

新型多黏菌素 B 衍生物的设计合成及生物功能研究

崔阿龙, 胡辛欣, 高岩, 金洁, 易红, 陈阳, 何琪杨,
游雪甫, 李卓荣*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 多黏菌素 B 和多黏菌素 E (黏菌素) 成为治疗多药耐药革兰氏阴性菌的“最后一道防线”, 但是多黏菌素存在严重的肾毒性, 限制了其临床使用。因此, 急需研发新型高效、低毒的多黏菌素衍生物。本研究通过改变 *N*-取代脂肪酰基链或 6 位 *D*-Phe 的疏水性和体积设计合成两类多黏菌素 B 衍生物 20 个, 并评价其生物活性。衍生物结构经高分辨质谱 (HR-MS) 和核磁共振氢谱 (^1H NMR) 确证, 与多黏菌素 B (MIC: $0.5\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, CC_{50} : $120.3\pm 6.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相比, 衍生物 **7e** (MIC: $0.5\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 **7I** (MIC: $0.25\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对测定的耐药或敏感的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌显示出相当或提高的抗菌活性, 同时衍生物 **7I** (CC_{50} : $217.1\pm 13.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的肾细胞毒性降低。本研究为多黏菌素 B 的构效关系研究奠定基础。

关键词: 革兰氏阴性菌; 多黏菌素 B; 新衍生物; 抗菌活性; 肾毒性

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-2031-08

Design, synthesis, and biological evaluation of novel polymyxin B analogues

CUI A-long, HU Xin-xin, GAO Yan, JIN Jie, YI Hong, CHEN Yang,
HE Qi-yang, YOU Xue-fu, LI Zhuo-rong*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking
Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Polymyxin B and polymyxin E (colistin) are increasingly used as last-resort drugs for treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative pathogens. Unfortunately, the application was limited due to the serious side effects, especially nephrotoxicity. Very recently, the need for developing more tolerated and more effective polymyxin analogues has grown. This study details the design, synthesis, and evaluation of two classes of polymyxin B analogues with varying hydrophobicity and bulkiness at the *N*-terminal fatty acyl chain or position 6 amino acid. 20 polymyxin B analogues were synthesized and the chemical structures of the analogues were confirmed by HR-MS and ^1H NMR spectra. Compounds **7e** (MIC: $0.5\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and **7I** (MIC: $0.25\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed similar or better antimicrobial activity against both susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* compared to polymyxin B (MIC: $0.5\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Besides, compound **7I** (CC_{50} : $217.1\pm 13.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) displayed noticeably decreased renal cytotoxicity compared to polymyxin B (CC_{50} : $120.3\pm 6.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). This work establishes the base of further study on the structure-activity relationship of polymyxin B.

Key words: gram-negative pathogens; polymyxin B; novel analogues; antimicrobial activity; nephrotoxicity

收稿日期: 2019-06-21; 修回日期: 2019-07-24.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773585); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2017-I2M-1-012).

*通讯作者 Tel: 86-10-63027185, E-mail: l-z-r@263.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0500

2017年2月,WHO发布全球首份急需研发新抗生素的重点病原体清单,其中1类重点极为重要(critical)包括3种:碳青霉烯类药物耐药鲍曼不动杆菌、碳青霉烯类药物耐药铜绿假单胞菌以及碳青霉烯类药物耐药和三代头孢菌素耐药肠杆菌科细菌,这些多药耐药革兰氏阴性菌对碳青霉烯类抗生素具有耐药性,因此,临床急需新的抗生素来治疗这些严重的耐药菌。多黏菌素对该类阴性菌具有很好疗效,因此多黏菌素成为治疗多药耐药革兰氏阴性菌的“最后一道防线”^[1]。多黏菌素首次报道于1947年^[2],是不同多黏芽孢类杆菌发酵产生的不同结构类型的环状抗菌脂肽,包括多黏菌素B、E、A、C、D、F、K、M、P、S和T等^[3,4]。其中,临床使用的是多黏菌素B和黏菌素甲磺酸盐(colistimethate sodium, CMS)。多黏菌素类抗生素的共同结构特征为:由环状七肽、线性三肽和与线性三肽连接的N-脂肪酰基链三部分组成,其中七肽环由4位氨基酸L-Dab(α,γ -二氨基丁酸)与10位氨基酸L-Thr(或L-Leu)缩合形成。根据N-取代脂肪酰基链或7位氨基酸不同,同类型结构的多黏菌素中一般又含有两种以上的不同组分。20世纪50年代初,多黏菌素B应用不久,就发现全身给药常发生严重的不良反应,包括显著的肾毒性,20世纪70年代后临床使用逐渐减少^[5-7]。最近临床研究发现CMS诱导的患者急性肾损伤发生率高达60.4%,多黏菌素B的发生率为41.8%,多黏菌素的肾毒性严重限制了临床使用^[8,9]。因此,急需研发新型高效、低毒的多黏菌素衍生物。

多黏菌素B的抗菌作用与其两亲性的结构有关,带正电的L-Dab残基(α,γ -二氨基丁酸)与脂质A(lipid A)带负电的磷酸基团产生静电相互作用;多黏菌素的N-取代脂肪酰基链和6、7位疏水氨基酸插入到细菌外膜导致外膜膨胀^[1]。20世纪70年代以来,很多研究人员通过修饰多黏菌素的结构来研究其构效关系。除了改变N-取代脂肪酰基链的长度,很多芳基、环烷基也用来替换N-取代脂肪酰基链,特别是含有杂原子的芳基、环烷基替换得到的衍生物CB-182804、5x和CA824的抗菌活性接近或相当于多黏菌素B^[10-12],因此希望通过在N-取代脂肪酰基链中引入氮原子、氧原子来考察其对抗菌活性的影响。此外,之前对6位氨基酸研究较少,最近研究表明辛烷基甘氨酸(D-octylglycine)或联苯基丙氨酸(biphenyl-D-alanine)替换6位D-Phe后抗菌活性保持^[13,14]。因此,希望通过在D-Phe的苯环上引入不同极性或疏水性的取代基,考察其对抗菌活性的影响。

本研究通过改变N-取代脂肪酰基链或6位D-Phe的疏水性和体积设计合成两类多黏菌素B衍生物20

个(表1),衍生物的合成如合成路线1所示^[15]。首先评价所有衍生物的体外抗菌活性,接着选择活性较好的衍生物评价其肾细胞毒性。与多黏菌素B相比,大部分衍生物显示出有效的抗菌活性,同时衍生物7e的肾细胞毒性相当、7l的肾细胞毒性降低。

结果与讨论

1 化学合成

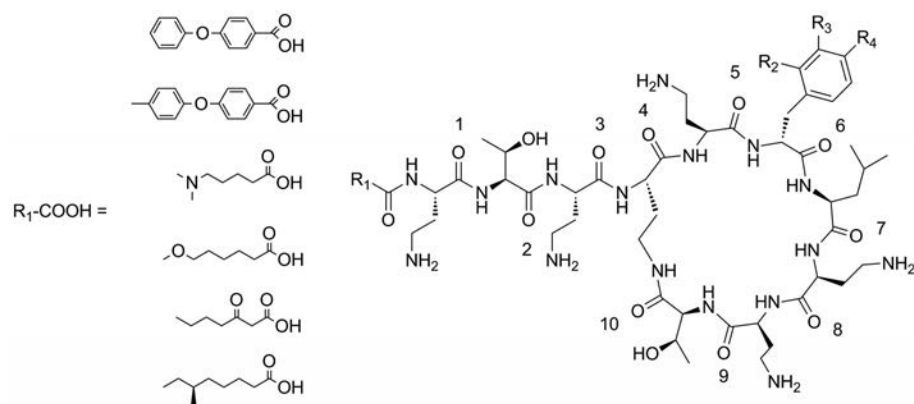
本文共合成多黏菌素B衍生物20个,化合物结构经高分辨质谱和核磁共振氢谱确证。详细数据见实验部分。

2 活性评价

体外抗菌试验表明(表2),大部分化合物对测定的阴性菌显示出有效的抗菌活性。衍生物7a($2\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和7b($2\sim 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与多黏菌素B($0.5\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,体外抗菌活性降低;表明N-取代脂肪酰基链替换为芳香疏水性基团抗菌活性下降。衍生物7c对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌的抗菌活性下降,对铜绿假单胞菌($1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的抗菌活性保持;表明减小N-取代脂肪酰基链的疏水性使活性降低。衍生物7d($0.5\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌的抗菌活性保持,对肺炎克雷伯菌的抗菌活性下降。衍生物7e($0.5\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对测定的阴性菌抗菌活性保持。值得注意的是,N-取代脂肪酰基链疏水性降低的衍生物7c~7e对铜绿假单胞菌的抗菌活性保持。衍生物7f~7p、7s和7t($\leq 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)抗菌活性保持,特别是衍生物7l($0.25\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)体外抗菌活性增强;表明6位D-Phe苯环上引入小体积的极性基团对抗菌活性影响较小。衍生物7q($4\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和7r($2\sim 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对测定阴性菌的体外抗菌活性下降;表明在D-Phe的苯环上引入大体积的疏水性基团对活性不利。选择有抗菌活性的化合物($\text{MIC}\leq 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)测定其对非洲绿猴肾细胞(Vero)的细胞毒性(表2)。与多黏菌素B($120.3\pm 6.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,衍生物7e($128.1\pm 10.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的肾细胞毒性相当($P>0.05$),衍生物7l($217.1\pm 13.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的肾细胞毒性降低($P<0.01$),其他化合物的肾细胞毒性增大。

结论

本文通过固相合成方法,高效合成多黏菌素B衍生物,所合成衍生物结构经高分辨质谱和核磁共振氢谱确证。其中衍生物7e的抗菌活性($0.5\sim 4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和肾细胞毒性($128.1\pm 10.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与阳性对照药多黏菌素B相当,衍生物7l的体外抗菌活性($0.25\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)增强,肾细胞毒性($217.1\pm 13.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)降

Table 1 Chemical structures of polymyxin B analogues. ^a*tert*-butyl; ^bbenzoyl

Compd.	R ₁ -COOH	R ₂	R ₃	R ₄
Polymyxin B ₁	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	H
7a	4-phenoxybenzoic acid	H	H	H
7b	4-(4-methylphenoxy)benzoic acid	H	H	H
7c	5-(dimethylamino)pentanoic acid	H	H	H
7d	6-methoxyhexanoic acid	H	H	H
7e	3-oxoheptanoic acid	H	H	H
7f	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	F
7g	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	Cl
7h	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	Br
7i	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	NO ₂
7j	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	OH
7k	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	NH ₂
7l	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	CN
7m	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	CH ₃
7n	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	CF ₃
7o	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	OCH ₃
7p	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	OCH ₂ CH ₃
7q	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	<i>t</i> Bu ^a
7r	(S)-6-methyloctanoic acid	H	H	Bz ^b
7s	(S)-6-methyloctanoic acid	H	Cl	H
7t	(S)-6-methyloctanoic acid	Cl	H	H

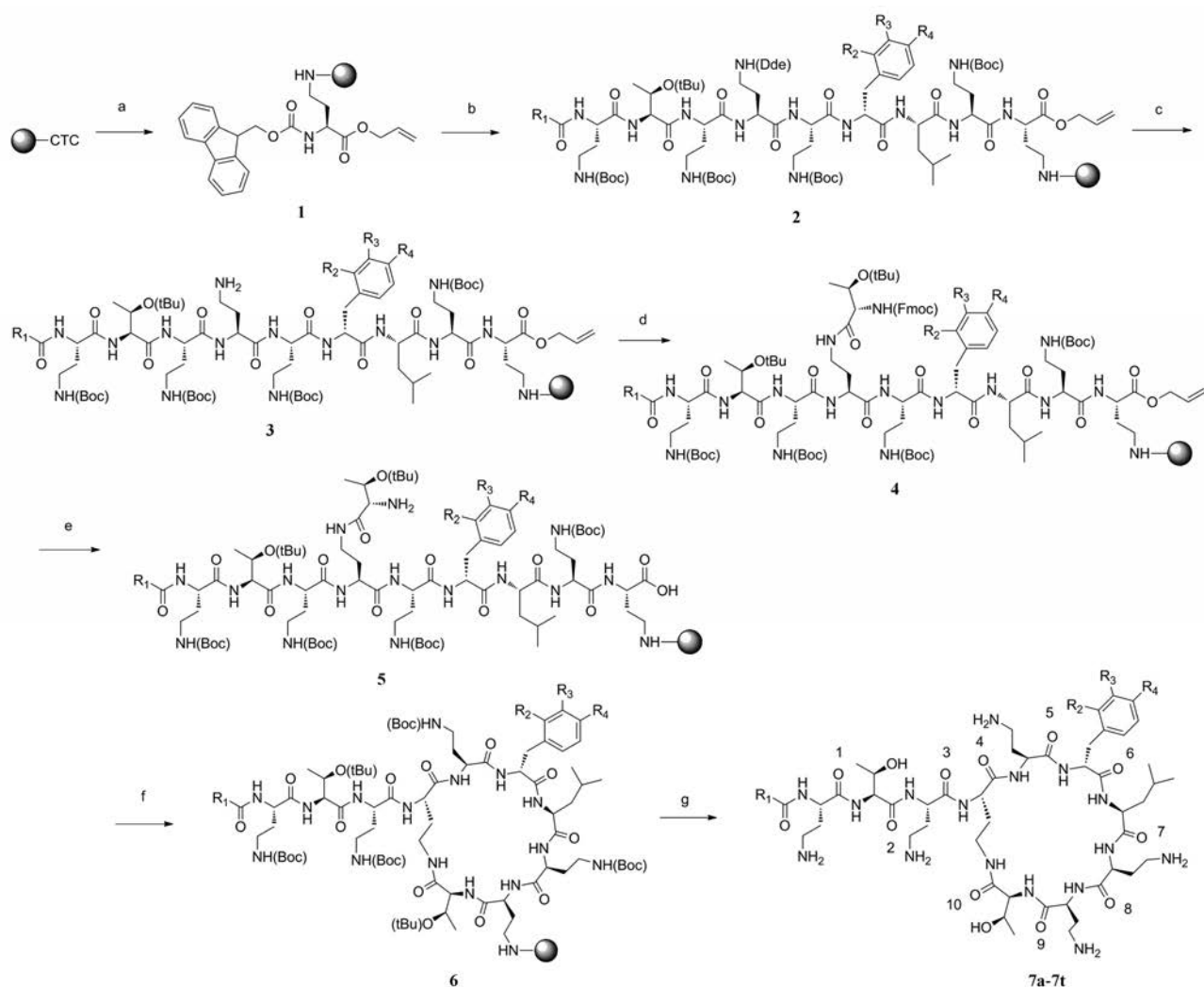
低。构效关系表明, *N*-取代脂肪酰基链替换为芳香疏水性基团抗菌活性下降, 降低 *N*-取代脂肪酰基链的疏水性抗菌活性也降低; 6位 *D*-Phe 苯环上引入大体积的疏水性基团对活性不利, 苯环上引入小体积的极性取代基抗菌活性保持。研究结果表明, 通过对多黏菌素 B 的结构改造, 有可能获得高效、低毒的多黏菌素衍生物。

实验部分

CS136xt 型全自动多肽合成仪 (美国 CS Bio 公司); 液质联用仪为日本岛津 LC-MS 2020, 分析柱 Shim-pack VP-ODS (2.0 mm×150 mm, 5 μm); 高效液相为美国安捷伦 1200 series 型分析型高效液相色谱系统, 分析柱 Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 分离纯化为本日本岛津 LC-20AT 型半制备型高效液相色谱系统, 半制备柱 Shim-pack PREP-ODS (20 mm×250 mm ID, 10 μm); 旋光为美国 Autopol IV 旋光仪测

定; 高分辨质谱 (HR-MS) 为美国 Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL instrument 测定; ¹H NMR 采用 Bruker 500 MHz 核磁共振波谱仪测定。

氨基酸、6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HCTU) 购自吉尔生化 (上海) 有限公司; (3*H*-1,2,3-三唑并[4,5-*b*]吡啶-3-氧基) 三-1-吡咯烷基磷六氟磷酸盐 (PyAOP)、1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑 (HOAt) 和四 (三苯基膦) 钯 (Pd(PPh₃)₄) 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司; 色谱纯乙腈、色谱纯三氟乙酸 (TFA)、(*S*)-(+)-6-甲基-1-辛醇、4-苯氧基苯甲酸、4-(4-甲基苯氧基) 苯甲酸、5-(二甲氨基) 戊酸、6-甲氧基己酸、3-氧代庚酸甲酯、*N*-甲基吗啉 (NMM)、三异丙基硅烷 (TIS)、苯硅烷 (PhSiH₃)、*N,N*-二异丙基乙胺 (DIPEA) 购自 J&K 百灵威科技有限公司; 哌啶、无水乙醚、水合肼 (40%)、甲醇 (MeOH)、二氯甲烷 (DCM) 等购自北京化工厂; *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 购自北京博迈杰科技有限公司; 2CTC resin (0.53 mmol·g⁻¹) 购自天津南开和成科



Compounds **7a–7e**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=H$.

7a: $R_1COOH=4$ -phenoxybenzoic acid; **7b**: $R_1COOH=4$ -(4-methylphenoxy)benzoic acid;

7c: $R_1COOH=5$ -(dimethylamino)pentanoic acid; **7d**: $R_1COOH=6$ -methoxyhexanoic acid;

7e: $R_1COOH=3$ -oxoheptanoic acid.

Compounds **7f–7t**: $R_1COOH=(S)$ -6-methyloctanoic acid.

7f: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=F$; **7g**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Cl$; **7h**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Br$; **7i**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=NO_2$;

7j: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OH$; **7k**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=NH_2$; **7l**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=CN$; **7m**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=CH_3$;

7n: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=CF_3$; **7o**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$; **7p**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_2CH_3$; **7q**: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=tBu$;

7r: $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=Bz$; **7s**: $R_2=H$, $R_3=Cl$, $R_4=H$; **7t**: $R_2=Cl$, $R_3=H$, $R_4=H$.

Reagents and conditions: (a) Fmoc-*L*-Dab-OAll, DIPEA, DCM, 2 h, MeOH; (b) (i) 20% piperidine in DMF, 5 min and 10 min; (ii) appropriate amino acid, HCTU, DIPEA, DMF, 1 h; (iii) For compounds **7a** to **7d** and **7f** to **7t**: corresponding carboxylic acid, HCTU, DIPEA, DMF, 1 h; For compound **7e**: corresponding carboxylic acid, DIC, HOBT, DMF, 2 h; (c) 3% hydrazine in DMF, 2×30 min; (d) Fmoc-*L*-Thr(*t*Bu)-OH, HCTU, DIPEA, DMF, 1 h; (e) (i) 20% piperidine in DMF, 5 min and 10 min; (ii) PhSiH₃, Pd(PPh₃)₄, 50% DCM/50% DMF, 2 h; (f) PyAOP, HOAt, NMM, DMF, 3 h; (g) TFA: TIS:H₂O (95:2.5:2.5), 2 h; followed by reverse phase HPLC purification.

Scheme 1 Synthetic route of polymyxin B analogues

技有限公司, (*S*)-(+)-6-甲基-1-辛酸为实验室制备^[15]。

1 化合物合成

1.1 3-氧代庚酸 (3-oxoheptanoic acid) 的合成 3-氧代庚酸甲酯 (3.2 mL, 20 mmol) 溶于 15 mL MeOH, 加入 3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 30 mL, 室温搅拌 2 h。减压浓

缩, 冰浴下用 2 mol·L⁻¹ 盐酸酸化至 pH=2。乙醚萃取 3 次 (3×30 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 得白色固体 2.8 g, 收率 97%^[16]。ESI-MS: 143[M-H]⁻。

1.2 多黏菌素 B 衍生物的合成 步骤 a. 将 2CTC resin (0.95 g, 0.53 mmol·g⁻¹, 0.5 mmol) 加入多肽合成管中,

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and cytotoxicity (CC_{50} : $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of polymyxin B analogues. ^aAmerican Type Culture Collection. ^bClinical isolate. ^c50% cytotoxic concentration. ^dPolymyxin B. ^eNot determined. ESBLs: Extended-spectrum β -lactamases. NDM-1: New Delhi Metallo-beta-lactamase-1

Compd.	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$					CC_{50} / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	<i>E. coli</i> ATCC ^a 25922	<i>E. coli</i> 14-11 ^b (ESBLs)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-2146 (NDM-1)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Vero cell	P value vs PMB
PMB ^d	1	0.5	1	2	0.5	120.3 \pm 6.0	–
7a	2	2	4	4	4	29.5 \pm 1.8	<0.01
7b	2	2	4	8	4	ND ^e	–
7c	>128	32	>128	1	16	ND	–
7d	1	0.5	8	1	2	ND	–
7e	0.5	1	2	2	4	128.1 \pm 10.6	0.497
7f	1	2	2	4	1	52.7 \pm 4.1	<0.01
7g	2	4	4	4	2	34.6 \pm 0.3	<0.01
7h	2	2	4	2	2	23.4 \pm 0.1	<0.01
7i	1	1	2	2	1	61.1 \pm 4.4	<0.01
7j	2	4	4	1	4	19.6 \pm 1.2	<0.01
7k	1	1	2	2	1	24.3 \pm 1.0	<0.01
7l	0.5	1	1	2	0.25	217.1 \pm 13.2	<0.01
7m	2	2	4	4	1	31.3 \pm 1.7	<0.01
7n	2	4	4	4	4	23.6 \pm 0.7	<0.01
7o	1	1	2	2	1	19.0 \pm 0.7	<0.01
7p	1	1	2	2	2	6.3 \pm 1.0	<0.01
7q	4	4	8	8	16	ND	–
7r	4	4	4	8	2	ND	–
7s	2	1	4	4	1	36.4 \pm 0.7	<0.01
7t	1	1	2	2	0.5	29.8 \pm 1.2	<0.01

加入 DCM 溶胀 5 min, DCM 溶解 Fmoc-*L*-Dab-OAll (2 mmol, 4 eq) 和 DIPEA (4 mmol, 8 eq) 加入到树脂中, 室温反应 2 h。加入 0.5 mL MeOH 反应 30 min, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 得 **1**。

步骤 b. 采用 Fmoc 策略, 合成线性肽-树脂。脱除 Fmoc 保护基, 用 20% 哌啶/DMF 处理两次 (5 min, 10 min), 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次; 缩合反应, 将 8 位氨基酸 Fmoc-*L*-Dab(Boc)-OH (2 mmol, 4 eq)、HCTU (2 mmol, 4 eq) 和 DIPEA (4 mmol, 8 eq) 的 DMF 溶液, 与树脂样品反应 1 h, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次。用相同方法脱除 Fmoc 保护基以及缩合 7 位氨基酸 Fmoc-*L*-Leu-OH、6 位氨基酸、5 位氨基酸 Fmoc-*L*-Dab(Boc)-OH、4 位氨基酸 Fmoc-*L*-Dab(Dde)-OH、3 位氨基酸 Fmoc-*L*-Dab(Boc)-OH、2 位氨基酸 Fmoc-*L*-Thr(*t*Bu)-OH、1 位氨基酸 Fmoc-*L*-Dab(Boc)-OH、侧链羧酸 (衍生物 **1e** 除外), 得 **2**。衍生物 **1e** 的侧链羧酸缩合反应为 3-氧代庚酸 (2 mmol, 4 eq)、DIC (2 mmol, 4 eq) 和 HOBT (2 mmol, 4 eq) 的 DMF 溶液, 与树脂样品反应 2 h, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 得 **2**。

步骤 c. 用 2% 水合肼/DMF 处理 (2 \times 30 min) 脱除 Dde 保护基, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 得 **3**。

步骤 d. 将 10 位氨基酸 Fmoc-*L*-Thr(*t*Bu)-OH (2 mmol, 4 eq)、HCTU (2 mmol, 4 eq) 和 DIPEA (4 mmol,

8 eq) 的 DMF 溶液, 与树脂样品反应 1 h, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 得 **4**。

步骤 e. 脱除 Fmoc 保护基, 用 20% 哌啶/DMF 处理两次 (5 min, 10 min), 用 DMF 洗涤树脂 5 次; PhSiH₃ (3.5 mmol, 7 eq) 与 Pd(PPh₃)₄ (0.1 mmol, 0.2 eq) 溶于 50% DCM/50% DMF, 避光反应 2 h, 0.5% 二乙基二硫代氨基甲酸钠/DMF 溶液洗涤 3 次, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 得 **5**。

步骤 f. 将 PyAOP (2 mmol, 4 eq)、HOAt (2 mmol, 4 eq) 和 NMM (4 mmol, 8 eq), 与树脂样品反应 3 h, 使 9 位 *L*-Dab 的羧基与 10 位 *L*-Thr 的氨基缩合, 实现固相环合, 用 DCM、DMF 分别洗涤树脂 5 次, 甲醇洗涤 1 次, 干燥, 得 **6**。

步骤 g. 用 10 mL TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) 进行肽的裂解和脱除全部保护基, 滤去树脂, 将获得的裂解液加入到冷乙醚中以析出肽, 离心, 半制备液相分离纯化, 冷冻干燥得 **7a**~**7t**, HPLC 检测纯度。

衍生物 **7a** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₆₀H₉₀O₁₄N₁₆, ESI-MS: m/z 1 259.690 6 [M+H]⁺, 液相含量 96.6%, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -41.8 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.83 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.43~7.23 (m, 6H), 7.14 (m, 4H), 4.71 (dd, J = 8.8, 5.3 Hz, 1H), 4.57 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 4.54~

4.46 (m, 2H), 4.28 (m, 8H), 3.41~3.31 (m, 1H), 3.24~3.00 (m, 11H), 2.94~2.75 (m, 2H), 2.39~1.83 (m, 12H), 1.54~1.36 (m, 2H), 1.20 (m, 6H), 0.76 (s, 4H), 0.69 (s, 3H)。

衍生物 **7b** 产率为 30%，白色固体，分子式为 $C_{61}H_{92}O_{14}N_{16}$ ，ESI-MS: m/z 1 273.708 5 $[M+H]^+$ ，液相含量 99.0%， $[\alpha]_D^{25}$ -42.8 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.44~7.22 (m, 7H), 7.07 (m, 4H), 4.71 (dd, $J = 8.9, 5.3$ Hz, 1H), 4.57 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 4.40 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.35~4.13 (m, 7H), 3.41~3.30 (m, 1H), 3.26~2.98 (m, 11H), 2.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.31~1.79 (m, 12H), 1.55~1.35 (m, 2H), 1.20 (m, 6H), 0.76 (s, 4H), 0.69 (d, $J = 3.7$ Hz, 3H)。

衍生物 **7c** 产率为 27%，白色固体，分子式为 $C_{54}H_{95}O_{13}N_{17}$ ，ESI-MS: m/z 595.871 1 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 95.9%， $[\alpha]_D^{25}$ -43.9 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.39 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.57 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 8.5, 4.8$ Hz, 3H), 4.36 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.32~4.17 (m, 7H), 3.33 (m, 1H), 3.21~3.02 (m, 13H), 2.86 (s, 6H), 2.81 (s, 1H), 2.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.30~1.81 (m, 13H), 1.78~1.69 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.49 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.20 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H), 0.78 (m, 4H), 0.70 (t, $J = 8.3$ Hz, 3H)。

衍生物 **7d** 产率为 28%，白色固体，分子式为 $C_{54}H_{94}O_{14}N_{16}$ ，ESI-MS: m/z 596.362 9 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 95.2%， $[\alpha]_D^{25}$ -46.1 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.38 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.57 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.54~4.47 (m, 3H), 4.36 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.24 (m, 7H), 3.47 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.34 (m, 4H), 3.12 (m, 11H), 2.89 (s, 1H), 2.81 (s, 1H), 2.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.30~1.83 (m, 12H), 1.66~1.54 (m, 4H), 1.48 (m, 1H), 1.37 (m, 3H), 1.20 (t, $J = 5.9$ Hz, 6H), 0.79 (m, 4H), 0.69 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H)。

衍生物 **7e** 产率为 27%，白色固体，分子式为 $C_{54}H_{92}O_{14}N_{16}$ ，ESI-MS: m/z 1 189.706 4 $[M+H]^+$ ，液相含量 97.1%， $[\alpha]_D^{25}$ -51.4 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.61~4.46 (m, 4H), 4.37 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.33~4.17 (m, 7H), 3.43~3.29 (m, 1H), 3.23~3.03 (m, 11H), 2.95~2.85 (m, 1H), 2.84~2.74 (m, 1H), 2.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.34~1.79 (m, 13H), 1.59~1.46 (m, 3H), 1.40 (m, 1H), 1.30 (m,

2H), 1.25~1.09 (m, 7H), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.77 (s, 4H), 0.70 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H)。

衍生物 **7f** 产率为 30%，白色固体，分子式为 $C_{56}H_{97}O_{13}N_{16}F$ ，ESI-MS: m/z 611.376 1 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 97.0%， $[\alpha]_D^{25}$ -48.4 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.25 (s, 2H), 7.12 (s, 2H), 4.50 (s, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.33~4.11 (m, 7H), 3.35 (s, 1H), 3.18~2.89 (m, 13H), 2.33 (s, 2H), 2.04 (m, 12H), 1.58 (s, 2H), 1.48 (s, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.29 (s, 5H), 1.24~1.16 (m, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.86~0.79 (m, 7H), 0.76 (s, 3H), 0.68 (s, 3H)。

衍生物 **7g** 产率为 30%，白色固体，分子式为 $C_{56}H_{97}O_{13}N_{16}Cl$ ，ESI-MS: m/z 619.361 0 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 96.5%， $[\alpha]_D^{25}$ -44.6 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.40 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.53 (m, 4H), 4.37 (s, 1H), 4.23 (m, 6H), 4.14 (m, 1H), 3.42~3.32 (m, 1H), 3.04 (m, 13H), 2.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.29~1.83 (m, 12H), 1.58 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.46 (m, 1H), 1.40~1.24 (m, 6H), 1.20 (t, $J = 5.9$ Hz, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (d, $J = 5.5$ Hz, 6H), 0.77 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 0.64 (m, 4H)。

衍生物 **7h** 产率为 29%，白色固体，分子式为 $C_{56}H_{97}O_{13}N_{16}Br$ ，ESI-MS: m/z 642.335 6 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 95.9%， $[\alpha]_D^{25}$ -52.5 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.51 (m, 4H), 4.37 (s, 1H), 4.23 (m, 6H), 4.13 (m, 1H), 3.42~3.32 (m, 1H), 3.12 (m, 10H), 3.04~2.88 (m, 3H), 2.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.29~1.83 (m, 12H), 1.58 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.45 (m, 1H), 1.41~1.24 (m, 6H), 1.20 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.80 (m, 9H), 0.67 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 0.60 (s, 1H)。

衍生物 **7i** 产率为 31%，白色固体，分子式为 $C_{56}H_{97}O_{15}N_{17}$ ，ESI-MS: m/z 624.873 2 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 99.0%， $[\alpha]_D^{25}$ -59.6 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.25 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.62~4.47 (m, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.31~4.18 (m, 6H), 4.15 (m, 1H), 3.41~3.24 (m, 2H), 3.21~2.91 (m, 12H), 2.33 (s, 2H), 2.05 (m, 12H), 1.58 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H), 1.50~1.40 (m, 1H), 1.39~1.24 (m, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.11 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.66 (s, 3H), 0.61 (s, 3H), 0.52 (s, 1H)。

衍生物 **7j** 产率为 29%，白色固体，分子式为 $C_{56}H_{98}O_{14}N_{16}$ ，ESI-MS: m/z 610.378 5 $[M+2H]^{2+}$ ，液相含量 99.0%， $[\alpha]_D^{25}$ -61.7 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR

(500 MHz, D₂O) δ 7.12 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.50 (m, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.18 (m, 7H), 3.42~3.31 (m, 1H), 3.21~2.86 (m, 13H), 2.33 (s, 2H), 2.29~1.85 (m, 12H), 1.59 (s, 2H), 1.45 (m, 1H), 1.30 (s, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.74 (s, 3H), 0.65 (s, 4H)。

衍生物 **7k** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₅₆H₉₉O₁₃N₁₇, ESI-MS: m/z 609.886 1 [M+2H]²⁺, 液相含量 98.4%, $[\alpha]_D^{25}$ -55.4 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.40 (s, 4H), 4.58~4.48 (m, 4H), 4.37 (s, 1H), 4.32~4.15 (m, 7H), 3.42~3.31 (m, 1H), 3.23~2.91 (m, 13H), 2.32 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 2.11 (m, 12H), 1.58 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 1.47 (s, 1H), 1.41~1.24 (m, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (d, J = 5.1 Hz, 6H), 0.73 (s, 3H), 0.63 (s, 4H)。

衍生物 **7l** 产率为 32%, 白色固体, 分子式为 C₅₇H₉₇O₁₃N₁₇, ESI-MS: m/z 1 228.754 6 [M+H]⁺, 液相含量 99.0%, $[\alpha]_D^{25}$ -60.8 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.53 (m, 4H), 4.37 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.25 (m, 6H), 4.13 (m, 1H), 3.42~3.33 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.21~2.92 (m, 12H), 2.33 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.29~1.85 (m, 12H), 1.65~1.53 (m, 2H), 1.51~1.41 (m, 1H), 1.40~1.25 (m, 6H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.18~1.07 (m, 3H), 0.83 (t, J = 6.9 Hz, 6H), 0.76 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.65 (d, J = 6.4 Hz, 3H)。

衍生物 **7m** 产率为 30%, 白色固体, 分子式为 C₅₇H₁₀₀O₁₃N₁₆, ESI-MS: m/z 609.388 8 [M+2H]²⁺, 液相含量 96.0%, $[\alpha]_D^{25}$ -59.2 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.21 (s, 2H), 7.14 (s, 2H), 4.52 (m, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.32~4.11 (m, 7H), 3.35 (s, 1H), 3.09 (s, 10H), 2.94 (m, 3H), 2.32 (s, 5H), 2.04 (m, 12H), 1.58 (s, 2H), 1.44 (s, 1H), 1.33 (m, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.73 (s, 3H), 0.65 (s, 4H)。

衍生物 **7n** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₅₇H₉₇O₁₃N₁₆F₃, ESI-MS: m/z 636.374 6 [M+2H]²⁺, 液相含量 99.0%, $[\alpha]_D^{25}$ -54.1 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.71 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.60~4.46 (m, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.19 (m, 7H), 3.35 (s, 1H), 3.26~2.89 (m, 13H), 2.33 (s, 2H), 2.05 (m, 12H), 1.58 (s, 2H), 1.45 (s, 1H), 1.32 (m, 5H), 1.16 (m, 9H), 0.82 (s, 6H), 0.71 (s, 3H), 0.62 (s, 4H)。

衍生物 **7o** 产率为 30%, 白色固体, 分子式为 C₅₇H₁₀₀O₁₄N₁₆, ESI-MS: m/z 617.386 0 [M+2H]²⁺, 液相

含量 95.2%, $[\alpha]_D^{25}$ -53.5 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.20 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.59~4.42 (m, 4H), 4.37 (s, 1H), 4.33~4.09 (m, 7H), 3.83 (s, 3H), 3.44~3.27 (m, 1H), 3.21~2.90 (m, 13H), 2.32 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 2.30~1.82 (m, 12H), 1.59 (s, 2H), 1.44 (m, 1H), 1.30 (s, 6H), 1.20 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (d, J = 5.2 Hz, 6H), 0.71 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 0.61 (m, 4H)。

衍生物 **7p** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₅₈H₁₀₂O₁₄N₁₆, ESI-MS: m/z 624.393 7 [M+2H]²⁺, 液相含量 99.0%, $[\alpha]_D^{25}$ -54.0 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.55 (m, 3H), 4.48~4.42 (m, 1H), 4.37 (s, 1H), 4.34~4.05 (m, 9H), 3.43~3.34 (m, 1H), 3.22~2.88 (m, 13H), 2.33 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.29~1.83 (m, 12H), 1.58 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 1.45 (m, 1H), 1.38 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.30 (d, J = 7.3 Hz, 6H), 1.20 (t, J = 6.5 Hz, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (d, J = 5.8 Hz, 6H), 0.71 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 0.60 (m, 4H)。

衍生物 **7q** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₆₀H₁₀₆O₁₃N₁₆, ESI-MS: m/z 630.411 8 [M+2H]²⁺, 液相含量 98.5%, $[\alpha]_D^{25}$ -53.5 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.46 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.51 (s, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.31~4.18 (m, 7H), 3.40~3.29 (m, 1H), 3.19~2.91 (m, 13H), 2.33 (s, 2H), 2.29~1.83 (m, 12H), 1.59 (s, 2H), 1.47 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.29 (s, 14H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.95 (s, 1H), 0.82 (s, 6H), 0.78 (s, 3H), 0.71 (s, 3H)。

衍生物 **7r** 产率为 29%, 白色固体, 分子式为 C₆₃H₁₀₂O₁₄N₁₆, ESI-MS: m/z 654.393 8 [M+2H]²⁺, 液相含量 96.5%, $[\alpha]_D^{25}$ -44.4 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.81 (m, 4H), 7.74 (s, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.43 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 4.57 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.37 (s, 1H), 4.23 (m, 6H), 4.14 (m, 1H), 3.36 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.21~2.92 (m, 12H), 2.33 (s, 2H), 2.05 (m, 12H), 1.58 (s, 2H), 1.43 (s, 1H), 1.29 (s, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.11 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.66 (s, 3H), 0.57 (s, 4H)。

衍生物 **7s** 产率为 30%, 白色固体, 分子式为 C₅₆H₉₇O₁₃N₁₆Cl, ESI-MS: m/z 619.361 5 [M+2H]²⁺, 液相含量 97.1%, $[\alpha]_D^{25}$ -50.5 (c 0.15, 12% AcOH)。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.36 (s, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.53 (m, 4H), 4.36 (s, 1H), 4.32~4.16 (m, 7H), 3.35 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.21~2.87 (m, 13H), 2.33 (s,

2H), 2.04 (m, 12H), 1.59 (s, 2H), 1.48 (s, 1H), 1.44~1.24 (m, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.72 (m, 7H)。

衍生物 **7t** 产率为 31%, 白色固体, 分子式为 $C_{56}H_{97}O_{13}N_{16}Cl$, ESI-MS: m/z 619.361 2 $[M+2H]^{2+}$, 液相含量 99.0%, $[\alpha]_D^{25}$ -57.8 (c 0.15, 12% AcOH)。 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7.47 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.33 (s, 2H), 7.26 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.54 (m, 3H), 4.36 (s, 1H), 4.31~4.16 (m, 7H), 3.32 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.16 (m, 11H), 2.95 (m, 2H), 2.33 (s, 2H), 2.29~1.82 (m, 12H), 1.58 (s, 2H), 1.47 (s, 1H), 1.43~1.24 (m, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.12 (s, 2H), 0.82 (s, 6H), 0.72 (m, 7H)。

2 生物活性评价

2.1 体外抗菌活性实验 参照 CLSI 推荐方法, 采用平皿二倍稀释法和 Denley 多点接种器进行最低抑菌浓度 (MIC) 测定, 阳性药选用硫酸多黏菌素 B。化合物用 CAMH 肉汤二倍稀释成一系列浓度, 分别加适量到平皿中, MH 琼脂培养基熔化后定量注入含药液的平皿内混匀, 药物的终浓度分别为 0.03、0.06、0.125、0.25……128 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 。受试菌用营养肉汤、脑心浸液或 HTM 肉汤隔夜增菌, 试验时, 菌液适当稀释, 多点接种器接种试验菌 (接种量每点为 1×10^4 CFU) 于含药琼脂表面, 干燥后, 置 35 $^{\circ}C$ 恒温培养 18~24 h 后观察结果, 无菌落生长的平皿中所含药物的最小浓度即为 MIC。

2.2 肾细胞毒性实验 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 Vero 细胞株, 于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养, 定期换液, 待细胞进入对数生长期, 用胰蛋白酶消化传代。将生长良好的细胞以每毫升 2×10^3 个细胞重新接种于 96 孔板。培养 24 h 后, 加入药液, 每浓度设立 3 个平行孔, 另设空白对照, 阳性药选用硫酸多黏菌素 B。于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养 72 h, 每孔加 MTT 液 100 μL , 培养 4 h 后吸除培养液, 再加 150 μL 二甲基亚砷并振荡 10 min。用 Bio-Rad 680 型酶标仪在检测波长 570 nm 下测吸光度 (A) 值, 计算细胞生存率。细胞生存率 = (给药组 A 值 - 本底 A 值 / 空白对照组 A 值 - 本底 A 值) \times 100%, 每检测点取 3 个平行孔的平均值, 绘制抑制曲线, 计算 CC_{50} 值。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数值均为 3 次实验结果的平均值。使用 Graphpad Prism 5.0 统计软件计算 Vero 细胞 CC_{50} 值, 用 SPSS 16.0 的方法进行统计学处理。

References

[1] Velkov T, Thompson PE, Nation RL, et al. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotic [J]. *J Med Chem*, 2010, 53:

1898-1916.

- [2] Benedict RG, Langlykke AF. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa* [J]. *J Bacteriol*, 1947, 54: 24-25.
- [3] Shoji J, Hino H, Wakisaka Y, et al. Isolation of two new polymyxin group antibiotics. (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XX) [J]. *J Antibiot*, 1977, 30: 1029-1034.
- [4] Terabe S, Konaka R, Shoji J. Separation of polymyxins and octapeptides by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1979, 173: 313-320.
- [5] Brown JM, Dorman DC, Roy LP. Acute renal failure due to overdosage of colistin [J]. *Med J Aust*, 1970, 2: 923-924.
- [6] Price DJ, Graham DI. Effects of large doses of colistin sulphomethate sodium on renal function [J]. *Br Med J*, 1970, 4: 525-527.
- [7] Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, et al. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy [J]. *Ann Intern Med*, 1970, 72: 857-868.
- [8] Kubin CJ, Ellman TM, Phadke V, et al. Incidence and predictors of acute kidney injury associated with intravenous polymyxin B therapy [J]. *J Infect*, 2012, 65: 80-87.
- [9] Akajagbor DS, Wilson SL, Shere-Wolfe KD, et al. Higher incidence of acute kidney injury with intravenous colistimethate sodium compared with polymyxin B in critically ill patients at a tertiary care medical center [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57: 1300-1303.
- [10] Quale J, Shah N, Kelly P, et al. Activity of polymyxin B and the novel polymyxin analogue CB-182, 804 against contemporary Gram-negative pathogens in New York City [J]. *Microb Drug Resist*, 2012, 18: 132-136.
- [11] Magee TV, Brown MF, Starr JT, et al. Discovery of Dap-3 polymyxin analogues for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative nosocomial infections [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 5079-5093.
- [12] Brown P, Dawson MJ. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections [J]. *J Antibiot*, 2017, 70: 386-394.
- [13] Gallardo-Godoy A, Muldoon C, Becker B, et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 1068-1077.
- [14] Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al. Teaching 'old' polymyxins new tricks: new-generation lipopeptides targeting gram-negative 'superbugs' [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1172-1177.
- [15] Cui AL, Hu XX, Gao Y, et al. Synthesis and bioactivity investigation of the individual components of cyclic lipopeptide antibiotics [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 1845-1857.
- [16] Geske GD, Wezeman RJ, Siegel AP, et al. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12762-12763.