

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006. 01)

C07K 1/107 (2006. 01)

C07K 1/16 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

权利要求书5页 说明书16页

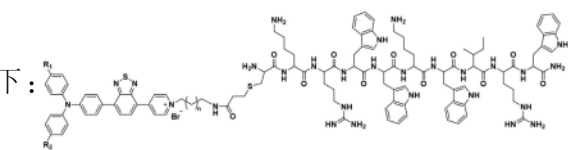
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

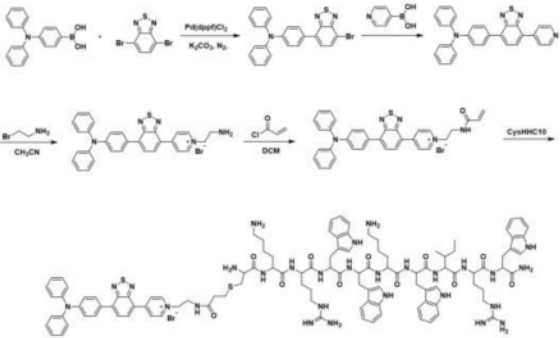
一种新型多肽偶联药物化合物及其制备方法与应用

(57) 摘要

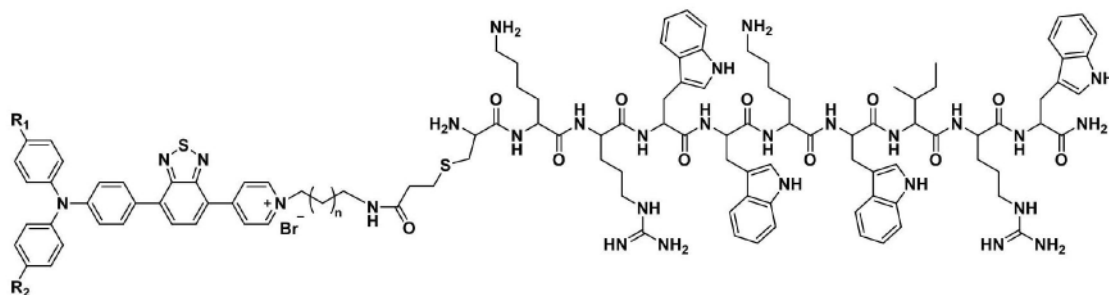
本发明公开了一种新型多肽偶联药物化合物及其制备方法和应用。该化合物的结构通式如下：



其中：R1和R2均任选自氢、甲基、甲氧基、氯、溴、碘；n任选自0、2、4、6、8。该化合物利用抗菌肽与光敏基团的光动力杀菌效应协同作用，达到了对革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌的高效广谱抗菌效果，MIC至少可达62.5nM。同时，光敏基团的引入还赋予了该化合物聚集诱导发光特性，实现了对细菌的近红外免洗成像。该化合物在细菌成像、抗细菌感染方面具有广阔的应用前景。本发明提供的多肽偶联药物化合物的制备方法简单、原料便宜易得、合成工艺简便、分离纯化容易，适合规模化生产以及推广运用。



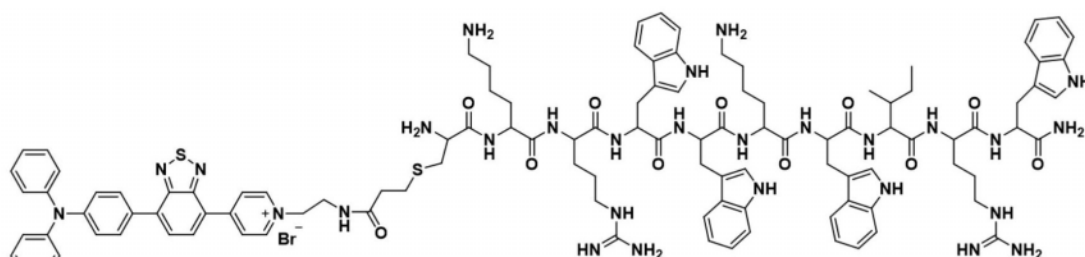
1. 一种多肽偶联药物化合物,其特征在于,所述化合物具有如下式所示结构通式:



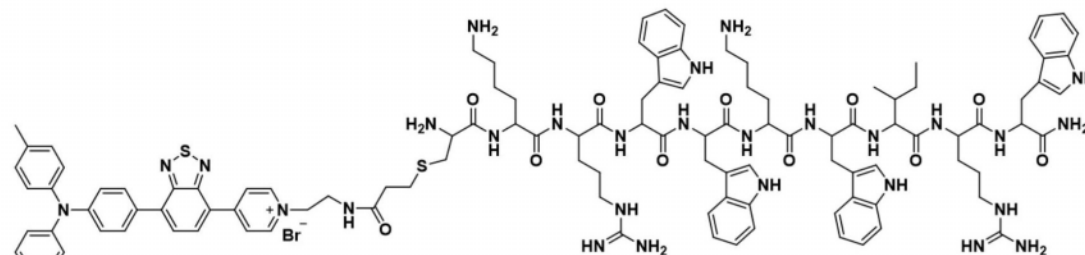
TPI-CysHHC10

其中,R1和R2均任选自:氢、甲基、甲氧基、氯、溴、碘;n任选自0、2、4、6、8。

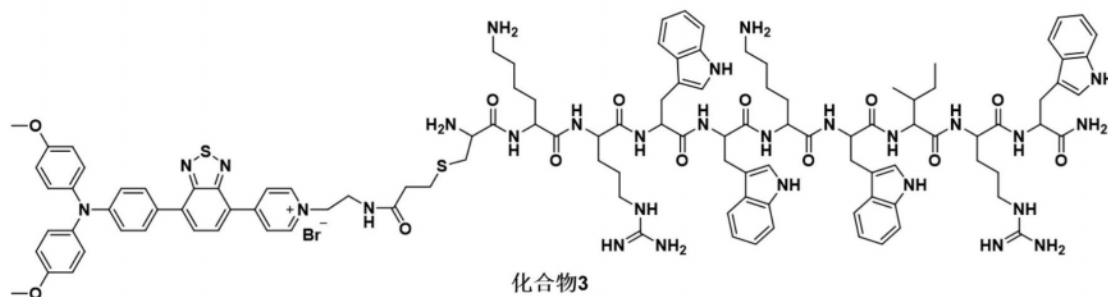
2. 如权利要求1所述的多肽偶联药物化合物,其特征在于,所述多肽偶联药物化合物的结构式为如以下化合物1~12中所示结构式的任意一种:



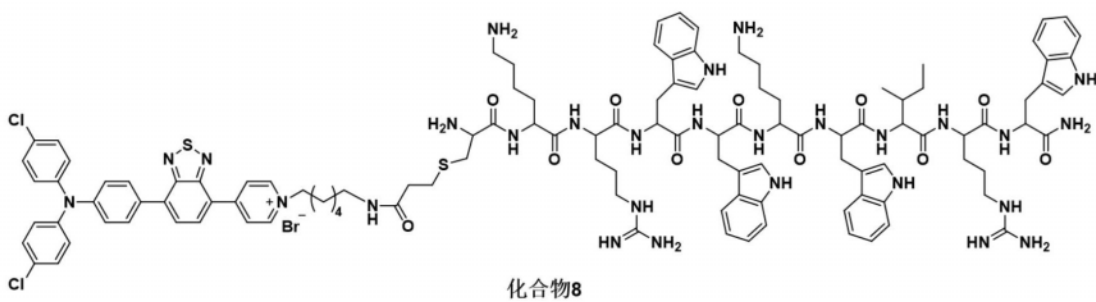
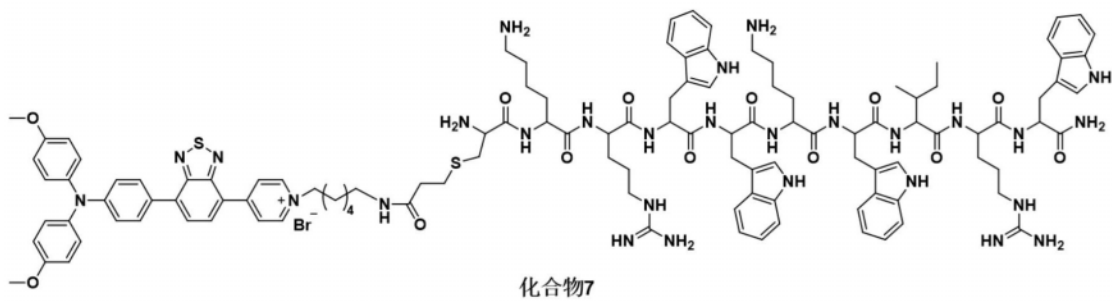
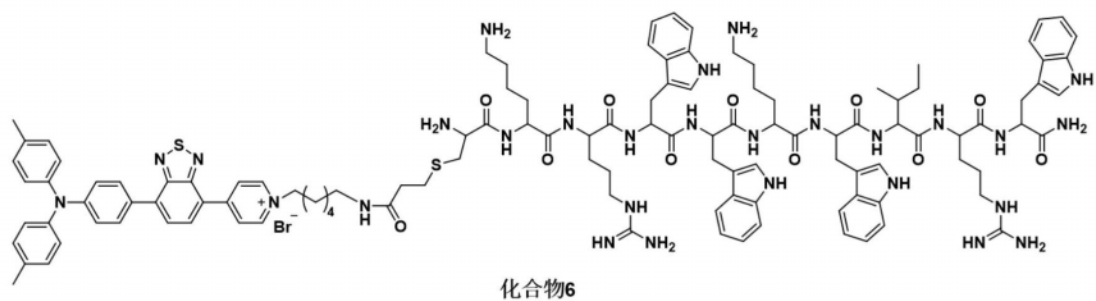
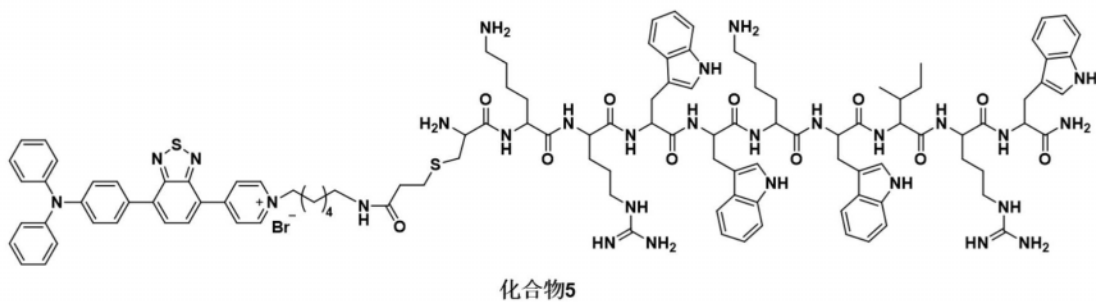
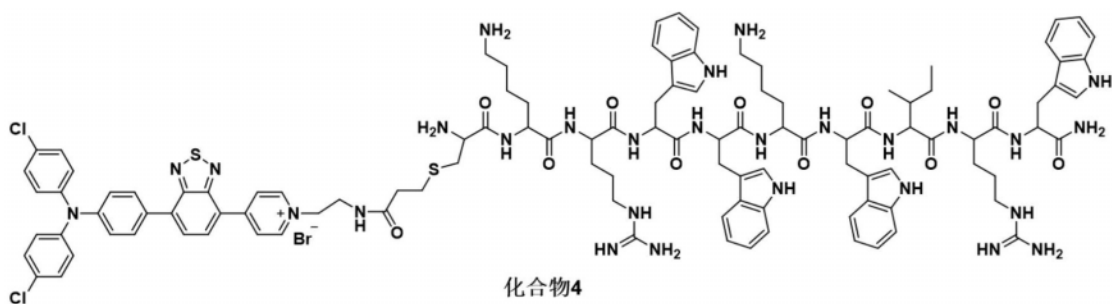
化合物1

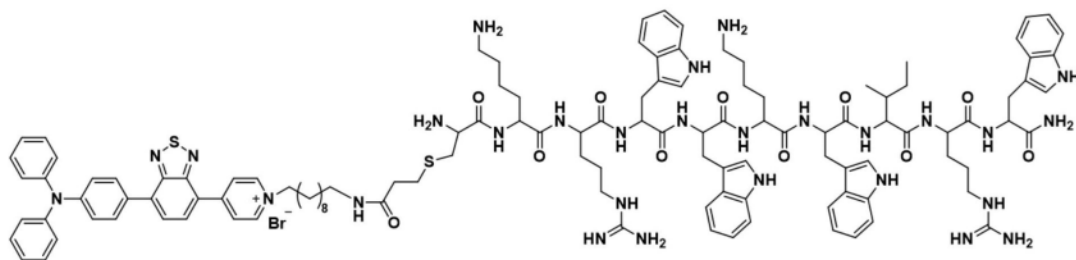


化合物2

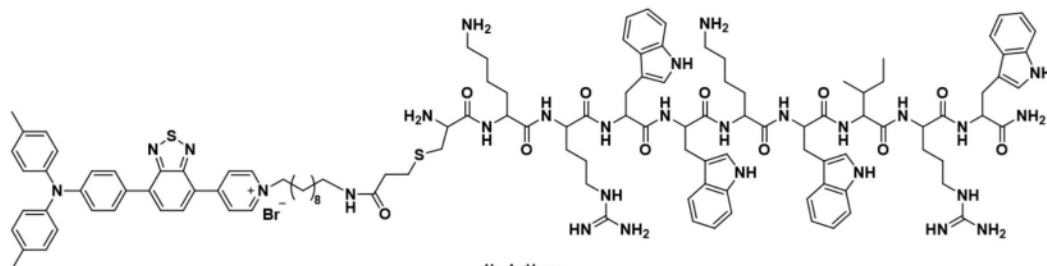


化合物3

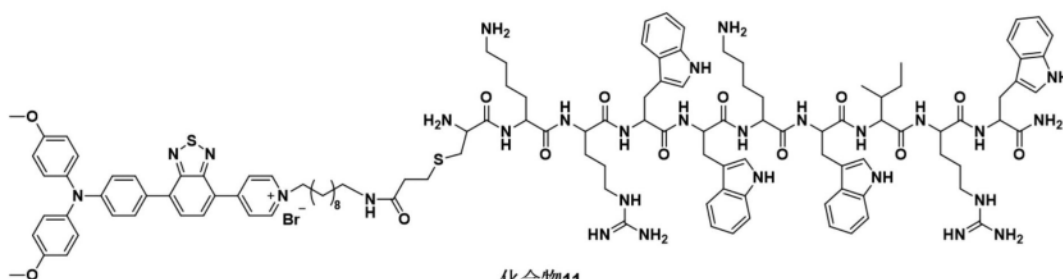




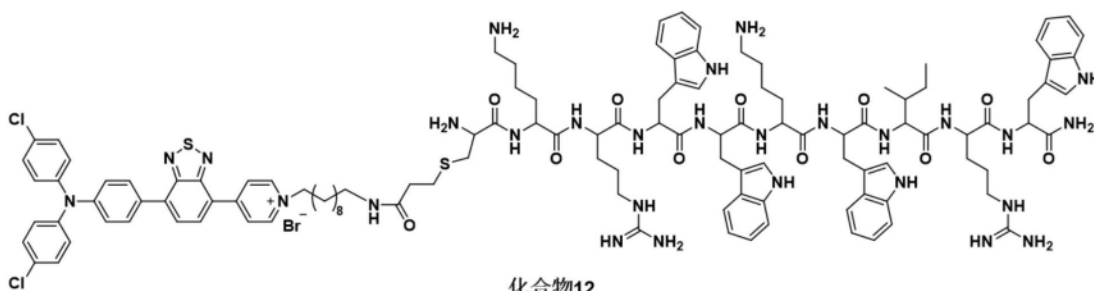
化合物9



化合物10



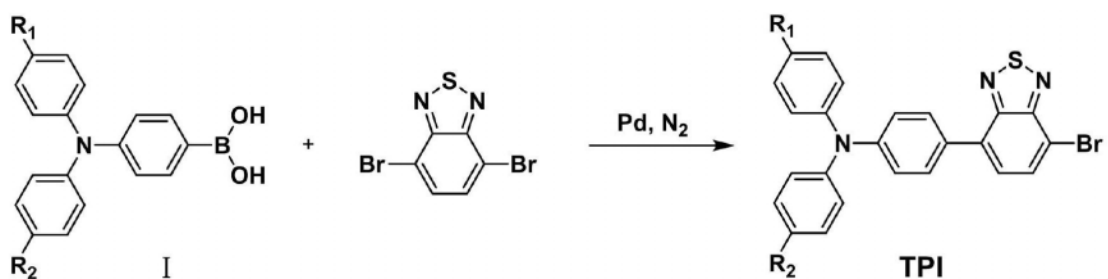
化合物11



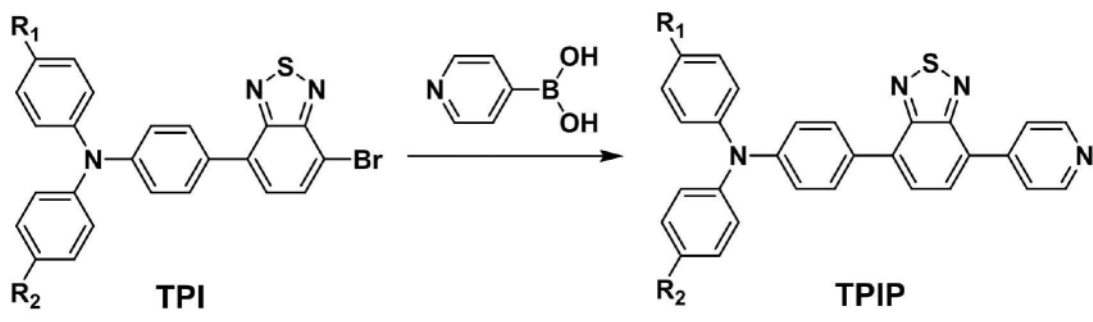
化合物12

3. 一种如权利要求1所述的多肽偶联药物化合物的制备方法,包括以下步骤:

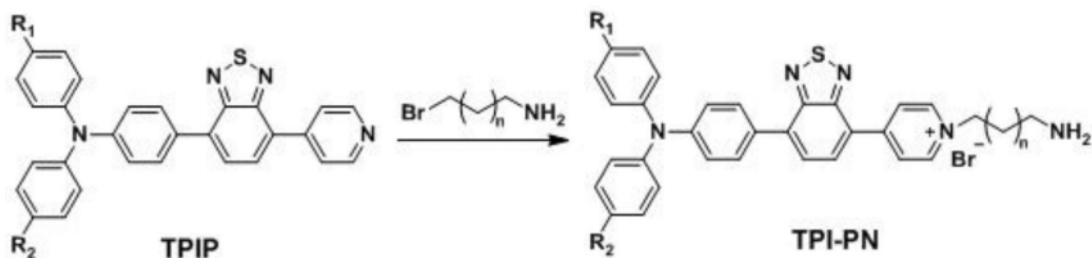
(1) 化合物TPI的合成:将式I所示取代4-硼酸三苯胺、4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑、碱、钯催化剂和溶剂的混合物于氮气保护下反应,反应结束后冷却至室温,然后将反应液倒入水中,然后分离纯化得到化合物TPI;合成路线如下:



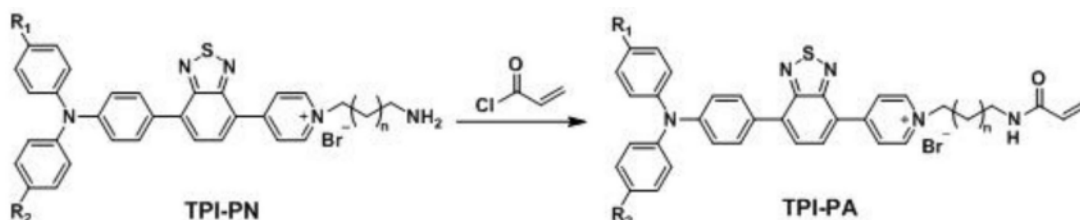
(2) 化合物TPIP的合成:将化合物TPI、吡啶-4-硼酸、碱、钯催化剂和溶剂的混合物于氮气保护下反应,反应结束后冷却至室温,然后将反应液倒入水中,分离纯化得到化合物TPIP;其合成路线如下:



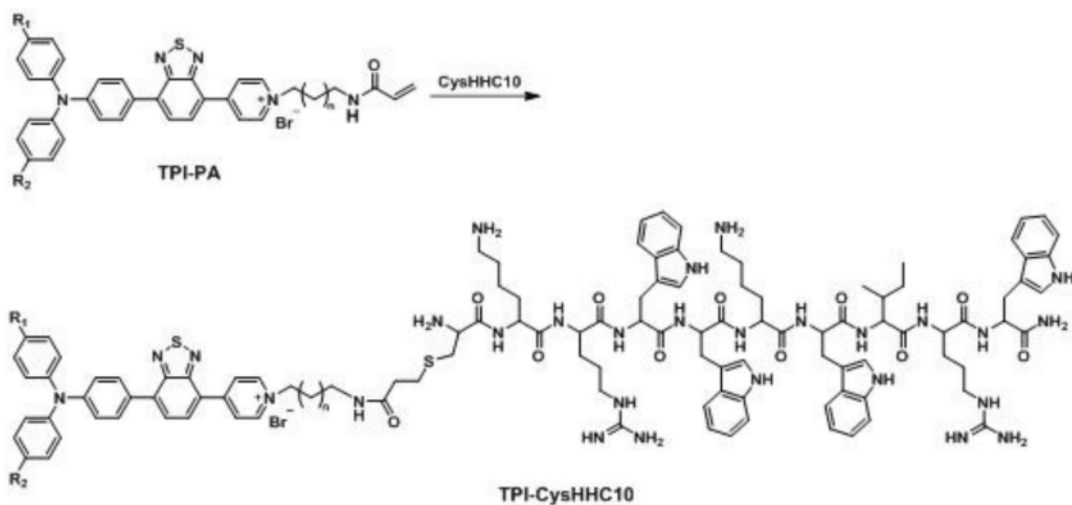
(3) 化合物TPI-PN的合成:将化合物TPIP和溴代胺溶解于溶剂中,回流反应,反应结束后冷却至室温,然后蒸干溶剂,分离纯化得到化合物TPI-PN;其合成路线如下:



(4) 化合物TPI-PA的合成:将化合物TPI-PN和缚酸剂加入溶剂中混合,然后将混合体系冷却至0-5℃,再加入丙烯酰氯搅拌均匀,于室温下反应,TLC监测反应完成后,蒸发溶剂,分离纯化得到化合物TPI-PA;其合成路线如下:



(5) 化合物TPI-CysHHC10的合成:将CysHHC10肽溶解于HEPES缓冲液中,向反应体系中加入含化合物TPI-PA的HEPES缓冲液,室温搅拌反应,反应完成后,真空冻干,分离纯化得到TPI-CysHHC10;其合成路线如下:



4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述溶剂包括四氢呋喃、甲醇和1,4-二氧六环中的至少一种;碱包括碳酸钾、碳酸铯中的至少一种;钯催化剂包括[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)中的至少一种;取代4-硼酸三苯胺与溶剂的摩尔体积比为1:(3~4)mmol/mL,取代4-硼酸三苯胺与4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑的投料摩尔比为1:(1~2),取代4-硼酸三苯胺与钯催化剂的投料摩尔比为1:(0.01-0.02),取代4-硼酸三苯胺与碱的投料摩尔比为1:(1~1.5),反应温度为80-120℃,反应时间为6~8h。

5. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述溶剂包括四氢呋喃、甲醇和1,4-二氧六环中的至少一种;碱包括碳酸钾、碳酸铯中的至少一种;钯催化剂包括[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)中的至少一种;化合物TPI与溶剂的摩尔体积比为1:(2.5~4)mmol/mL,化合物TPI与吡啶-4-硼酸的投料摩尔比为1:(1~2),化合物TPI与钯催化剂的投料摩尔比为1:(0.01-0.02),化合物TPI与碱的投料摩尔比为1:(1~1.5),反应温度为80-120℃,反应时间为15~20h。

6. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述化合物TPIP与溶剂的摩尔体积比为1:(3~4)mmol/mL,化合物TPIP与溴代胺的投料摩尔比为1:(1~2);回流反应温度为80-120℃,反应时间为4~6h;所述溶剂为CH₃CN;所述分离纯化采用高效液相色谱法。

7. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述化合物TPI-PN与溶剂的摩尔体积比为1:(15~20)mmol/mL,化合物TPI-PN与丙烯酰氯的投料摩尔比为1:(2~3),化合物TPI-PN与缚酸剂的投料摩尔比为1:(2~3);所述缚酸剂为三乙胺;反应时间为8~12h;所述溶剂为无水CH₂Cl₂;所述分离纯化采用硅胶柱层析法。

8. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(5)中,所述化合物TPI-PA与CysHHC10肽的投料摩尔比为1~1.5:1;所述CysHHC10肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,具体为CKRWKKWIRW-NH₂;反应时间为8~12h;所述分离纯化采用高效液相色谱法。

9. 如权利要求1~2任一项所述多肽偶联药物化合物或如权利要求3~8任一项所述制备方法制得的多肽偶联药物化合物在细菌免洗成像、细菌聚集诱导、细菌近红外荧光成像或在作为制备广谱抗菌药物中的应用。

10. 一种抗菌药物,其特征在于,所述抗菌药物包含如权利要求1~2任一项所述多肽偶联药物化合物或如权利要求3~8任一项所述制备方法制得的多肽偶联药物化合物。

一种新型多肽偶联药物化合物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于有机合成与生物医药技术领域,具体涉及一种新型多肽偶联药物化合物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 细菌感染对全球健康构成严重威胁,每年造成数百万人死亡。然而抗生素新药研发停滞不前,近年来几乎没有新的抗生素类药物上市。由于抗生素的误用和滥用,细菌耐药现象愈演愈烈,当越来越多的“超级细菌”不断出现时,人们将面临着无药可用的境地,因此发展新型不易引起耐药的抗菌药物是极为迫切的任务。

[0003] 抗菌肽(AMPs)有着传统抗生素无可比拟的优势,其抗菌机制独特,杀菌作用迅速且不易引发细菌的耐药性,是一类极具潜力的抗菌药物。其最广泛的作用机制是增加渗透性或破坏细菌膜,导致细菌内容物外渗,导致细菌死亡。专利CN 112625106B报道了一种基于抗菌肽polybia-MPI的Sar修饰的抗菌多肽化合物,具有高稳定性和高抗菌活性的优点;专利CN 117024607A报道了一种由细胞穿透肽与炎症抑制肽通过偶联获得的抗菌肽,可以用于普通感染和一些顽固性感染;专利CN 117050148A报道了一种抗菌肽MAP34-B,基于此抗菌肽制备的产品可以抑制多种微生物。然而这些抗菌肽均缺乏细菌检测与抗菌过程可视化的功能。

[0004] 此外,光动力抗菌疗法作为一种有效的杀菌策略正在兴起。主要原理是利用光敏剂在光线照射后产生的ROS破坏细菌细胞膜,或对细菌内部的蛋白质和核酸造成不可逆的损伤,从而达到抗菌的目的。同时光敏剂通常还具有荧光成像功能。大多数已报道的光动力抗菌剂对于革兰氏阳性菌有不错的杀菌效果,但对于具有内外两层膜结构保护革兰氏阴性菌及相关耐药菌杀菌效果并不理想。另外,大部分光敏剂都是疏水性的,这限制了其应用范围。

[0005] 多肽偶联药物是一类将具有一定生物功能的多肽与功能性分子通过连接键连接而得的偶联物。因此,开发一种具有高效广谱抗菌效果、同时具有可视化细菌检测和抗菌过程功能的新型多肽偶联药物化合物是具有重要意义的。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种具有高效光动力抗菌活性、高生物相容性和具有可视化细菌检测和抗菌过程功能的新型多肽偶联药物化合物。

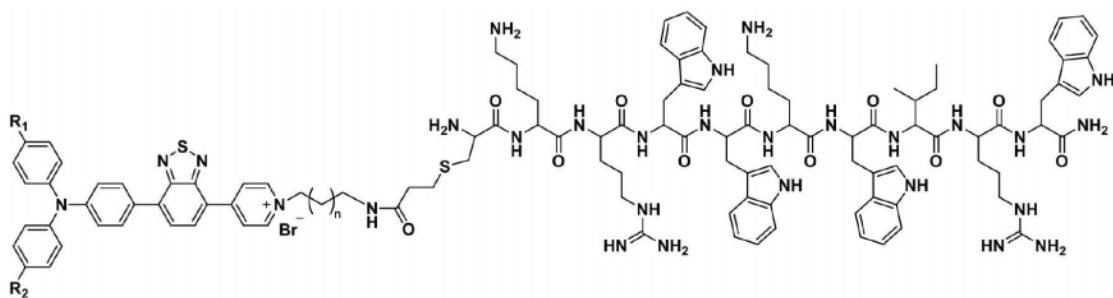
[0007] 本发明的目的之二在于提供所述多肽偶联药物化合物的制备方法。

[0008] 本发明的目的之三在于提供所述多肽偶联药物化合物的应用。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

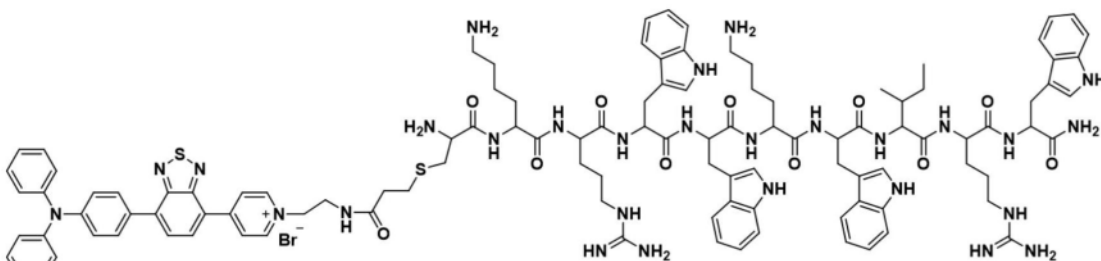
[0010] 第一方面,本发明提供的这种多肽偶联药物化合物(TPI-CysHHC10),其具有如下式所示结构通式:

[0011]

**TPI-CysHHC10**

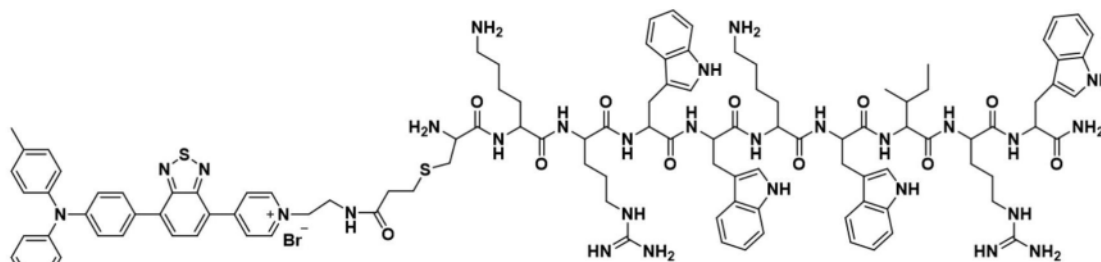
[0012] 其中, R_1 和 R_2 均任选自: 氢、甲基、甲氧基、氯、溴、碘; n 任选自 0、2、4、6、8。

[0013] 优选的, 所述多肽偶联药物化合物的结构式为如以下化合物 1 ~ 12 中所示结构式的任意一种:



化合物1

[0014]

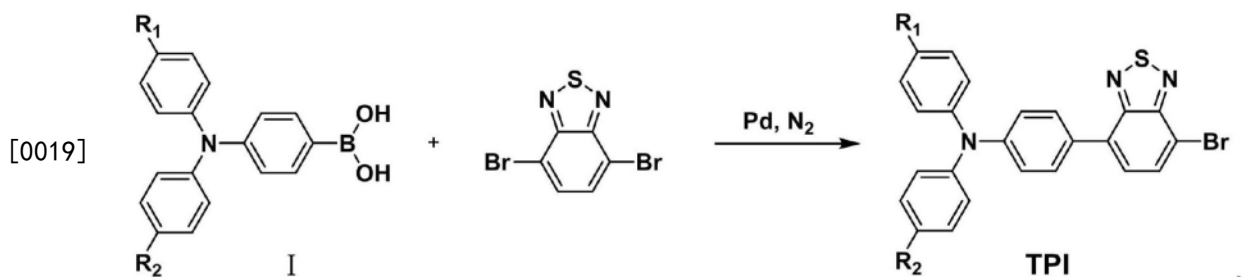


化合物2

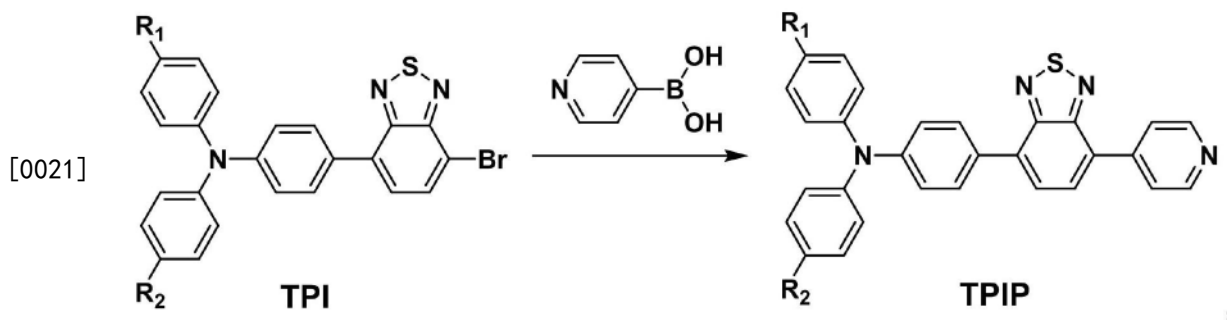




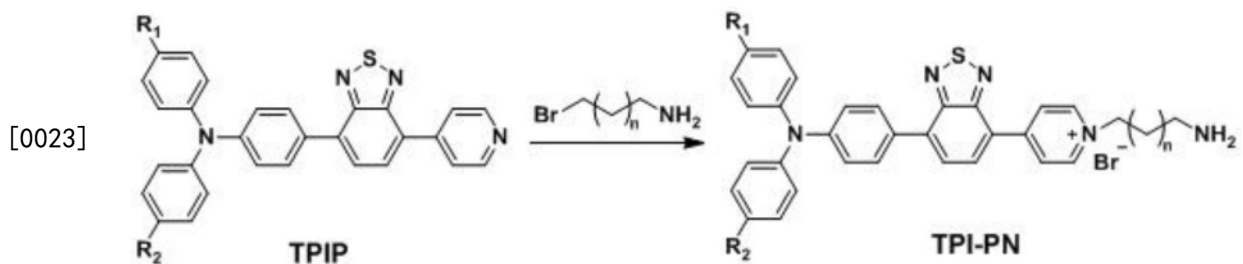
[0018] (1) 化合物TPI的合成:将式I所示取代4-硼酸三苯胺、4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑、碱、钯催化剂和溶剂的混合物于氮气保护下反应,反应结束后冷却至室温,然后将反应液倒入水中,然后分离纯化得到化合物TPI;合成路线如下:



[0020] (2) 化合物TPIP的合成:将化合物TPI、吡啶-4-硼酸、碱、钯催化剂和溶剂的混合物于氮气保护下反应,反应结束后冷却至室温,然后将反应液倒入水中,分离纯化得到化合物TPIP;其合成路线如下:

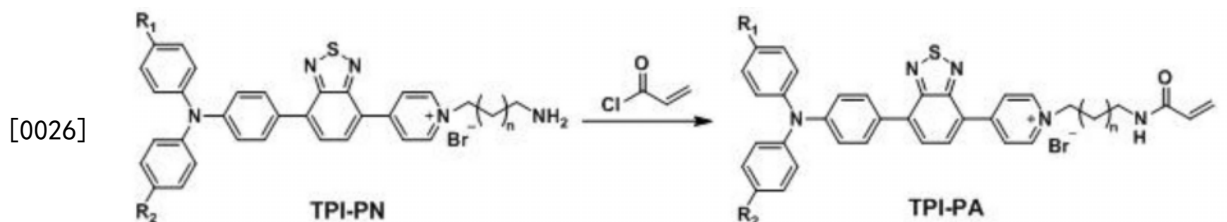


[0022] (3) 化合物TPI-PN的合成:将化合物TPIP和溴代胺溶解于溶剂中,回流反应,反应结束后冷却至室温,然后蒸干溶剂,分离纯化得到化合物TPI-PN;其合成路线如下:

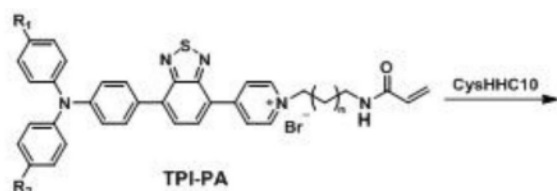


[0024] 其中n选自于0,2,4,6,8;

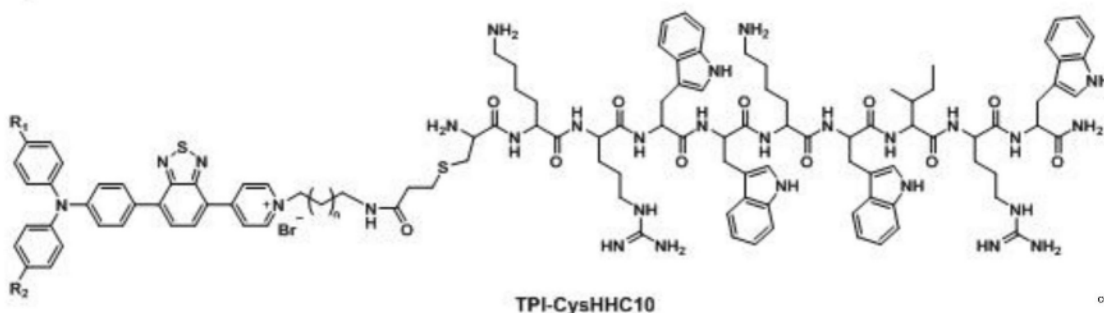
[0025] (4) 化合物TPI-PA的合成:将化合物TPI-PN和缚酸剂加入溶剂中混合,然后将混合体系冷却至0-5℃,再加入丙烯酰氯搅拌均匀,于室温下反应,TLC监测反应完成后,蒸发溶剂,分离纯化得到化合物TPI-PA;其合成路线如下:



[0027] (5) 化合物TPI-CysHHC10的合成:将CysHHC10肽溶解于HEPES缓冲液中,向反应体系中加入含化合物TPI-PA的HEPES缓冲液,室温搅拌反应,反应完成后,真空冻干,分离纯化得到TPI-CysHHC10;其合成路线如下:



[0028]



[0029] 优选的,步骤(1)中,所述溶剂可为四氢呋喃、甲醇和1,4-二氧六环等有机溶剂;碱可为碳酸钾、碳酸铯等;钯催化剂可为[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)等;取代4-硼酸三苯胺与溶剂的摩尔体积比为1:(3~4)mmol/mL,取代4-硼酸三苯胺与4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑的投料摩尔比为1:(1~2),取代4-硼酸三苯胺与钯催化剂的投料摩尔比为1:(0.01~0.02),取代4-硼酸三苯胺与碱的投料摩尔比为1:(1~1.5),反应温度为80-120℃,反应时间为6~8h。

[0030] 优选的,步骤(1)中,所述分离纯化包括:先用CH₂Cl₂萃取得到有机层,然后将有机层用无水Na₂SO₄干燥并在旋转蒸发仪上旋干,再使用硅胶柱层析分离纯化;所述硅胶柱层析分离纯化时采用的洗脱剂为石油醚/二氯甲烷=20/1,v/v。

[0031] 优选的,步骤(2)中,所述溶剂可为四氢呋喃、甲醇和1,4-二氧六环等有机溶剂;碱可为碳酸钾、碳酸铯等;钯催化剂可为[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)、四(三苯基膦)钯(0)等;化合物TPI与溶剂的摩尔体积比为1:(2.5~4)mmol/mL,化合物TPI与吡啶-4-硼酸的投料摩尔比为1:(1~2),化合物TPI与钯催化剂的投料摩尔比为1:(0.01~0.02),化合物TPI与碱的投料摩尔比为1:(1~1.5),反应温度为80-120℃,反应时间为15~20h。

[0032] 优选的,步骤(2)中,所述分离纯化包括:先用CH₂Cl₂萃取得到有机层,然后将有机层用无水Na₂SO₄干燥并在旋转蒸发仪上旋干,再使用硅胶柱层析进行分离纯化;所述硅胶柱层析分离纯化时采用的洗脱剂为二氯甲烷。

[0033] 优选的,步骤(3)中,所述化合物TPIP与溶剂的摩尔体积比为1:(3~4)mmol/mL,化合物TPIP与溴代胺的投料摩尔比为1:(1~2);回流反应温度为80-120℃,反应时间为4~6h;所述溶剂为CH₃CN;所述分离纯化采用高效液相色谱法。

[0034] 优选的,步骤(4)中,所述化合物TPI-PN与溶剂的摩尔体积比为1:(15~20)mmol/mL,化合物TPI-PN与丙烯酰氯的投料摩尔比为1:(2~3),化合物TPI-PN与缚酸剂的投料摩尔比为1:(2~3);反应时间为8~12h;所述溶剂为无水CH₂Cl₂;所述分离纯化采用硅胶柱层析法。

[0035] 进一步优选的,步骤(4)中,所述缚酸剂为三乙胺,用于降低反应体系的酸度。

[0036] 优选的,步骤(5)中,所述化合物TPI-PA与CysHHC10肽的投料摩尔比为(1~1.5):1;所述CysHHC10肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,具体为CKRWWKWIRW-NH₂;反应时间为8~12h;所述分离纯化采用高效液相色谱法。

[0037] 第三方面,本发明还提供一种所述多肽偶联药物化合物在细菌免洗成像、细菌聚集诱导、细菌近红外荧光成像或在作为制备广谱抗菌药物中的应用。

[0038] 所述多肽偶联药物化合物可用于细菌快速免洗成像,对细菌膜具有清晰成像效果。

[0039] 所述多肽偶联药物化合物在一定条件下可诱导革兰氏阴性菌发生聚集现象,增强光动力抗菌效果。

[0040] 本发明的有益效果是:

[0041] 1、本发明通过生物正交反应将光敏剂与抗菌肽共价偶联,巧妙融合光敏基团的光动力抗菌效应与抗菌肽的抗菌机制,实现了对耐药菌的近红外荧光成像,同时达到了广谱高效抗菌效果。本发明的多肽偶联药物化合物具有抗菌活性高、生物相容性好等优点。

[0042] 2、本发明提供的多肽偶联药物化合物,通过光敏基团的引入赋予了抗菌肽荧光性质,可作为细菌膜染色试剂,同时能够可视化观察抗菌机制。

[0043] 3、本发明提供的多肽偶联药物化合物还具有聚集诱导发光效应,可有效避免自吸收与生物样本背景荧光的干扰,可用于细菌的近红外荧光成像。

[0044] 4、本发明提供的多肽偶联药物化合物利用抗菌肽与光敏基团的光动力杀菌效应的正协同作用,使得其抗菌活性要高于光敏剂或抗菌肽单独使用时的活性。该多肽偶联药物化合物不仅对革兰氏阳性菌具有高效抗菌活性,且对革兰氏阴性菌的外膜屏障也具有有效的破坏性,能够抑制细菌生物膜生长并破坏清除成熟的细菌生物膜,具有广谱抗菌活性,光照条件下对革兰氏阴性菌的MIC至少可达62.5nM。

[0045] 5、本发明提供的多肽偶联药物化合物的制备方法简单,原料便宜易得、合成工艺简便、分离纯化容易,产率高,适合规模化生产以及推广运用。

附图说明

[0046] 图1为化合物1的化学合成路线。

[0047] 图2为化合物1的AIE效应光谱图。

[0048] 图3为化合物1的单线态氧产生能力评价。

[0049] 图4为化合物1对细菌共聚焦荧光成像图。

[0050] 图5为使用平板计数法评价化合物1对不同细菌的体外抗菌活性。

[0051] 图6为使用平板计数法评价化合物6对不同细菌的体外抗菌活性。

[0052] 图7为使用细菌死活染色法评价化合物1对不同细菌的体外抗菌活性。

[0053] 图8为化合物1细胞毒性评价。

[0054] 图9为化合物1体内抗菌活性表征。

[0055] 图10为化合物1作用下不同细菌的聚集率表征。

[0056] 图11为化合物1溶血性评价。

[0057] 图12为化合物1抗生物膜活性表征。

具体实施方式

[0058] 下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但本发明并不限于以下实施例。所述方法如无特别说明均为常规方法。所述原材料如无特别说明均能从公开商业途径获得。

[0059] 以下实施例中, 试剂THF为四氢呋喃; TFA为三氟乙酸; HEPES为4-羟乙基哌嗪乙磺酸; ABDA为9,10-蒽二基-双(亚甲基)二丙二酸。

[0060] 实施例1合成化合物1, 合成技术路线如图1所示, 具体包括以下步骤:

[0061] 第一步: 化合物TPI(1)的合成

[0062] 4-(二苯胺基)苯硼酸(578mg, 2.00mmol)、4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑(588mg, 2.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)(20mg)、THF(5mL)和MeOH(10mL)的混合物在氮气保护下于90℃回流8h, 然后冷却至室温, 将反应液倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取, 有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干, 硅胶柱层析分离纯化, 石油醚和二氯甲烷(20/1, v/v)洗脱, 得到化合物TPI(1)(594mg, 产率65%)。 ^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.91(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.83(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.56(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.37-7.29(m, 4H), 7.25-7.17(m, 6H), 7.11(dd, $J=11.5, 4.2$ Hz, 2H)。 ^{13}C NMR(101MHz, $CDCl_3$) δ ppm 153.96, 153.15, 148.44, 147.33, 133.55, 132.39, 129.92, 129.83, 129.43, 127.34, 125.05, 123.53, 122.63, 112.19。

[0063] 第二步: 化合物TPIP(1)的合成

[0064] 将化合物TPI(1)(914mg, 2.00mmol)、吡啶-4-硼酸(369mg, 3.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)(20mg)和THF(5mL)的混合物在氮气保护下于90℃回流20h, 冷却至室温后, 倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取。有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干。硅胶柱层析分离纯化, 二氯甲烷洗脱, 得到化合物TPIP(1)(565mg, 产率62%)。 ^1H NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.79(d, $J=5.1$ Hz, 2H), 7.94(d, $J=5.1$ Hz, 2H), 7.90(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.87-7.75(m, 2H), 7.31(t, $J=7.7$ Hz, 4H), 7.22(t, $J=8.7$ Hz, 6H), 7.10(t, $J=7.4$ Hz, 2H)。 ^{13}C NMR(126MHz, $CDCl_3$) δ ppm 154.03, 153.60, 150.17, 148.49, 147.32, 144.70, 134.65, 130.13, 130.10, 129.46, 129.17, 128.98, 126.87, 125.10, 123.58, 123.50, 122.56。

[0065] 第三步: 化合物TPI-PN(1)的合成

[0066] 将化合物TPIP(1)(456mg, 1.00mmol)和2-溴乙胺(307mg, 1.50mmol)溶解于 CH_3CN (4mL)中, 在90℃下搅拌6h。冷却至室温后, 减压蒸干 CH_3CN 。用高效液相色谱法(溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH_3CN)分离纯化混合物, 冻干后得到化合物TPI-PN(1)(产率为43%, 250mg)。 ^1H NMR(500MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 9.08(dd, $J=102.2, 6.6$ Hz, 4H), 8.52(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.11(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.06(d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.39(t, $J=7.8$ Hz, 4H), 7.13(dd, $J=18.2, 8.3$ Hz, 8H), 4.92(t, $J=5.2$ Hz, 3H), 3.61(t, $J=5.3$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR(126MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 153.71, 153.13, 152.67, 148.92, 148.88, 147.02, 145.72, 136.95, 132.83, 131.15, 130.28, 129.40, 127.23, 126.89, 125.46, 124.56, 121.88, 57.88, 55.37。HRMS (m/z): calculated for $C_{31}H_{26}BrN_5S[M-Br]^+$: 500.1904; found: 500.2320。

[0067] 第四步: 化合物TPI-PA(1)的合成

[0068] 将化合物TPI-PN(1)(290mg, 0.50mmol)和三乙胺(115 μ L, 1.00mmol)加入10mL无水 CH_2Cl_2 中。待混合体系冷却至0℃后, 加入丙烯酰氯(80 μ L, 1.0mmol)搅拌均匀。将反应体系从冰水浴中取出, 室温反应10小时。TLC完全监测反应后, 将溶剂减压蒸发, 硅胶柱层析分离纯化, 得到化合物TPI-PA(1)(184mg, 产率58%)。 ^1H NMR(400MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 9.19(d, $J=6.7$ Hz, 2H), 8.92(d, $J=6.5$ Hz, 2H), 8.66(t, 1H), 8.51(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.14-8.01(m, 3H),

7.46-7.34 (m, 4H), 7.22-7.08 (m, 8H), 6.26-6.14 (m, 1H), 6.04 (dd, $J=17.1, 2.1$ Hz, 1H), 5.61 (dd, $J=10.1, 2.1$ Hz, 1H), 4.77 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 3.81 (q, $J=5.6$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ ppm 165.82, 153.71, 153.12, 152.15, 148.90, 147.05, 145.45, 136.79, 132.79, 131.54, 131.13, 130.26, 129.45, 127.19, 126.50, 125.44, 124.53, 121.94, 60.22, 40.89. HRMS(m/z): calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{BrN}_5\text{OS}[\text{M}-\text{Br}]^+$: 554.2010; found: 554.1982.

[0069] 第五步:合成化合物1

[0070] 将CysHHC10 (30mg, 0.02mmol) 溶解于3mL HEPES缓冲液 ($\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}=1:1$, 10mM, pH=8.4) 中。向反应体系中加入含化合物TPI-PA(1) (19mg, 0.03mmol) 的HEPES缓冲液2mL, 室温搅拌10h。反应完成后, 将体系冻干, 高效液相色谱法 (溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH_3CN) 分离纯化, 冻干后得到化合物1 (13mg, 收率32%)。HRMS(m/z): calculated for $\text{C}_{111}\text{H}_{135}\text{BrN}_{28}\text{O}_{11}\text{S}_2[\text{M}-\text{Br}]^+$: 2101.0335; found: $[\text{M}-\text{Br}+\text{H}]^{2+}$: 1051.0133, $[\text{M}-\text{Br}+2\text{H}]^{3+}$: 701.0117, $[\text{M}-\text{Br}+3\text{H}]^{4+}$: 526.0113, $[\text{M}-\text{Br}+4\text{H}]^{5+}$: 421.0105.

[0071] 实施例2合成化合物2, 具体包括以下步骤:

[0072] 第一步:化合物TPI(2)的合成

[0073] 4-硼酸-4', 4'-二甲基三苯胺 (634mg, 2.00mmol)、4, 7-二溴-2, 1, 3-苯并噻二唑 (588mg, 2.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II) (20mg)、THF (5mL) 和MeOH (10mL) 的混合物在氮气保护下于90℃回流8h, 冷却至室温后, 将反应液倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取。有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干, 硅胶柱层析分离纯化, 石油醚和二氯甲烷 (20/1, v/v) 洗脱, 得到化合物TPI(2) (584mg, 产率60%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm 7.90 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.63-7.54 (m, 2H), 7.28-7.23 (m, 2H), 7.11-7.03 (m, 10H), 2.35 (s, 6H)。

[0074] 第二步:化合物TPIP(2)的合成

[0075] 将化合物TPI(2) (972mg, 2.00mmol)、吡啶-4-硼酸 (369mg, 3.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II) (20mg) 和THF (5mL) 的混合物在氮气保护下于90℃回流20h, 冷却至室温后, 倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取。有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干。硅胶柱层析分离纯化用二氯甲烷洗脱, 得到化合物TPIP(2) (630mg, 产率65%)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ ppm 8.69-8.65 (m, 2H), 7.84-7.82 (m, 2H), 7.69-7.64 (m, 2H), 7.63-7.57 (m, 2H), 7.24-7.18 (m, 2H), 7.10-7.00 (m, 9H), 2.33 (d, $J=0.7$ Hz, 6H)。

[0076] 第三步:化合物TPI-PN(2)的合成

[0077] 将化合物TPIP(2) (456mg, 1.00mmol) 和2-溴乙胺 (307mg, 1.50mmol) 溶解于 CH_3CN (4mL) 中, 在90℃下搅拌6h。冷却至室温后, 减压蒸干 CH_3CN 。用高效液相色谱法 (溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH_3CN) 分离纯化混合物, 冻干后得到化合物TPI-PN(2) (322mg, 产率53%)。 ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9.34-9.28 (m, 2H), 8.90-8.85 (m, 2H), 7.96 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.65-7.59 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 2H), 7.11-7.02 (m, 9H), 5.05-4.99 (m, 2H), 3.80 (t, $J=7.9$ Hz, 2H), 3.56-3.46 (m, 2H), 2.35 (d, $J=0.8$ Hz, 6H)。

[0078] 第四步:化合物TPI-PA(2)的合成

[0079] 将化合物TPI-PN(2) (290mg, 0.50mmol) 和三乙胺 (115 μL , 1.00mmol) 加入10mL无水 CH_2Cl_2 中, 待混合体系冷却至0℃后, 加入丙烯酰氯 (80 μL , 1.0mmol) 搅拌均匀。将反应体系从冰水浴中取出, 室温反应10小时。TLC完全监测反应后, 将溶剂减压蒸发, 硅胶柱层析分离纯

化,得到化合物TPI-PA(2) (208mg,产率63%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δppm 9.37-9.25(m, 2H), 8.86(t, J=7.3Hz, 1H), 8.76-8.65(m, 2H), 7.96(d, J=7.5Hz, 1H), 7.75(d, J=7.5Hz, 1H), 7.62-7.58(m, 2H), 7.32-7.26(m, 2H), 7.10-7.02(m, 9H), 6.41-6.30(m, 1H), 5.84(dd, J=10.1, 3.1Hz, 1H), 5.77(dd, J=16.7, 3.1Hz, 1H), 5.23(t, J=7.1Hz, 2H), 3.56(q, J=7.1Hz, 2H), 2.26(d, J=0.8Hz, 6H)。

[0080] 第五步:化合物2的合成

[0081] 将CysHHC10(30mg, 0.02mmol)溶解于3mL HEPES缓冲液(H₂O:DMSO=1:1, 10mM, pH=8.4)中,向反应体系中加入含化合物TPI-PA(2) (19mg, 0.03mmol)的HEPES缓冲液2mL,室温搅拌10h。反应完成后,将体系冻干,高效液相色谱法(溶剂A:含0.1%TFA的水,溶剂B:CH₃CN)分离纯化,冻干后得到紫色粉末,即化合物2(13mg, 收率30%)。HRMS(m/z): calculated for C₁₁₃H₁₃₉BrN₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺:2207.9836; found: [M-Br]⁺:2207.6327。

[0082] 实施例3合成化合物3,具体包括以下步骤:

[0083] 第一步:化合物TPI(3)的合成

[0084] 4-硼酸-4', 4'-二甲氧基三苯胺(699mg, 2.00mmol)、4,7-二溴-2,1,3-苯并噻二唑(588mg, 2.00mmol)、K₂CO₃(200mg)、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)(20mg)、THF(5mL)和MeOH(10mL)的混合物在氮气保护下于90℃回流8h,然后冷却至室温,将反应液倒入水中,然后用CH₂Cl₂萃取,有机层用无水Na₂SO₄干燥并减压蒸干,硅胶柱层析分离纯化,石油醚和二氯甲烷(20/1, v/v)洗脱,得到化合物TPI(3)(584mg, 产率60%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δppm 7.92(d, J=7.5Hz, 1H), 7.70(d, J=7.5Hz, 1H), 7.59-7.55(m, 2H), 7.30-7.27(m, 6H), 6.91-6.85(m, 4H), 3.88(s, 6H)。

[0085] 第二步:化合物TPIP(3)的合成

[0086] 将化合物TPI(3)(1037mg, 2.00mmol)、吡啶-4-硼酸(369mg, 3.00mmol)、K₂CO₃(200mg)、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)(20mg)和THF(5mL)的混合物在氮气保护下于90℃回流20h,冷却至室温后,倒入水中,然后用CH₂Cl₂萃取。有机层用无水Na₂SO₄干燥并减压蒸干,硅胶柱层析分离纯化,二氯甲烷洗脱,得到化合物TPIP(3)(640mg, 产率62%)。¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δppm 8.72-8.58(m, 2H), 7.89(d, J=1.1Hz, 2H), 7.81-7.71(m, 2H), 7.67-7.58(m, 2H), 7.33(dd, J=7.1, 1.0Hz, 6H), 6.92-6.86(m, 4H), 3.90(s, 6H)。

[0087] 第三步:化合物TPI-PN(3)的合成

[0088] 将化合物TPIP(3)(516mg, 1.00mmol)和2-溴乙胺(307mg, 1.50mmol)溶解于CH₃CN(4mL)中,在90℃下搅拌6h,冷却至室温后,减压蒸干CH₃CN,用高效液相色谱法(溶剂A:含0.1%TFA的水,溶剂B:CH₃CN)分离纯化混合物,冻干后得到化合物TPI-PN(3)(416mg, 产率65%)。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δppm 9.51-9.38(m, 2H), 8.93-8.88(m, 2H), 8.15(d, J=7.5Hz, 1H), 7.85(d, J=7.5Hz, 1H), 7.74-7.66(m, 2H), 7.13-7.02(m, 2H), 6.92-6.75(m, 4H), 6.70-6.64(m, 4H), 5.02(t, J=7.1Hz, 2H), 3.91(d, J=2.4Hz, 8H), 3.42-3.31(m, 2H)。

[0089] 第四步:化合物TPI-PA(3)的合成

[0090] 将化合物TPI-PN(3)(320mg, 0.50mmol)和三乙胺(115μL, 1.00mmol)加入10mL无水CH₂Cl₂中,待混合体系冷却至0℃后,加入丙烯酰氯(80μL, 1.0mmol)搅拌均匀,将反应体系从冰水浴中取出,室温反应10小时,TLC完全监测反应后,将溶剂减压蒸发,硅胶柱层析分离纯化,得到化合物TPI-PA(3)(402mg, 产率58%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δppm 9.29-9.21(m,

2H), 8.85 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 8.67-8.65 (m, 2H), 7.73 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.54 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.41-7.2 (m, 2H), 7.16-7.04 (m, 2H), 6.98-6.74 (m, 4H), 6.56-6.42 (m, 4H), 6.22 (dd, $J=16.8, 10.1\text{Hz}$, 1H), 5.85 (dd, $J=10.1, 3.1\text{Hz}$, 1H), 5.63 (dd, $J=16.7, 3.1\text{Hz}$, 1H), 5.13 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.88 (m, 8H) .

[0091] 第五步:化合物3的合成

[0092] 将CysHHC10 (30mg, 0.02mmol) 溶解于3mL HEPES缓冲液 ($\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}=1:1$, 10mM, pH=8.4) 中, 向反应体系中加入含化合物TPI-PA (3) (21mg, 0.03mmol) 的HEPES缓冲液2mL, 室温搅拌10h。反应完成后, 将体系冻干, 高效液相色谱法 (溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH_3CN) 分离纯化, 冻干后得到紫色粉末, 即化合物3 (16mg, 收率35%)。HRMS (m/z): calculated for $\text{C}_{113}\text{H}_{139}\text{BrN}_{28}\text{O}_{13}\text{S}_2[\text{M}-\text{Br}]^+$: 2239.9735; found: $[\text{M}-\text{Br}]^+$: 2239.5627.

[0093] 实施例4合成化合物4, 具体包括以下步骤:

[0094] 第一步: 化合物TPI (4) 的合成

[0095] 4-硼酸-4', 4'-二氯三苯胺 (716mg, 2.00mmol)、4, 7-二溴-2, 1, 3-苯并噻二唑 (588mg, 2.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯 (II) (20mg)、THF (5mL) 和MeOH (10mL) 的混合物在氮气保护下于90℃回流8h, 冷却至室温后, 将反应液倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取, 有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干。硅胶柱层析分离纯化, 石油醚和二氯甲烷 (20/1, v/v) 洗脱, 得到化合物TPI (4) (727mg, 产率69%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δppm 8.21 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 8.03 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.52-7.46 (m, 2H), 7.22-7.10 (m, 10H) .

[0096] 第二步: 化合物TPIP (4) 的合成

[0097] 将化合物TPI (4) (1054mg, 2.00mmol)、吡啶-4-硼酸 (369mg, 3.00mmol)、 K_2CO_3 (200mg)、[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯 (II) (20mg) 和THF (5mL) 的混合物在氮气保护下于90℃回流20h, 冷却至室温后, 倒入水中, 然后用 CH_2Cl_2 萃取, 有机层用无水 Na_2SO_4 干燥并减压蒸干, 硅胶柱层析分离纯化, 二氯甲烷洗脱, 得到化合物TPIP (4) (578mg, 产率55%)。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δppm 8.87-8.81 (m, 2H), 7.85 (dd, $J=24.5, 7.5\text{Hz}$, 2H), 7.74-7.70 (m, 2H), 7.69-7.63 (m, 2H), 7.03-6.89 (m, 10H) .

[0098] 第三步: 化合物TPI-PN (4) 的合成

[0099] 将化合物TPIP (4) (525mg, 1.00mmol) 和2-溴乙胺 (307mg, 1.50mmol) 溶解于 CH_3CN (4mL) 中, 在90℃下搅拌6h, 冷却至室温后, 减压蒸干 CH_3CN , 用高效液相色谱法 (溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH_3CN) 分离纯化混合物, 冻干后得到化合物TPI-PN (4) (428mg, 产率66%)。 ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δppm 9.34-9.28 (m, 2H), 9.15-9.10 (m, 2H), 7.97 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.69-7.58 (m, 2H), 7.25-7.10 (m, 10H), 5.05-4.95 (m, 2H), 3.87 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 3.53-3.46 (m, 2H) .

[0100] 第四步: 化合物TPI-PA (4) 的合成

[0101] 将化合物TPI-PN (4) (325mg, 0.50mmol) 和三乙胺 (115 μL , 1.00mmol) 加入10mL无水 CH_2Cl_2 中, 待混合体系冷却至0℃后, 加入丙烯酰氯 (80 μL , 1.0mmol) 搅拌均匀, 将反应体系从冰水浴中取出, 室温反应10小时, TLC完全监测反应后, 将溶剂减压蒸发, 硅胶柱层析分离纯化, 得到化合物TPI-PA (4) (218mg, 产率62%)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δppm 9.30-9.25 (m, 2H), 8.96 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 8.46-8.41 (m, 2H), 7.94 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.85 (d, $J=7.5\text{Hz}$,

1H), 7.62-7.56 (m, 2H), 7.21-7.11 (m, 10H), 6.44 (dd, J=16.8, 10.1Hz, 1H), 5.89 (dd, J=10.1, 3.1Hz, 1H), 5.81 (dd, J=16.7, 3.1Hz, 1H), 5.23 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.67 (q, J=7.1Hz, 2H).

[0102] 第五步: 化合物4的合成

[0103] 将CysHHC10 (30mg, 0.02mmol) 溶解于3mL HEPES缓冲液 (H₂O:DMSO=1:1, 10mM, pH=8.4) 中, 向反应体系中加入含化合物TPI-PA (4) (21mg, 0.03mmol) 的HEPES缓冲液2mL, 室温搅拌10h, 反应完成后, 将体系冻干, 高效液相色谱法 (溶剂A: 含0.1% TFA的水, 溶剂B: CH₃CN) 分离纯化, 冻干后得到紫色粉末, 即化合物4 (14mg, 收率32%)。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₁H₁₃₃BrCl₂N₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2247.8744; found: [M-Br]⁺: 2247.7327.

[0104] 实施例5合成化合物5

[0105] 化合物5的合成参考实施例1, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的6-溴己胺, 其余反应条件和方式同实施例1。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₅H₁₄₃BrN₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2236.0149; found: [M-Br]⁺: 2236.1372.

[0106] 实施例6合成化合物6

[0107] 化合物6的合成参考实施例2, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的6-溴己胺, 其余反应条件和方式同实施例2。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₇H₁₄₇BrN₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2264.0462; found: [M-Br]⁺: 2264.2931.

[0108] 实施例7合成化合物7

[0109] 化合物7的合成参考实施例3, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的6-溴己胺, 其余反应条件和方式同实施例3。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₇H₁₄₇BrN₂₈O₁₃S₂[M-Br]⁺: 2296.0361; found: [M-Br]⁺: 2296.6382.

[0110] 实施例8合成化合物8

[0111] 化合物8的合成参考实施例4, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的6-溴己胺, 其余反应条件和方式同实施例4。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₅H₁₄₁BrCl₂N₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2303.9370; found: [M-Br]⁺: 2303.8628.

[0112] 实施例9合成化合物9

[0113] 化合物9的合成参考实施例1, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的10-溴癸胺, 其余反应条件和方式同实施例1。HRMS (m/z): calculated for C₁₁₉H₁₅₁BrN₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2292.0775; found: [M-Br]⁺: 2292.1794.

[0114] 实施例10合成化合物10

[0115] 化合物10的合成参考实施例2, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的10-溴癸胺, 其余反应条件和方式同实施例2。HRMS (m/z): calculated for C₁₂₁H₁₅₅BrN₂₈O₁₁S₂[M-Br]⁺: 2320.1088; found: [M-Br]⁺: 2320.2619.

[0116] 实施例11合成化合物11

[0117] 化合物11的合成参考实施例3, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的10-溴癸胺, 其余反应条件和方式同实施例3。HRMS (m/z): calculated for C₁₂₁H₁₅₅BrN₂₈O₁₃S₂[M-Br]⁺: 2352.0987; found: [M-Br]⁺: 2352.4216.

[0118] 实施例12合成化合物12

[0119] 化合物12的合成参考实施例4, 将第三步中的2-溴乙胺替换成等摩尔量的10-溴癸

胺,其余反应条件和方式同实施例4。HRMS(m/z):calculated for $C_{119}H_{149}BrCl_2N_{28}O_{11}S_2[M-Br]^+$:2359.9996;found: $[M-Br]^+$:2359.8034.

[0120] 实施例13化合物1的AIE效应验证

[0121] 将化合物1溶解于去离子水中制得母液(10mM)。将母液用去离子水稀释至浓度为20 μ M,并于紫外-可见分光光度计下扫描,得到其吸收光谱,并测得其最大吸收波长。将母液用不同体积比的水和1,4-二氧六环混合溶剂(含1,4-二氧六环0%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%)稀释至浓度为10 μ M,于荧光分光光度计下测量各个样品在激发波长为最大吸收波长时的荧光光谱,并记录最大发射波长以及最大发射波长处的荧光强度。如图2所示,随着溶剂1,4-二氧六环比例的增加,化合物1的荧光强度也随之增加。当1,4-二氧六环的比例达到99%时,化合物1处于聚集状态,荧光强度急剧增加,显示了化合物1明显的AIE性质。

[0122] 实施例14化合物1单线态氧产生能力的测定

[0123] 使用ABDA作为 $^1O_2$ 产生效率的指示剂,将ABDA与化合物1(含ABDA:50 μ M,化合物1:10 μ M)混合溶液使用白光照射(60mW/cm²)不同时间(0、10、20、30、40、50、60、70、80、90和100秒)后,测定各样品的紫外吸收光谱(300~700nm)。通过比较378nm处的吸光度降低程度来估计 $^1O_2$ 的生成效率。如图3所示,ABDA与化合物1混合溶液中,随着光照时间的延长,ABDA在378nm处的吸收值逐渐降低,其效率优于孟加拉玫瑰红(RB)。

[0124] 实施例15化合物1对细菌免洗成像实验

[0125] 以4000rpm离心3min收集细菌,用灭菌DW(去离子水)洗涤3次。然后,用300 μ L PBS和3 μ L化合物1(1mM)溶液重悬细菌沉淀,孵育不同时间,再加入10 μ g/mL Hoechst 33342,再孵育30min。所有步骤室温保持。孵育后收集细菌,用消毒过的DW冲洗后置于显微镜载玻片上,用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)获得荧光图像。如图4所示,用化合物1和核酸染料共孵育后的细菌可在CLSM下观察到,所有细菌细胞内部都显示出蓝色荧光,这表明细菌内部的核酸被成功染色,可用于确定细菌的位置。相比之下,红色荧光(化合物1)只出现在细菌壁上,这表明化合物1没有进入细菌内部,只是与细菌表面结合发挥抗菌作用。

[0126] 实施例16化合物1-化合物12体外抗菌活性评价

[0127] 使用革兰氏阳性细菌(包括金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA))和革兰氏阴性细菌(包括大肠杆菌(*E.coli*)、耐多药大肠杆菌(MDR *E.coli*))进行抗菌试验。通过平板划线法得到单菌落,然后从琼脂板上分离出3-5个菌落,分别在适当体积的培养液中培养,温度37 $^{\circ}$ C,转速180rpm,培养数小时。用光密度(OD)在600nm处监测细菌浓度。将细菌溶液在600nm处的光密度调整为1.0,然后进行细菌实验。

[0128] 采用传统平板法对化合物1~12分别进行抑菌活性测定。以4000转/分离心5分钟收集细菌,然后用消毒去离子水(DW)洗涤3次。然后,用PBS溶液缓冲液重悬得到细菌的原液($OD_{600}=1.0$)。将细菌原液用PBS稀释1000倍,然后分别与等体积的化合物1~12制备样品用于抗菌测定。非光照组:样品在37 $^{\circ}$ C避光条件下孵育2h后,各取100 μ L滴在平板上均匀摊开;光照组:样品在37 $^{\circ}$ C避光条件下孵育30min,然后进行白光照射15min,再于37 $^{\circ}$ C避光条件下孵育75min后,各取100 μ L滴在平板上均匀摊开。然后将各平板置于37 $^{\circ}$ C孵育24h后,采用活菌计数法计算各组菌落形成单位(CFU)的存活数量。

[0129] 图5为化合物1(光照组与非光照组)对不同细菌的体外抗菌活性结果。如图5所示,

化合物1在白光照射下(光照组)对*S. aureus*、MRSA、*E. coli*和MDR *E. coli*的MIC分别为125nM、62.5nM、125nM、62.5nM,对这些细菌的抗菌活性也优于传统抗生素(万古霉素或多黏菌素B)。图6为化合物6(光照组与非光照组)对不同细菌的体外抗菌活性结果。如图6所示,化合物6在白光照射下(光照组)对*S. aureus*、MRSA、*E. coli*和MDR *E. coli*的MIC分别为62.5nM、125nM、125nM、250nM,说明化合物6对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都具有优异的抗菌活性。

[0130] 化合物1~12在白光照射下(光照组)的体外抗菌实验结果见表1所示。

[0131] 表1化合物1~12在白光照射下(光照组)的体外抗菌实验结果

[0132]

化合物	菌种	MIC (nmol/L)	化合物	菌种	MIC (nmol/L)
化合物 1	<i>S. aureus</i>	125	化合物 7	<i>S. aureus</i>	62.5
	MRSA	62.5		MRSA	125
	<i>E. coli</i>	125		<i>E. coli</i>	500
	MDR <i>E. coli</i>	62.5		MDR <i>E. coli</i>	250
化合物 2	<i>S. aureus</i>	125	化合物 8	<i>S. aureus</i>	62.5
	MRSA	125		MRSA	62.5
	<i>E. coli</i>	125		<i>E. coli</i>	125
	MDR <i>E. coli</i>	250		MDR <i>E. coli</i>	250
化合物 3	<i>S. aureus</i>	62.5	化合物 9	<i>S. aureus</i>	62.5
	MRSA	125		MRSA	125
	<i>E. coli</i>	125		<i>E. coli</i>	62.5
	MDR <i>E. coli</i>	125		MDR <i>E. coli</i>	125
化合物 4	<i>S. aureus</i>	62.5	化合物 10	<i>S. aureus</i>	125
	MRSA	62.5		MRSA	125
	<i>E. coli</i>	62.5		<i>E. coli</i>	125
	MDR <i>E. coli</i>	125		MDR <i>E. coli</i>	500
化合物 5	<i>S. aureus</i>	125	化合物 11	<i>S. aureus</i>	125
	MRSA	125		MRSA	62.5
	<i>E. coli</i>	250		<i>E. coli</i>	125
	MDR <i>E. coli</i>	500		MDR <i>E. coli</i>	250
化合物 6	<i>S. aureus</i>	62.5	化合物 12	<i>S. aureus</i>	62.5
	MRSA	125		MRSA	62.5
	<i>E. coli</i>	125		<i>E. coli</i>	250
	MDR <i>E. coli</i>	250		MDR <i>E. coli</i>	500

[0133] 实施例17化合物1对细菌死活染色实验

[0134] 光照组:将10 μ L化合物1储备液(1mM)加入到1mL浓度为10⁹CFU/mL的不同种类细菌(分别为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)中,得到细菌与抗菌剂混合物,再于37℃共孵育30分钟,在白光(60mW/cm²)下照射30分钟,光照完成后,加入1 μ L Hoechst 33342(10mg/mL)和1 μ LYO-PRO-1(1mM)混合均匀,孵育10min后制备玻片在共聚焦荧光显微镜下进行观察。非光照组:将10 μ L化合物1储备液(1mM)加入到1mL浓度为10⁹CFU/mL的不同种类细菌(分别为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)中,得到细菌与抗菌剂混合物,再于37℃共孵育1小时,而后加入1 μ L Hoechst 33342(10mg/mL)和1 μ LYO-PRO-1(1mM)混合均匀,孵育10min后制备玻片在共聚焦荧光显微镜下进行观察。Hoechst 33342可对所有细菌进行染色,而YO-PRO-1仅可对死亡细菌进行染色,因此YO-

PRO-1通道的荧光强度越强则表示样品中的死亡细菌数量越多。如图7所示,对于非光照组,绿色荧光(Y0-PRO-1的荧光信号,用于染色死亡菌)与蓝色荧光(Hoechst 33342的荧光信号,所有细菌的核酸均可被其染色)匹配不佳。相反地,对于白光照射组,几乎所有的绿色荧光信号都与蓝色荧光信号匹配良好,说明在光照射下产生的ROS对化合物1的抑菌活性起着至关重要的作用。

[0135] 实施例18化合物1体外细胞毒性实验

[0136] 用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养HeLa细胞,并将烧瓶置于含5%二氧化碳的37℃培养箱中。观察到细胞生长接近铺满瓶底时,用0.25%胰酶分离细胞,接种到96孔板(每孔约 5×10^3 个细胞),置于上述培养箱中24h。去除培养基后,在每孔中加入溶解于培养基中不同浓度的化合物1100 μ L。MTT法测定细胞活力。每孔加入100 μ L含10 μ L MTT原液(5mg/mL)的新鲜培养基,37℃孵育4h。每孔去除培养基后,加入100 μ L DMSO溶解结晶紫,测量570nm处的吸收值。各组细胞活力与未处理对照组比较。如图8所示,药物处理24h后,当化合物1浓度达到64 μ M时,HeLa细胞活力仍保持在90%以上。

[0137] 实施例19化合物1体内抗菌活性实验

[0138] 所有动物实验程序均经中南大学动物保护与使用委员会批准,并符合相关伦理规范。雌性BALB/c小鼠(6周)购自中南大学实验动物中心。BALB/c小鼠随机分为6组:(1)未加任何治疗的细菌感染组(对照);(2)细菌感染组用白光照射(对照+Light);(3)单独用HHC10肽治疗的细菌感染组(HHC10),HHC10肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,具体为KRWWKWIRW;(4)化合物1单独治疗的细菌感染组(化合物1);(5)细菌感染组化合物1处理加白光照射(化合物1+Light);(6)细菌感染组用万古霉素单独治疗(万古霉素)(每组n=4)。注射1.5%戊巴比妥钠麻醉小鼠。然后在每只小鼠上创建两个全层损伤(直径约8毫米)。采用20 μ L菌悬液(1.0×10^9 CFU/mL MRSA)接种创面,建立细菌感染创面模型。感染24h后,在创面中加入20 μ L生理盐水、化合物1、HHC10和万古霉素(10 μ M),静置30分钟。随后,用白光($\sim 60\text{mW}/\text{cm}^2$)照射创面10分钟或置于黑暗中。第一天进行药物治疗,有或没有白光照射,再持续两天,共3次。通过测量创面大小动态监测创面愈合过程,同时对创面进行拍照。第8天,收集所有小鼠感染部位的组织进行进一步评估。采用琼脂平板计数法检测感染部位细菌含量。如图9所示,各组创面面积逐渐减小。与第1天相比,第8天各药物治疗组创面基本愈合,化合物1+Light组创面面积仅为第一天的2.2%,为各组愈合程度最好的组别。对照组和对照+Light组创面分别为第一天的13.1%和11.4%。与此同时,各组小鼠的体重随着时间的推移稳步增加。这些结果表明,化合物1是一种良好的抗感染和促伤口愈合剂,可用于伤口感染的光动力治疗,且不影响小鼠的生长。

[0139] 实施例20化合物1诱导的细菌聚集沉降实验

[0140] 将 $\text{OD}_{600} \approx 2.0$ 的细菌悬浮液(E.coli、MDRE.coli、S.aureus和MRSA)各取1.5mL加入测量皿中,测量并记录 OD_{600} ,向各菌液中加入30 μ L化合物1(1mM)后静置,并于预设时间点测量各组 OD_{600} 。结果如图10所示,随着时间的延长,化合物1处理组的革兰氏阴性菌(E.coli和MDR E.coli)都出现了上清液光密度降低,同时可观察到絮状沉淀的产生,而对照组光密度则无明显变化,这说明了化合物1的作用使得细菌形成了聚集体,进而导致其沉淀加速。但MRSA的化合物1处理组和对照组都出现了光密度降低的现象,推测是由于MRSA细菌本身性质的原因导致的沉降,并非化合物1作用结果。而S.aureus则未出现沉降现象,说明化合物1

的作用无法使革兰氏阳性菌形成聚集体。

[0141] 实施例21体外溶血实验

[0142] 采集小鼠动脉血(心脏取血),加入肝素抗凝。抗凝血1500rpm离心5min,采集红细胞。将得到的红细胞进一步用PBS冲洗两次并稀释。制备500 μ L不同浓度(128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μ M)的化合物1,以生理盐水为阴性对照,以去离子水为阳性对照,与500 μ L红细胞悬液混合。37 $^{\circ}$ C孵育2h,离心成像,测定上清液在540nm处的吸光度。溶血率计算公式如下:

$$[0143] \quad \text{溶血率}(\%) = \frac{\text{阳性对照} - \text{样品}}{\text{阳性对照} - \text{阴性对照}} \times 100\%$$

[0144] 如图11所示,溶血试验结果表明其在体内治疗具有安全性。化合物1在浓度低于32 μ M时无溶血活性,在浓度为64 μ M时溶血率仍较低(溶血率为7.9%)。

[0145] 实施例22抗生物膜活性评价实验

[0146] 第一步:生物膜生长抑制实验

[0147] 将对数生长期的MRSA使用LB培养基稀释至 3×10^6 CFU/mL作为工作悬浮液,并将其加入共聚焦小皿中,每个皿中加入2mL。将其分为对照组、非光照组和光照组,对照组中加入20 μ L PBS,非光照组和光照组向每皿中加入20 μ L化合物1(1mM),而后将光照组先置于黑暗中孵育1h后置于白光下照射15min。将所有共聚焦小皿置于37 $^{\circ}$ C下孵育24h、48h和72h后,轻轻除去培养基并使用PBS洗涤,用Hoechst 33342和YO-PRO-1对MRSA生物膜进行染色。10分钟后,通过激光共聚焦荧光显微镜在不同波长下对生物膜进行成像。

[0148] 第二步:成熟生物膜破坏实验

[0149] 将对数生长期的MRSA使用LB培养基稀释至 3×10^6 CFU/mL作为工作悬浮液,并将其加入共聚焦小皿中,每个皿中加入2mL。将所有共聚焦小皿置于37 $^{\circ}$ C下孵育24h、48h和72h形成不同阶段成熟生物膜后,将其分为对照组、非光照组和光照组,对照组中加入20 μ L PBS,非光照组和光照组向每皿中加入20 μ L化合物1(1mM),而后将非光照组置于黑暗中孵育2h,将光照组先置于黑暗中孵育1h后置于白光下照射15min,再置于黑暗组孵育45min。轻轻除去培养基并使用PBS洗涤,用Hoechst 33342和YO-PRO-1对MRSA生物膜进行染色。10分钟后,通过CLSM在不同波长下对生物膜进行成像。

[0150] 如图12所示,对照组的生物膜显示蓝色荧光,这表明形成了充满活细菌的生物膜。在与化合物1孵育后,在CLSM图像中仅观察到少数死亡细菌,如绿色荧光标记所示。这证实了化合物1能有效地阻止金黄色葡萄球菌生物被膜的形成。使用浓度为10 μ M的化合物1与不同成熟阶段的生物膜共孵育后分为光照组和非光照组,并使用Hoechst 33342和YO-PRO-1共染。在CLSM图像中可观察到,未加光照处理时,不同成熟阶段的细菌生物膜皆有一定程度的破坏,值得注意的是,经光照15min后,生物膜破坏更为明显,图中可见分散的绿色荧光,说明大部分生物膜都被破坏且细菌死亡,这表明化合物1可以有效地清除成熟的生物膜。

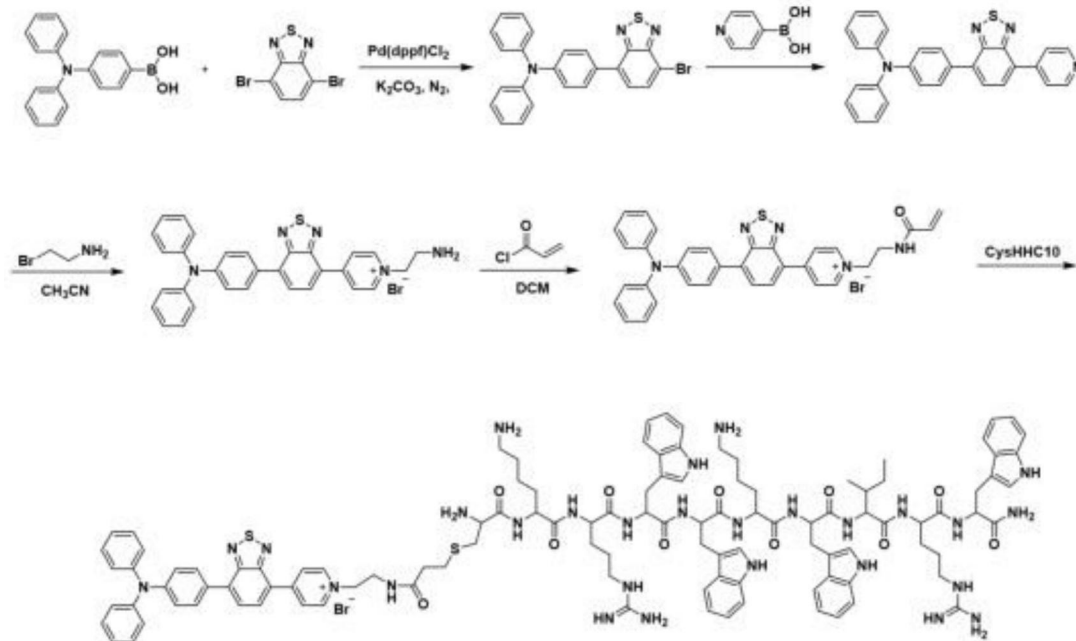


图1

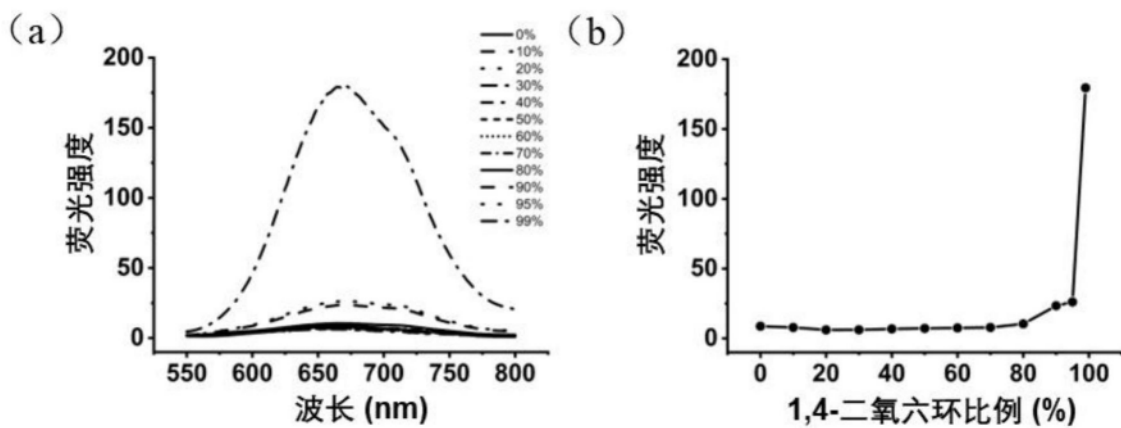


图2

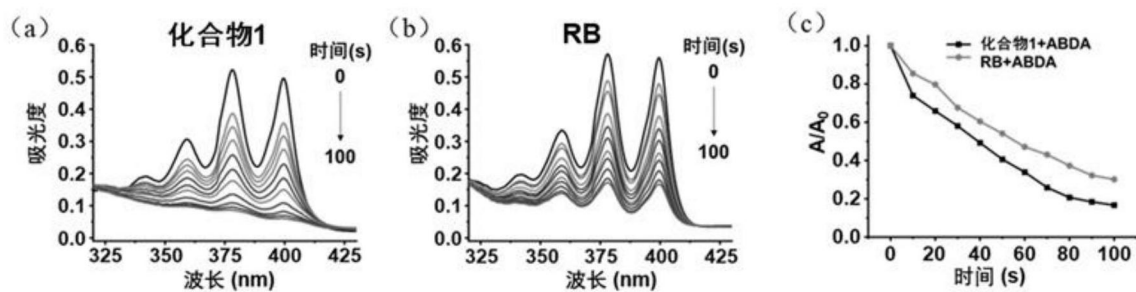


图3

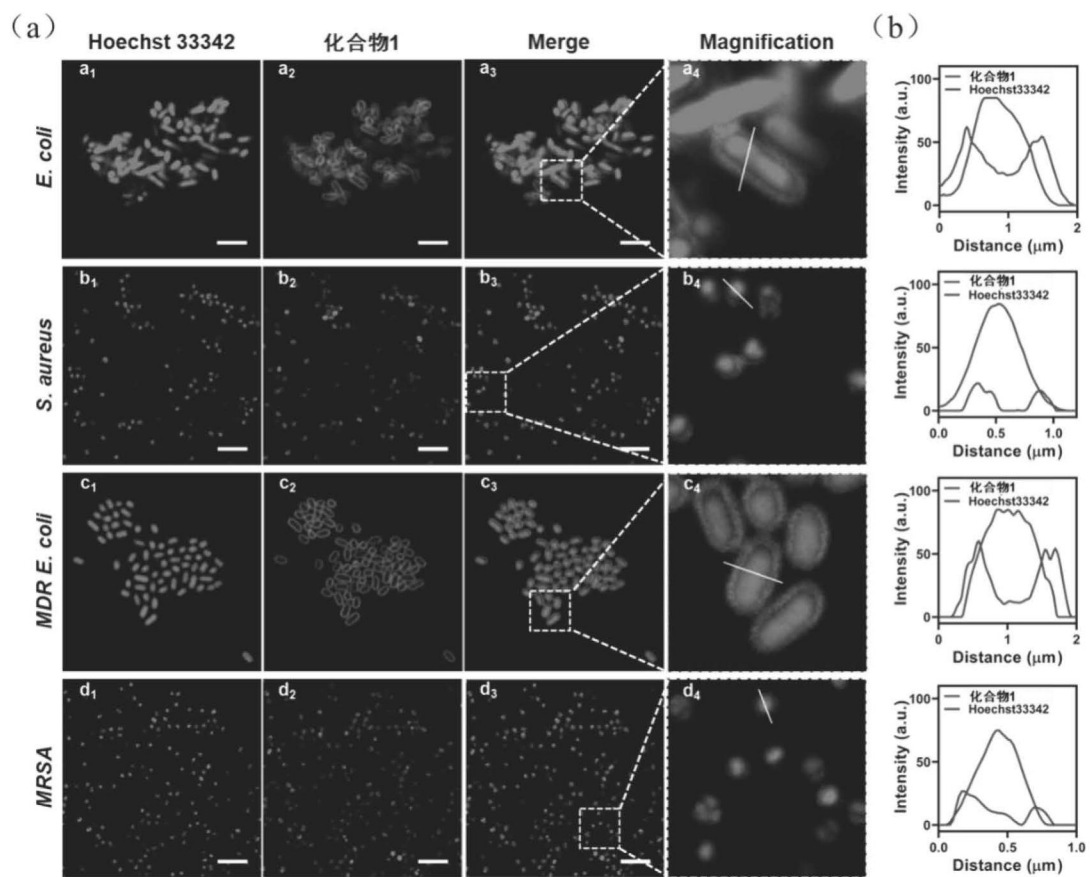


图4

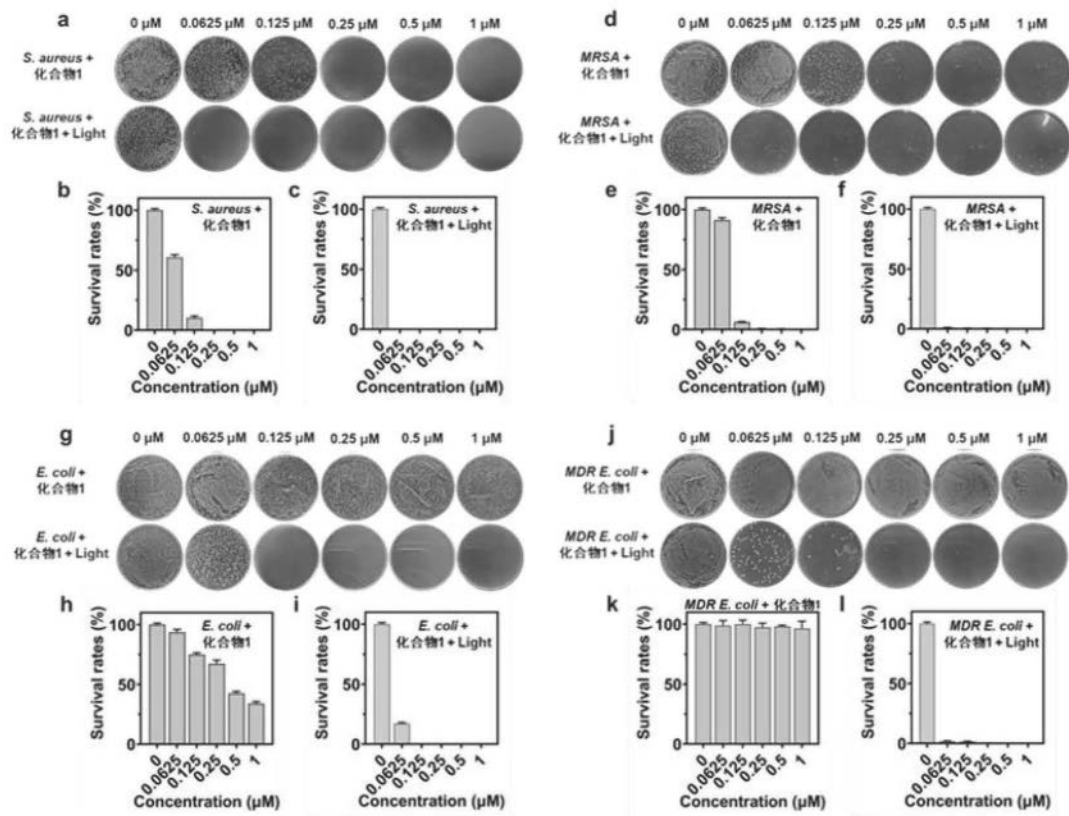


图5

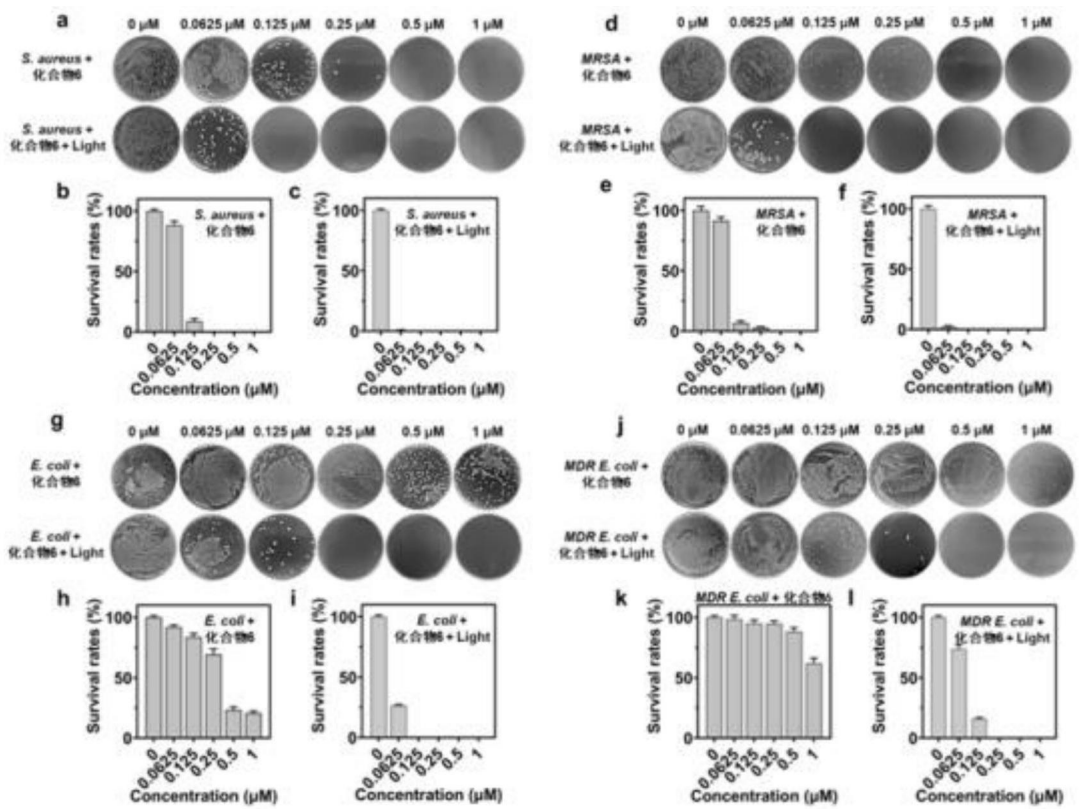


图6

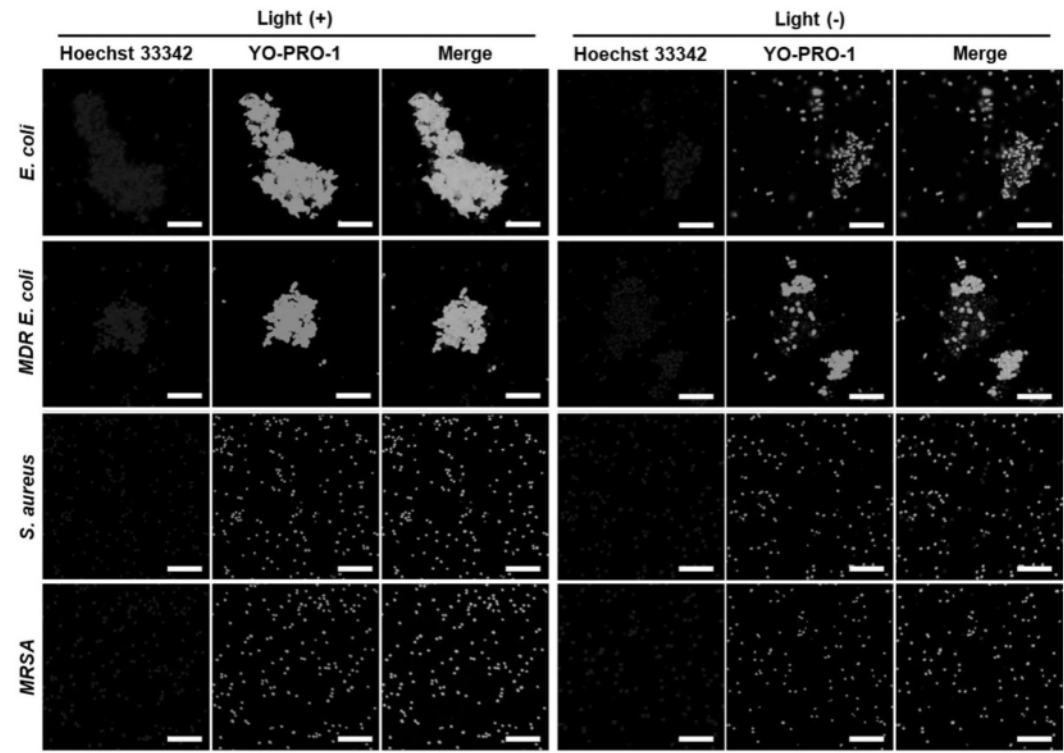


图7

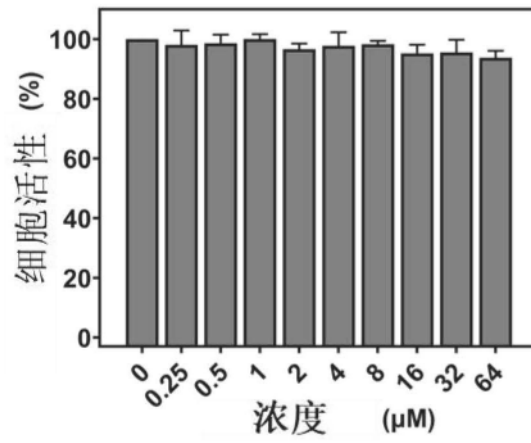


图8

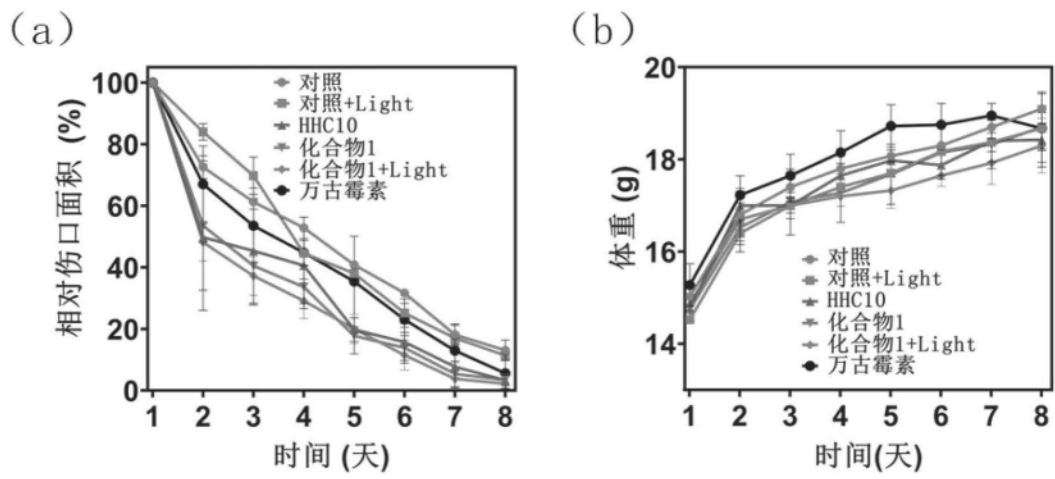


图9

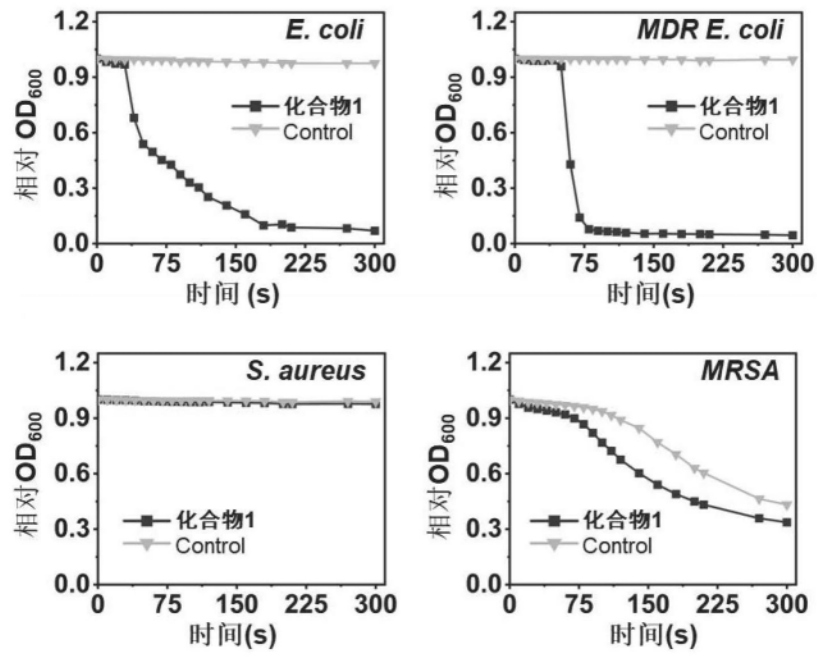


图10

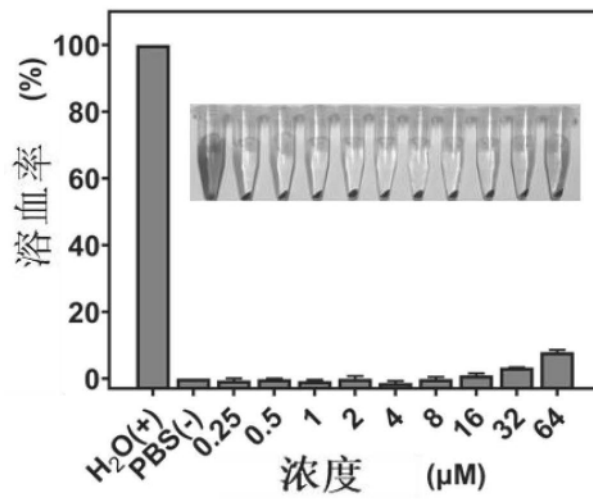


图11

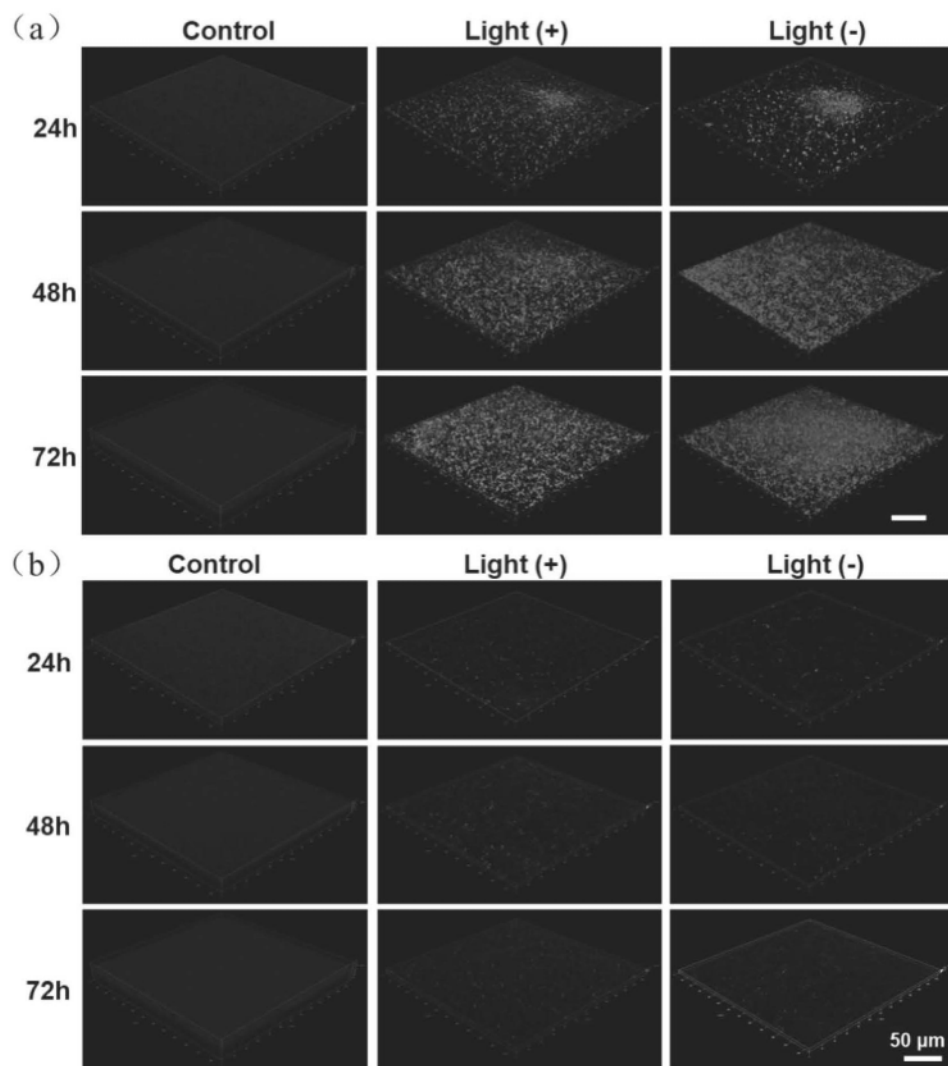


图12