新型有机酸 - 多黏菌素 E2 组合物的设计、制备及评价

梅皓然[1]，李雅楠[2]，路建光[3,4]，东圆珍[3,4]，张 滢[2]，冯 军[3,4]*

（1. 上海工程技术大学化学与工程学院，上海 201620；2. 复旦大学药学院，上海 201203；3. 中国医药工业研究总院，上海 201203；4. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：多重耐药（MDR）革兰阴性菌感染对全球公共卫生构成严峻挑战。多黏菌素类药物虽为对抗此类感染的“最后防线”，但肾毒性严重限制了其临床应用。基于多黏菌素类药物肾毒性与其阳离子特性的相关性，该研究以高效的多黏菌素 E2 为改造对象，设计了可与其可逆结合、构建组合物前药的直链 / 环形有机酸，以降低其毒性。继而采用 Fmoc 固相合成法制备有机酸，并通过反相 HPLC 纯化后与多黏菌素 E2 形成复合物。离子色谱分析结果表明，有机酸可与多黏菌素 E2 结合。其中，OA-12- 多黏菌素 E2 组合物对革兰阴性菌的 MIC 值为 0.5 ～ 1 μg/mL，且对大鼠肾小管上皮细胞（NRK-52E 细胞）无显著毒性。体内毒性评估结果显示，与多黏菌素 E2 处理组相比，组合物未增加对小鼠的急性毒性，但肾损伤标志物，血肌酐、血尿素氮、7 和 14 d 的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（NGAL）、尿液肾损伤分子 -1（KIM-1）分别下降了 1.43%、16.00%、25.47%、16.31% 和 14.56%。该研究提出了一种基于可逆阴离子复合的新型前药策略，为降低多黏菌素的肾毒性提供了新思路。

关键词：多黏菌素 E2 组合物；药物设计；前药；肾毒性；固相合成；多重耐药；抗菌药

中图分类号：R914.2；R96；R978.1^{+}6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255（2025）04-0469-11

引用：梅皓然，李雅楠，路建光，等．新型有机酸 - 多黏菌素 E2 组合物的设计、制备及评价［J］．中国医药工业杂志，2025，56（4）：469-479．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.007

Design, Preparation and Evaluation of Novel Organic Acid-colistin E2 Complexes

MEI Haoran[1], LI Yanan[2], LU Jianguang[3,4], DONG Yuanzhen[3,4], ZHANG Ying[2], FENG Jun[3,4]*

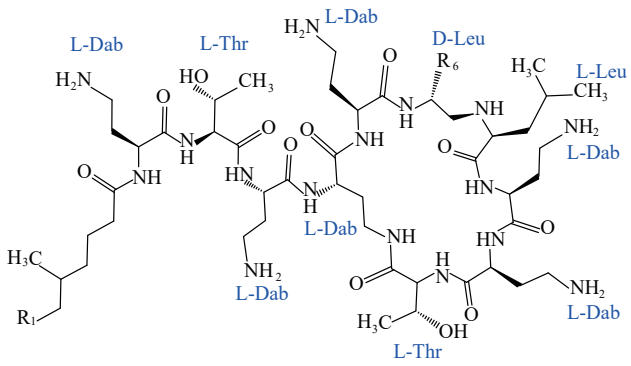
(*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620; 2. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 3. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 4. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacterial infections pose a growing global health threat. Although polymyxins remain the last-line therapy, the nephrotoxicity severely limits their clinical utility. This study developed reversible anionic complexes of colistin E2 with linear/cyclic organic acids to mitigate toxicity while retaining efficacy. Organic acids were synthesized via Fmoc solid-phase synthesis and formed complexes with colistin E2 through anion exchange, as confirmed by ion chromatography. Among them, the complex of colistin E2 and OA-12 demonstrated potent antimicrobial activity (MIC=0.5 – 1 μg/mL) against Gram-negative bacteria without cytotoxicity in normal rat kidney cells (NRK-52E cells). *In vivo* toxicity evaluation revealed no increased acute toxicity in mice, but reductions in nephrotoxicity biomarkers. Compared with the mice in the colistin E2 treatment group, the serum creatinine, blood urea nitrogen, 7-day neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), 14-day NGAL, and urinary kidney injury molecule 1 (KIM-1) levels in the complex-treated mice decreased by 1.43%, 16.00%, 25.47%, 16.31%, and 14.56%, respectively. In summary, this study proposes a novel prodrug strategy via anion complexation, providing a promising approach to enhance the safety profile of polymyxins while maintaining therapeutic efficacy against MDR infections.

Key Words: colistin E2 composition; drug design; prodrug; nephrotoxicity; solid-phase synthesis; multiple drug resistance; antibacterial drug

抗菌药耐药性已成为当今世界卫生保健系统面临的重大问题之一，其中以多重耐药（multi-drug resistant，MDR）革兰阴性菌导致的感染危害大，病死率较高[1]。然而，相对于革兰阳性菌治疗药物，近年来上市的用于治疗革兰阴性菌的新药非常匮乏。在此背景下，对 MDR 革兰阴性菌具有显著疗效，但因肾毒性问题被弃用多年的多黏菌素类药物被重新应用于临床，作为对抗 MDR 革兰阴性菌感染的“最后防线”，扮演“救命药”的角色。然而，多黏菌素类药物的肾毒性问题依然限制了其临床使用，并且由于其有效治疗剂量与引起肾毒性的剂量部分重叠，导致其安全窗窄，经常在亚有效剂量范围使用，易导致耐药性。基于此，近年来有关多黏菌素衍生物的研究成果大量涌现。但目前进入临床试验的多黏菌素衍生物较少。由美国 Spero 公司开发的 SPR206 是其中之一，但在其动物实验中仍观察到了显著的肾脏累积[2]。此外，多黏菌素与其他抗菌药或抗氧化剂联用的方式也均未解决此类药物的肾毒性问题。归根结底，是由于这些方式不能从根本上解决肾小管对多黏菌素重吸收导致的药物在肾脏中积累的现象[3—9]。

研究[10—11]表明，位于近端肾小管上皮细胞的巨蛋白、有机阳离子转运体 2（organic cation transporter novel 2，OCTN2）和寡肽转运体 2（oligopeptide transporter 2，PepT2）介导了多黏菌素类药物在肾小管的重吸收，可使其浓度在肾脏中累积近千倍。大量有关多黏菌素类药物的构效与构毒关系研究表明，其阳离子特性不仅是维持抗菌活性的关键，也是引起药物在肾脏中累积的重要原因[12]。然而，目前单纯基于构效关系进行的结构改造无法在维持化合物抗菌活性的同时解决肾毒性的问题。因此，本研究设计了一组可与多黏菌素 E2 通过分子间静电和疏水相互作用力形成可逆结合的组合物的有机酸化合物，以期在不影响多黏菌素 E2 抗菌活性的同时，从根本上解决其在肾脏中积累的问题。多黏菌素 E2（结构如图 1 所示）是多黏菌素类药物主要成分中活性最高的单一组分，其活性是多黏菌素 E1 的 2 倍，且毒性也更低。有机酸化合物与多黏菌素 E2 形成的组合物可能的作用机制如图 2 所示，在经过肾近端小管时保持结合形式以降低或屏蔽小管上皮细胞对多黏菌素 E2 的重吸收，在到达感染部位时受到多黏菌素 E2 与细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）更强结合力的影响而解离，从而发挥抗菌活性。



colistin E2：R_1=H，R_6=$CH_2CH(CH_3)_2$。

图 1　多黏菌素 E2 的化学结构

Fig.1　Chemical Structure of Colistin E2

具体设计是以多黏菌素 E2 十肽链为模板，将序列中的正电荷氨基酸进行了电荷翻转，同时设计、合成了系列直链和环状的新型有机酸化合物，通过反相高效液相色谱（RP-HPLC）成功制备了相应多黏菌素 E2- 有机酸组合物。随后，评价了各组合物的体外抗菌活性、大鼠肾小管上皮细胞（NRK-52E 细胞）毒性以及小鼠体内毒性。

1　仪器与试药

CS 136XT 型多肽合成仪［希施生物科技（上海）有限公司］；Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）；Acquity UPLC 型超高效液相色谱仪、Acquity QDa 型质谱检测器、600E-2487 型制备型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；FD5-3T 型真空冷冻干燥机（美国 Labconco 公司）；SHP-150 型生化培养箱（上海精宏实验设备有限公司）；96 孔板（上海拜力生物科技有限公司）；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪［美谷分子仪器（上海）有

收稿日期：2024-02-23

基金项目：国家自然科学基金面上项目（8227131826）

作者简介：梅皓然（1998—），男，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：冯　军（1971—），男，博士，研究员，从事微生物与生化药学的研究。

E-mail：fengj31@aliyun.com

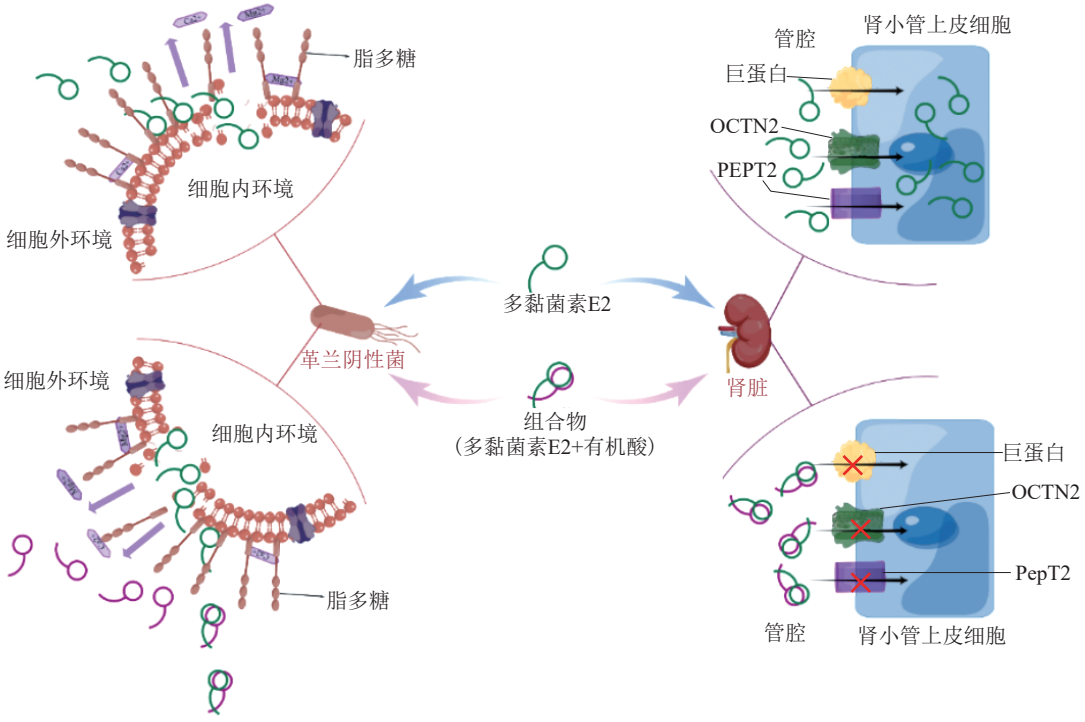


图 2　多黏菌素 E2 在单组分和组合物模式下的作用机制

Fig.2　Action Mechanisms of Polymyxin E2 in Single-component and Compositional Mode

限公司］；CCI-170B-8 型 CO_2 培养箱（上海百翱杰生物科技有限公司）；CKX53 型倒置生物显微镜（日本 Olympus 公司）。

硫酸多黏菌素 E2（连云港润众制药有限公司，批号 200802）；RINK 酰胺 MBHA 树脂（RINK Amide-MBHA Resin，0.702 mmol/g）、1- 羟基苯并三唑（1-hydroxybenzotriazole，HOBT）、*N*,*N*′- 二异丙基碳二亚胺（*N*,*N*′-diisopropylcarbodiimide，DIC）、苯酚、TFA、三异丙基硅烷（triisopropylsilane，TIS）均购自吉尔生化（上海）有限公司；Fmoc- 氨基酸、2-（7- 氮杂苯并三氮唑）-*N*,*N*,*N*′,*N*′- 四甲基脲六氟磷酸酯［2-（7-azabenzotriazol-1-yl）-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyluronium hexafluorophosphate，HATU］均购自希施生物科技（上海）有限公司；甲酸、乙酸酐、正丁酸、正己酸、正辛酸、6- 甲基庚酸、正癸酸、正十二烷酸、正十六烷酸、正十八烷酸、哌啶（piperidine，PIP）、苯酚、茚三酮、无水乙醚、无水乙醇、DMSO、碳酸氢钠、无水硫酸钠、MH Broth 培养基均购自国药集团化学试剂有限公司；1,3- 二（溴甲基）苯（上海阿达玛斯试剂有限公司）；苯硅烷、四（三苯基膦）钯［安耐吉（上海）医药化学有限公司］；DMEM 干粉培养基、青霉素 - 链霉素、胰蛋白酶 -EDTA（1×）均购自美国 Gibco 公司；FBS、杜氏磷酸盐缓冲液（Dulbecco's phosphate-buffered saline，DPBS）均购自 Thermo Fisher 公司；二乙基二硫代氨基甲酸钠（北京百灵威科技有限公司）；WST-1 检测试剂（瑞士罗氏公司）。

鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*，华山医院抗生素研究所）；大肠埃希菌（*Escherichia coli* ATCC 8739）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027）、金黄色葡萄球菌（*Staphyloccocus aureus* ATCC 6538）为本实验室保藏；大鼠肾细胞（NRK-52E 细胞，中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）。

雌性 BALB/c 小鼠，84 只，体质量为（20±2）g，6 ～ 7 周龄，购于上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司，实验动物使用许可证号 SYXK（苏）2019-0009。动物试验伦理号符合实验动物伦理委员会章程 SOPADM002。

2　方法与结果

2.1　有机酸的设计

有机酸的结构设计包括：①序列结构以多黏菌素 E2 十肽链为母体，选用 Asp、Glu、D-Asp 和 γ-Glu 等酸性氨基酸替换链中部分或全部碱性氨基酸（2,4- 二氨基丁酸，Dab），使肽链荷负电，从而

具备与多黏菌素 E2 结合所需的静电相互作用；②在结构中引入不同数量的 2-[2-(2- 氨基乙氧基）乙氧基］乙酸［2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]acetic acid，AEEA］以调节有机酸极性，增加有机酸水溶性；③N 末端修饰不同长度的脂肪酸，以提供与多黏菌素 E2 结合所需的疏水作用力；④在直链肽的基础上成环，进一步模拟多黏菌素 E2 的骨架结构。

2.2 有机酸的合成

采用 Fmoc 固相合成法合成有机酸肽链。有机酸的环化方式包括：Dab 侧链氨基与 Glu 侧链羧基缩合形成酰胺环，以及 Cys 侧链巯基与 1,3- 二（溴甲基）苯反应形成硫醚环。

固相合成：如图 3 所示，以有机酸 OA-01 合成为例，主要包含树脂溶胀、Fmoc 保护基得到脱除、缩合反应、肽链的延长、裂解与沉淀等步骤[13]。

胺环合成：环化反应条件参考文献[14]，原理如图 4 所示。

酰硫醚环合成：环化反应条件参考文献[15]，原理如图 5 所示。

通过上述设计思路及合成方法，本研究共合成了 30 个新型有机酸化合物，序列结构如表 1 所示。

2.3 有机酸的纯化

对有机酸的分析采用分析型 RP-HPLC，对有机酸的粗产物纯化采用半制备型 RP-HPLC。

分析型 RP-HPLC 条件：色谱柱 YMC-Pack Pro C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm）；柱温 35 ℃；流速 1.0 mL/min；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。流动相组成和洗脱梯度如表 2 所示。

制备型 RP-HPLC 条件：色谱柱 YMC-Triart Prep C_{18}-S 柱（10 mm×250 mm，10 μm）；流速 5.0 mL/min；检测波长 210 和 280 nm。流动相组成和洗脱梯度如表 2 所示。

采用电喷雾电离质谱（ESI-MS）法检测有机酸纯化样品的相对分子质量，若与理论值一致，说明化合物合成正确。

色谱条件：色谱柱 YMC-UltraHT Pro C_{18} 柱（2.0 mm×100 mm，2 μm）；柱温 40 ℃；流速 0.3 mL/min。流动相组成和洗脱梯度如表 2 所示。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源；检测模式 全扫描模式；离子源温度 120 ℃；质量扫描范围 100 ～ 1 600；锥孔电压 15 V；毛细管电压 0.8 kV；脱溶剂气温度 600 ℃。

以 OA-12 为例，展示有机酸的制备结果。可见，OA-12 粗肽纯度为 86.68%，纯化后的纯度为 98.54%（图 6）；ESI-MS 法测得其实际相对分子质量为 1 422.1（图 7），与理论值基本一致，说明 OA-12 成功合成。将质谱确证后浓度 >90% 的收集液合并，旋蒸除去乙腈，真空冷冻干燥即得有机酸 OA-12 的纯化样品。

2.4 多黏菌素 E2- 有机酸组合物的制备

以 OA-12 为例，采用半制备型 RP-HPLC 制备组合物，采用分析型 RP-HPLC 对组合物进行分析。

分析型 RP-HPLC 条件：色谱柱 YMC-Pack Pro C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm）；流动相 A 为 0.1 mol/L 硫酸钠溶液（pH 2.0），B 为乙腈，洗脱梯度如表 3 所示；柱温 35 ℃；流速 1.0 mL/min；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。

半制备型 RP-HPLC 条件：色谱柱 YMC-Triart Prep C_{18}-S 柱（10 mm×250 mm，10 μm）；流动相 A 为水，B 为乙腈，洗脱梯度如表 3 所示；流速 5.0 mL/min；检测波长 210 和 280 nm。

多黏菌素 E2- 有机酸组合物的制备方法：根据硫酸多黏菌素 E2 和有机酸所带电荷数，分别按物质的量比例为 1 ∶ 1、1 ∶ 2、1 ∶ 3 确定组合物中二者的含量；加纯化水溶解后用氢氧化钠溶液分别调至 pH 7.4；混合后上样，按半制备型 RP-HPLC 的色谱条件制备并收集。合并样品纯度大于 90% 的收集液，旋蒸除去乙腈，减压冷冻干燥得到组合物样品，进行 RP-HPLC 分析。检测结果如图 8 所示。OA-12+E2 组合物的纯度为 95.58%，组合物中多黏菌素 E2 的占比为 37.82%。

2.5 组合物中 SO_4^{2-} 残留量检测

采用离子色谱法[16]检测多黏菌素 E2 上 SO_4^{2-} 的残留量，并验证本研究中的有机酸是否可以取代硫酸多黏菌素 E2 中的 SO_4^{2-} 与其形成组合物。作为对照，本研究同时选取了 3 种天然有机酸（化学结

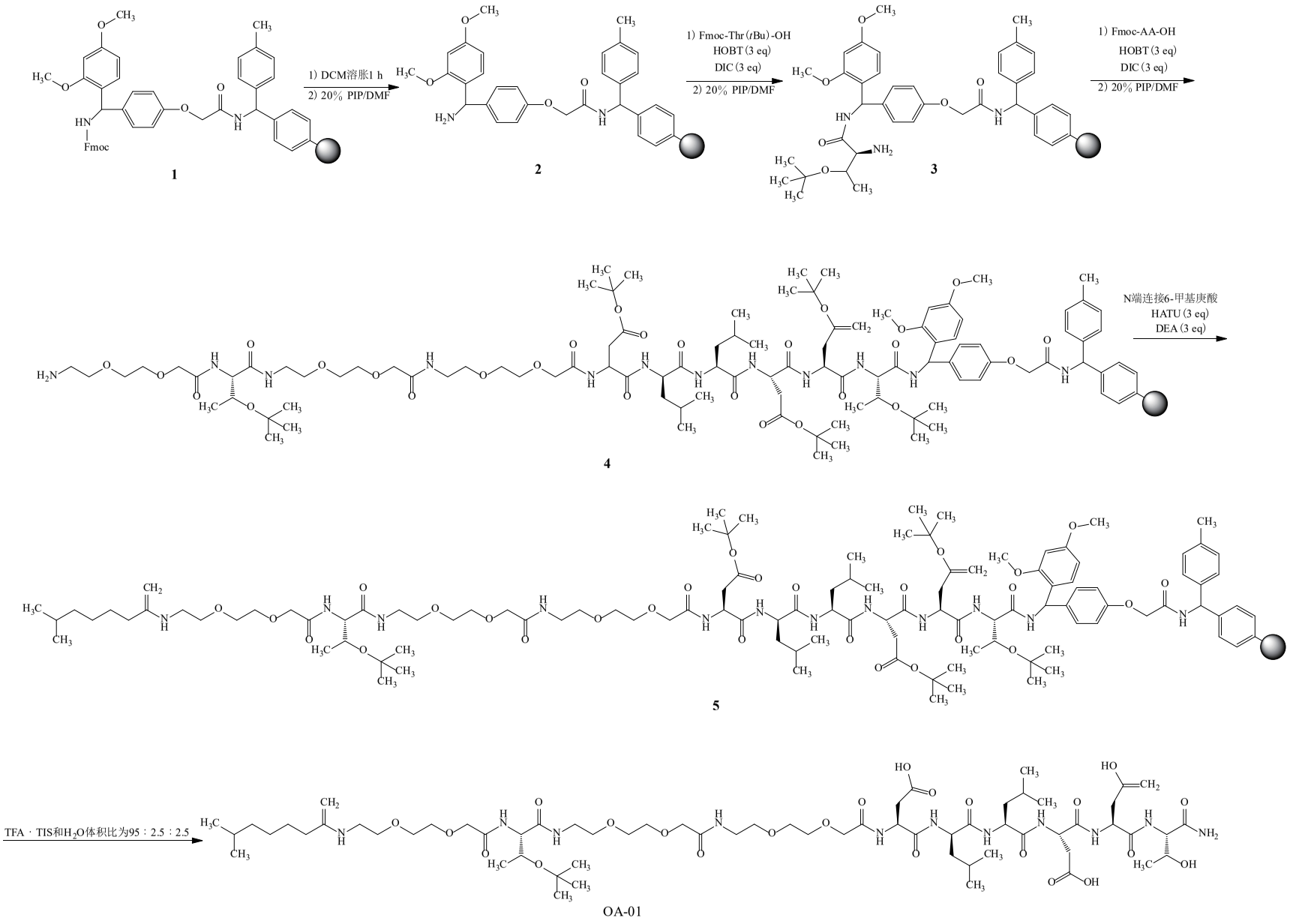


图 3　OA-01 固相合成示意图

Fig.3　Schematic Diagram of Solid-phase Synthesis of OA-01

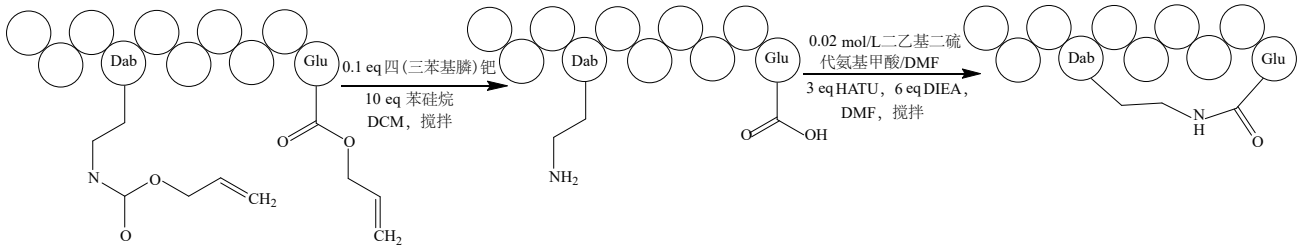


图 4　酰胺环的环化反应原理

Fig.4　The Principle of Cyclization Reaction of Amide ring

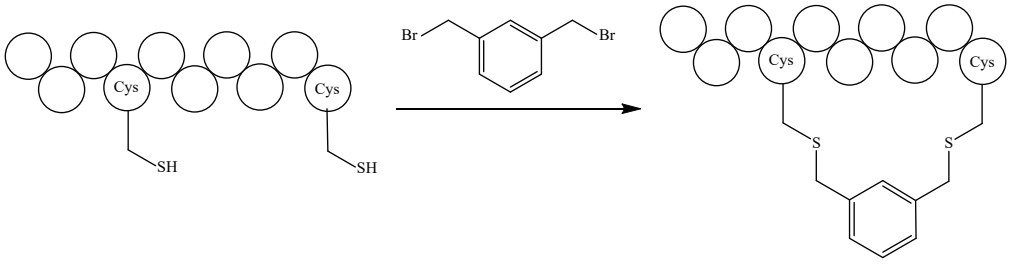


图 5　硫醚环的环化反应原理

Fig.5　The Principle of Cyclization Reaction of Thioether Ring

构如图 9 所示），按“**2.4**”项下方法制备其与多黏菌素 E2 的组合物。离子色谱结果显示，“**2.2**”项下所得的 OA 系列有机酸可基本取代硫酸多黏菌素 E2 中的 SO_4^{2-}，使 SO_4^{2-} 含量由 16.84%降至 3%以下，从而形成 OA- 多黏菌素 E2 组合物；而 3 种天然有机酸对硫酸多黏菌素 E2 中 SO_4^{2-} 的置换效果不佳，SO_4^{2-} 残留量均 >10%。

2.6　MIC 测定

本研究采用美国临床实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）推荐的微量肉汤稀释法 [16] 测定上述组合物的 MIC。选用目前临床感染率较高、具有代表性的革兰阴性菌和革兰阳性菌进行测试，包括鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌。

MIC 的测定结果（表 4）显示，OA-12 与多黏菌素 E2 形成的组合物保持了较好的抗菌活性，但对 3 种革兰阴性菌的抗菌活性较硫酸多黏菌素 E2 降低了 75%。这说明有机酸 OA-12 与多黏菌素 E2 的结合在一定程度上影响了多黏菌素 E2 与细菌 LPS 的结合，从而导致多黏菌素 E2 的抗菌活性在 OA-12 存在下有所下降。其他有机酸对组合物的抗菌活性影响不大，且部分有所增强。由于 OA-12+E2 组合物的 MIC 与多黏菌素 E2 差异较大，推测 OA-12 对多黏菌素 E2 的影响也较大，故后续试验采用 OA-12+E2 组合物进行。

2.7　OA-12+E2 组合物的细胞毒性检测

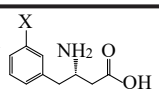
以 NRK-52E 细胞为模型细胞，检测 OA-12+E2 组合物对肾细胞的毒性。取对数生长期的 NRK-52E 细胞，以每孔 16 000 个细胞的浓度接种于细胞孔板，采用 DMEM 培养基（含 1%青霉素 - 链霉素和 5% FBS），于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，分别加入质量浓度（以多黏菌素 E2 计）为 16、12、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL 的 OA-12+E2 组合物、硫酸多黏菌素 E2，以及与 OA-12+E2 组合物对应量的 OA-12，孵育 24 h，加入 WST-1 检测试剂 20 μL，继续孵育 4 h。

结果如图 10 所示，硫酸多黏菌素 E2、OA-12 和 OA-12+E2 组合物的 EC_{50} 分别为 4 218、9 143 和

表 1 设计合成的有机酸

Tab.1 Designed Synthesized Organic Acids

名称	序列结构	电荷数	相对分子质量
OA-01	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Leu—Leu—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Asp—Thr	－3	1 352.61
OA-02	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—$^{D-}$Asp—AEEA—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Leu—Leu—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Asp—Thr	－4	1 322.54
OA-03	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 394.70
OA-04	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—$^{\gamma-}$Glu—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－4	1 378.66
OA-05	6- 甲基庚酰基—$^{D-}$Asp—Thr—$^{D-}$Asp—AEEA—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Leu—Leu—$^{D-}$Asp—$^{D-}$Asp—Thr	－5	1 292.47
OA-06	6- 甲基庚酰基—$^{\gamma-}$Glu—Thr—$^{\gamma-}$Glu—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－5	1 362.62
OA-07	乙酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 310.54
OA-08	丁酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 338.60
OA-09	己酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 366.65
OA-10	辛酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 394.70
OA-11	甲酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 291.52
OA-12	癸酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 422.75
OA-13	十二烷酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 450.81
OA-14[1)]	HoPhe(3-F)—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 447.94
OA-15[1)]	HoPhe(3-Cl)—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 464.40
OA-16[1)]	HoPhe(3-Br)—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 508.85
OA-17	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—AEEA—Thr	－2	1 410.74
OA-18	癸酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—AEEA—Thr	－2	1 438.79
OA-19	癸酰基—AEEA—Thr—$^{\gamma-}$Glu—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－4	1 406.71
OA-20	癸酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 388.71
OA-21	6- 甲基庚酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 360.66
OA-22	乙酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 276.5
OA-23	丁酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 304.56
OA-24	己酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 332.67
OA-25	甲酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 257.48
OA-26	辛酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 360.72
OA-27	十二烷酰基—AEEA—Thr—AEEA—Dab—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Glu	－3	1 416.83
OA-28	癸酰基—AEEA—Thr—AEEA—Cys—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Cys（S—S）	－3	1 486.75
OA-29	十六烷酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 506.91
OA-30	十八烷酰基—AEEA—Thr—AEEA—AEEA—$^{\gamma-}$Glu—$^{D-}$Leu—Leu—$^{\gamma-}$Glu—$^{\gamma-}$Glu—Thr	－3	1 534.97

注：[1)] HoPhe 的化学结构为 （其中，X=F、Cl 或 Br）。

2 921 μg/mL，可见三者的细胞毒性均非常低，EC_{50} 远高于 MIC 值。上述结果中组合物的 EC_{50} 以多黏菌素 E2 的质量浓度计，若考虑到其中加入的有机酸用量，组合物的总 EC_{50} 应与硫酸多黏菌素 E2 差别不大。由此看来，有机酸 OA-12 的加入并未增加组合物细胞毒性。

2.8 OA-12+E2 组合物的急性毒性检测

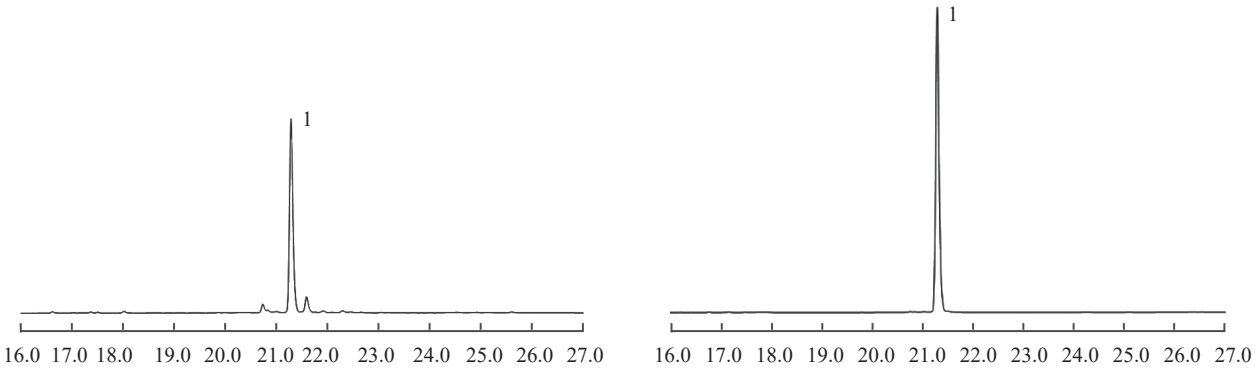
采用 Bliss 法[17] 计算 OA-12+E2 组合物对雌性

表 2　用于有机酸的流动相梯度洗脱程序

Tab.2　Gradient Elution Program of Mobile Phase Used for Organic Acid

有机酸分析 [1)]			有机酸制备 [1)]			有机酸纯度检测 [2)]		
t/min	A/%	B/%	*t*/min	A/%	B/%	*t*/min	A/%	B/%
0	95	5	0	95	5	0	95	5
5.00	95	5	10.00	95	5	1.50	95	5
25.00	20	80	80.00	50	50	6.00	50	50
26.00	95	5	81.00	20	80	8.00	20	80
32.00	95	5	90.00	20	80	8.50	20	80

注：[1)] 流动相 A 为 0.05% TFA 水溶液，流动相 B 为 0.05% TFA 乙腈溶液；[2)] 流动相 A 为 0.1%甲醇水溶液，流动相 B 为 0.05%甲醇乙腈溶液。



1-OA-12。

图 6　OA-12 粗产物（A）和纯化样品（B）的色谱图

Fig.6　Chromatograms of Crude Product (A) and Purified Product (B) of OA-12

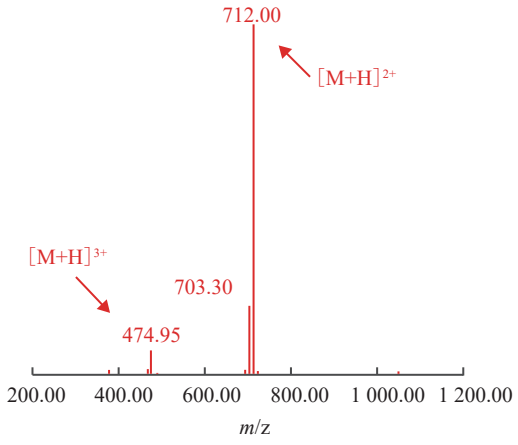


图 7　OA-12 质谱图

Fig.7　Mass Spectrum of OA-12

BALB/c 小鼠的 LD_{50}。预试验使用 18 只小鼠，正式试验使用 48 只小鼠。结果表明，OA-12+E2 组合物的 LD_{50} 为 29.333 mg/kg，折算成多黏菌素 E2 的 LD_{50} 为 9.662 mg/kg，相较于硫酸多黏菌素 E2 的 LD_{50} 9.477 mg/kg 相差不大。这说明有机酸 OA-12

表 3　用于组合物的流动相梯度洗脱程序

Tab.3　Gradient Elution Program of Mobile Phase Used for the Complexes

组合物分析			组合物制备		
t/min	A/%	B/%	*t*/min	A/%	B/%
0	95	5	0	95	5
5.00	95	5	35.00	95	5
25.00	35	65	36.00	50	50
26.00	95	5	50.00	50	50
32.00	95	5	—	—	—

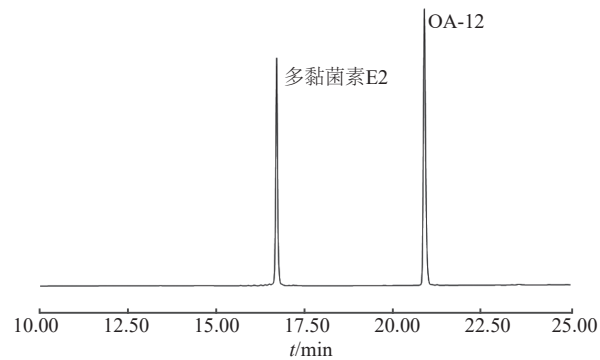


图 8　OA-12+E2 组合物的色谱图

Fig.8　Chromatogram of OA-12+E2 Complex

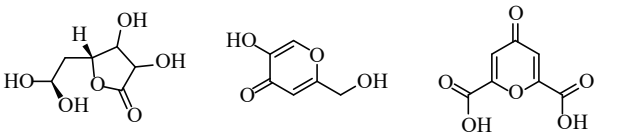


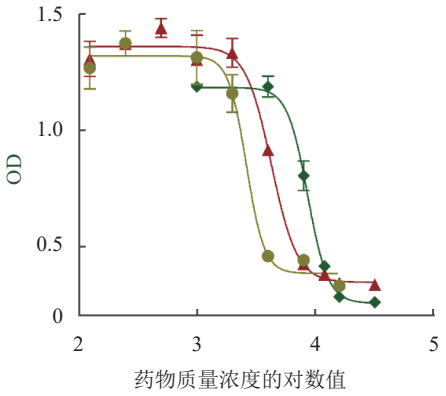
图 9 天然有机酸的化学结构

Fig.9 Chemical Structures of Natural Organic Acids

的加入不会增加组合物的急性毒性。

2.9 OA-12+E2 组合物小鼠多次给药后的体内肾毒性研究

取雌性 BALB/c 小鼠 18 只，随机分为 3 组，其中 2 组分别静脉注射给予质量浓度为 0.6 mg/mL 的 OA-12+E2 组合物和硫酸多黏菌素 E2（根据多黏菌素 E2 在组合物中的占比以及硫酸多黏菌素 E2 中的占比，保证注射的多黏菌素 E2 剂量相同），另一组静脉注射给予生理盐水（剂量均为 10 mL/kg）。各组每



●—OA-12+E2；◆—OA-12；▲—硫酸多黏菌素 E2。

图 10 不同药物的细胞毒性曲线图（*n*=3）

Fig.10 Cytotoxicity Curves of Different Drugs (*n*=3)

表 4 MIC 测定结果

Tab.4 Determination Results of MIC

化合物名称	MIC/(μg·mL^{-1})			
	鲍曼不动杆菌	铜绿假单胞杆菌	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌
硫酸多黏菌素 E2	0.250	0.125	0.125	16
OA-01+E2	0.250	0.125	0.125	16
OA-02+E2	0.250	0.250	0.250	16
OA-03+E2	0.250	0.125	0.250	16
OA-04+E2	0.500	0.250	0.250	32
OA-05+E2	0.250	0.125	0.125	16
OA-06+E2	0.250	0.125	0.125	8
OA-07+E2	0.250	0.125	0.125	8
OA-08+E2	0.250	0.125	0.125	8
OA-09+E2	0.500	0.125	0.125	32
OA-10+E2	0.500	0.250	0.125	16
OA-11+E2	0.250	0.125	0.125	32
OA-12+E2	1.000	0.500	0.500	64
OA-13+E2	0.500	0.250	0.250	32
OA-14+E2	0.250	0.125	0.125	16
OA-15+E2	0.250	0.125	0.125	16
OA-16+E2	0.125	0.125	0.250	16
OA-17+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-18+E2	0.125	0.125	0.125	32
OA-19+E2	1.000	0.125	0.125	4
OA-20+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-21+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-23+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-24+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-26+E2	0.125	0.125	0.125	8
OA-28+E2	0.125	0.125	0.125	8
抗坏血酸 +E2	0.250	0.125	0.125	16
曲酸 +E2	0.250	0.125	0.125	16
4- 氧代 -4*H*- 吡喃 -2,6- 二羧酸 +E2	0.250	0.125	0.125	16

天给药 2 次，共注射 14 d，比较受试药物体内肾毒性的差异。结果显示，相较于空白对照组，分别静脉注射 OA-12+E2 组合物和硫酸多黏菌素 E2 的试验组小鼠中，肾损伤生物标志物血肌酐（serum creatinine，CRE）、血尿素氮（blood urea nitrogen，UREA）、血清中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（neutrophil gelatinase-associated lipocalin，NGAL）以及尿液肾损伤分子 -1（urinary kidney injury molecule，KIM-1）等水平均有所提高，说明经 OA-12+E2 组合物和硫酸多黏菌素 E2 处理后小鼠均出现一定了肾脏损伤。但相较于硫酸多黏菌素 E2 治疗组小鼠，OA-12+E2 组合物治疗组小鼠的各肾损伤生物标志物水平均有所降低，其中，UREA 减少约 16.00％，7 d 时 NGLA 减少约 25.47％，14 d 时 NGLA 减少约 16.31％，KIM-1 减少约 14.56％，说明 OA-12+E2 组合物可在一定程度上改善多黏菌素 E2 造成的肾损伤（表 5）。

3　结论

面对日益严重的抗菌药耐药性危机以及临床上对于高效低毒抗菌药的迫切需求，本研究聚焦抗 MDR 革兰阴性菌感染一线药物——多黏菌素的肾毒性问题，提出了一种新型前药，即有机酸 - 多黏菌素组合物。以多黏菌素十肽链的骨架结构为模板，设计了可通过分子间的静电和疏水相互作用以非共价键的方式与多黏菌素 E2 结合的有机酸，用以置换硫酸多黏菌素 E2 中的 SO_4^{2-}，形成多黏菌素 E2 的有机酸盐，以屏蔽多黏菌素 E2 的正电荷，从而降低肾毒性。体内外活性和肾毒性评价结果显示，OA-12+E2 组合物之间具备一定的结合力，可在保持良好抗菌活性的同时改善多黏菌素 E2 对小鼠造成的肾损伤。尽管与硫酸多黏菌素 E2 组相比，OA-12+E2 组合物治疗组小鼠的 4 项肾损伤生物标志物均有所降低，但减毒效果并不显著，并未显示出显著性差异。这也说明有机酸与多黏菌素 E2 之间结合力的强弱还有待进一步探索和优化。因此，后续将优化有机酸的结构设计、确定有机酸的构效关系，以筛选出对多黏菌素 E2 肾毒性具有更明显改善作用的化合物。此外，关于组合物中多黏菌素与有机酸或细菌 LPS 结合力强弱的评价方法也需要进一步完善，以便从机制方面更准确地评价组合物的减毒作用。

表 5　小鼠多次给药体内肾毒性研究统计表（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5　Statistical Table of *in vivo* Nephrotoxicity Studies of Multiple Doses in Mice（$\bar{x}\pm s$, n=3）

化合物	CRE/（μmol·L^{-1}）	UREA/（mmol·L^{-1}）	NGAL/（ng·mL^{-1}）		KIM-1[1)]/（ng·mg^{-1}）
			7 d	14 d	
空白对照组	90.8±17.1	7.5±0.5	161±55	466±135	26.1±11.0
硫酸多黏菌素 E2	105.7±30.1	9.9±1.5	328±170	621±189	42.0±20.7
OA-12+E2	104.4±8.9	8.7±1.0	287±49	545±180	38.2±13.7

注 D[1)]：KIM-1 为尿蛋白 / 血肌酐比值。

参考文献：

[1] LI J, NATION R L, KAYE K S. Polymyxin antibiotics: from laboratory bench to bedside [EB/OL]. [2024-02-23]. https://link. springer. com/book/10. 1007/978-3-030-16373-0.

[2] ZHANG Y W, ZHAO C J, WANG Q, *et al*. Evaluation of the *in vitro* activity of new polymyxin B analogue SPR206 against clinical MDR, colistin-resistant and tigecycline-resistant Gram-negative bacilli [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, **75**(9): 2609-2615.

[3] GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J, SAMBATAKOU H, GALANI I, *et al*. *In vitro* interaction of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Chemother*, 2013, **15**(3): 235-238.

[4] GUNDERSON B W, IBRAHIM K H, HOVDE L B, *et al*. Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacodynamic model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**(3): 905-909.

[5] LEE N Y, WANG C L, CHUANG Y C, *et al*. Combination carbapenem-sulbactam therapy for critically ill patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia: four case reports and an *in vitro* combination synergy study [J]. *Pharmacotherapy*, 2007, **27**(11): 1506-1511.

[6] VARACHE M, RIZZO S, SAYERS E J, *et al*. Dextrin conjugation to colistin inhibits its toxicity, cellular uptake and

acute kidney injury *in vivo* [J]. *RSC Pharm*, 2024, **1**(1): 68-79.

[7] RAZA A, MUSHTAQ N, JABBAR A, *et al*. Antimicrobial peptides: a promising solution to combat colistin and carbapenem resistance [J]. *Gene Reports*, 2024, **36**: 101935.

[8] JOO L, JEONG H Y, BAE D H, *et al*. Prostaglandin F2α analogue, bimatoprost ameliorates colistin-induced nephrotoxicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, **168**: 115446.

[9] AZAD M A K, SIVANESAN S, WANG J P, *et al*. Methionine ameliorates polymyxin-induced nephrotoxicity by attenuating cellular oxidative stress [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, **62**(1): e01254-17.

[10] BALLı F N, EKINCI P B, KURTARAN M, *et al*. Battle of polymyxin induced nephrotoxicity: polymyxin B versus colistin [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2024, **63**(2): 107035.

[11] VELKOV T, THOMPSON P E, NATION R L, *et al*. Structure—activity relationships of polymyxin antibiotics [J]. *J Med Chem*, 2010, **53**(5): 1898-1916.

[12] GAI Z B, SAMODELOV S L, KULLAK-UBLICK G A, *et al*. Molecular mechanisms of colistin-induced nephrotoxicity [J]. *Molecules*, 2019, **24**(3): 653.

[13] 郭 晨, 冯 军, 蔡正艳, 等. Setmelanotide 的制备工艺改进 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(8): 1133-1140.

[14] 张 友, 唐汉卿, 赵文杰, 等. 多黏菌素类似物的设计合成及体外抗菌活性 [J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(10): 1378.

[15] LI Y N, DONG Y Z, LU J G, *et al*. Design, synthesis and antibacterial activity of novel colistin derivatives with thioether bond-mediated cyclic scaffold [J]. *J Antibiot*, 2023, **76**(5): 260-269.

[16] SARZANINI C. Recent developments in ion chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, **956**(1): 3-13.

[17] 黎七雄, 汪 晖, 肖清秋, 等. 半数致死量 (LD_{50}) Bliss 法的评价及计算 [J]. 数理医药学杂志, 1995, **8**(4): 3.

(上接第 468 页)

[5] MIWA K, HITAKA T, IMADA T, *et al*. Discovery of 1-[4-[1-(2,6-difluorobenzyl)-5-[(dimethylamino)methyl]-3-(6-methoxypyridazin-3-yl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-*d*]pyrimidin-6-yl]phenyl]-3-methoxyurea (TAK-385) as a potent, orally active, non-peptide antagonist of the human gonadotropin-releasing hormone receptor [J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(14): 4998-5012.

[6] SASAKI S, CHO N, NARA Y, *et al*. Discovery of a thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-dione bearing a *p*-mehoxy-ureidophenyl moiety at the 6-position: a highly potent and orally bioavailable non-peptide antagonist for the human luteinizing hormone-releasing hormone receptor [J]. *J Med Chem*, 2003, **46**(1): 113-124.

[7] 刘地发, 郭正友, 郭烈平, 等. 一种瑞卢戈利的中间体化合物及其制备方法和用途: 中国, 111333633A [P]. 2020-06-26.

[8] 万 华, 斯 涛, 周 平, 等. 一种瑞卢戈利的合成方法: 中国, 110194776A [P]. 2019-09-03.

[9] 周步高, 马 雷, 戴敏捷, 一种瑞卢戈利杂质的生产方法: 中国, 117186120A [P]. 2023-12-08

[10] 郭万成, 张富昌, 段永立, 等. 高纯度的噻吩并嘧啶化合物及其制备方法: 中国, 114907370A [P]. 2022-08-16.