

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

ZYGZEA

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 中国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊
- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 中国药学会系列期刊

本期导读：

治疗新型冠状病毒肺炎的国内临床试验化学药物简介

张庆伟，郭政，黄雷，张子学，张怡，李建其

混悬型滴眼剂的研究进展

易婷，赵雁，陶涛



微信号：cjph-cjph



主 办

上海医药工业研究院

中国药学会

中国化学制药工业协会

ISSN 1001-8255



9 771001 825206

2020年6月

第51卷

Vol.51 No.6

中国医药工业杂志

二〇二〇年

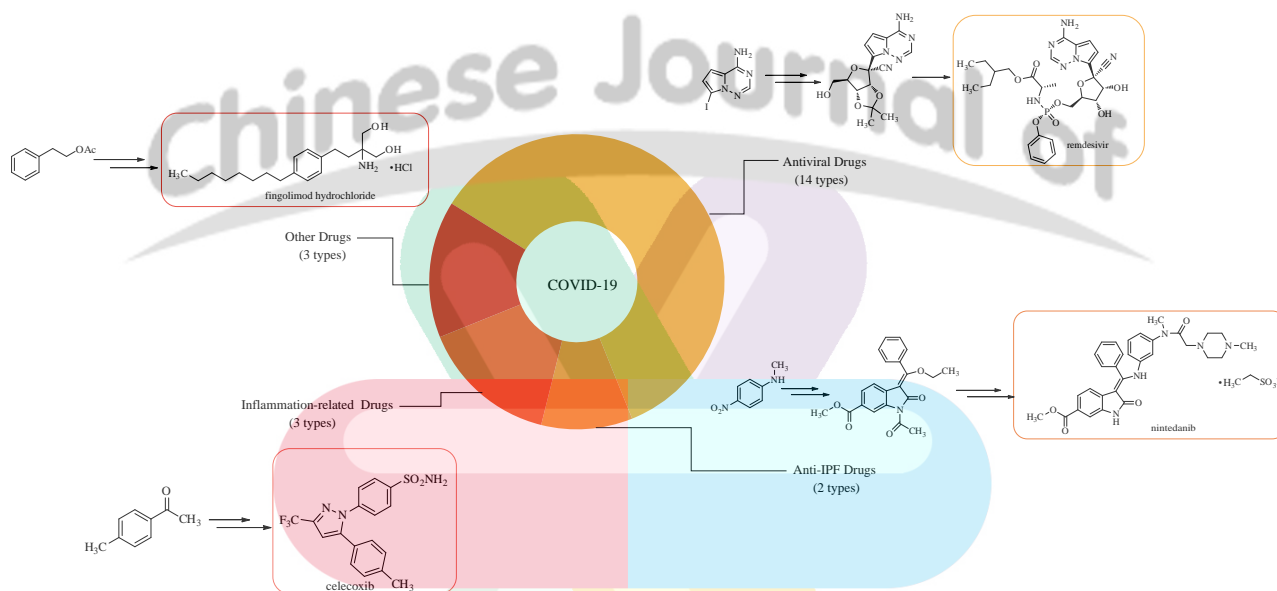
第五十一卷

第六期

第659-800页

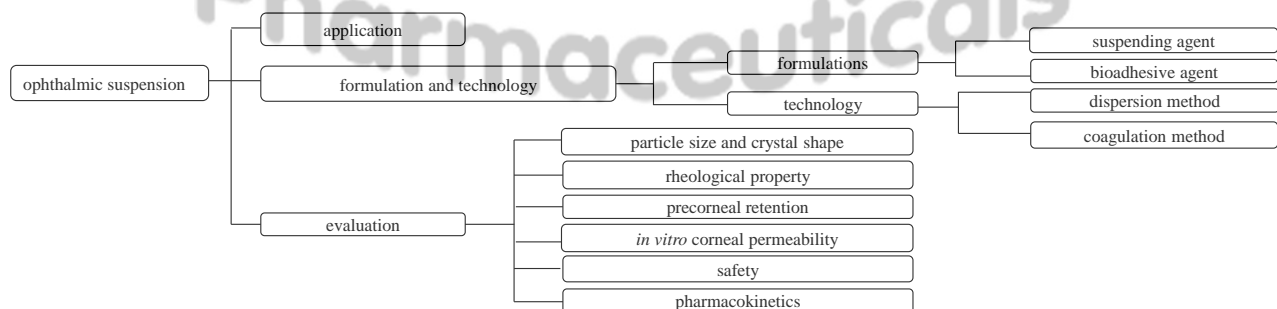
· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

- 659** 治疗新型冠状病毒肺炎的国内临床试验化学药物简介.....张庆伟, 郭 政, 黄 雷, 张子学, 张 怡, 李建其*
 Review of Chemical Drugs Applied for Clinical Trials for the Treatment of COVID-19 in China
ZHANG Q W, GUO Z, HUANG L, ZHANG Z X, ZHANG Y, LI J Q*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.001

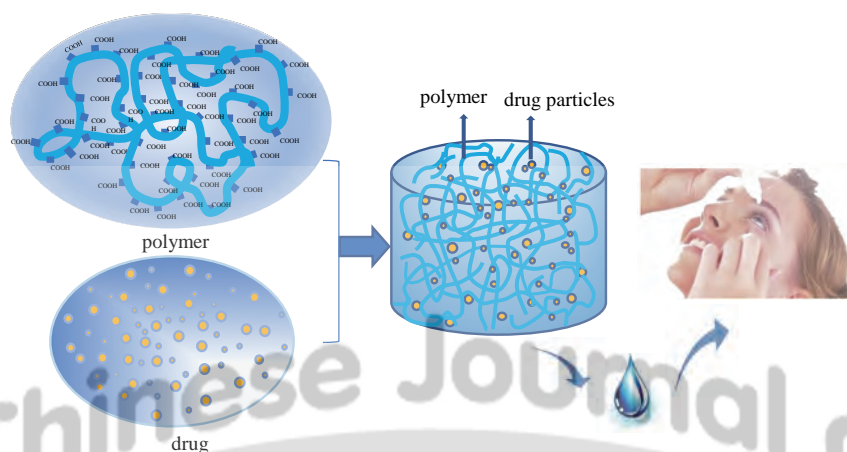


Introduction of 22 Chemical Drugs Applied for Clinical Trials for the Treatment of COVID-19 in China

- 679** 混悬型滴眼剂的研究进展.....易 婷, 赵 雁*, 陶 涛
 Research Progress of Ophthalmic Suspension.....YI T, ZHAO Y*, TAO T
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.002

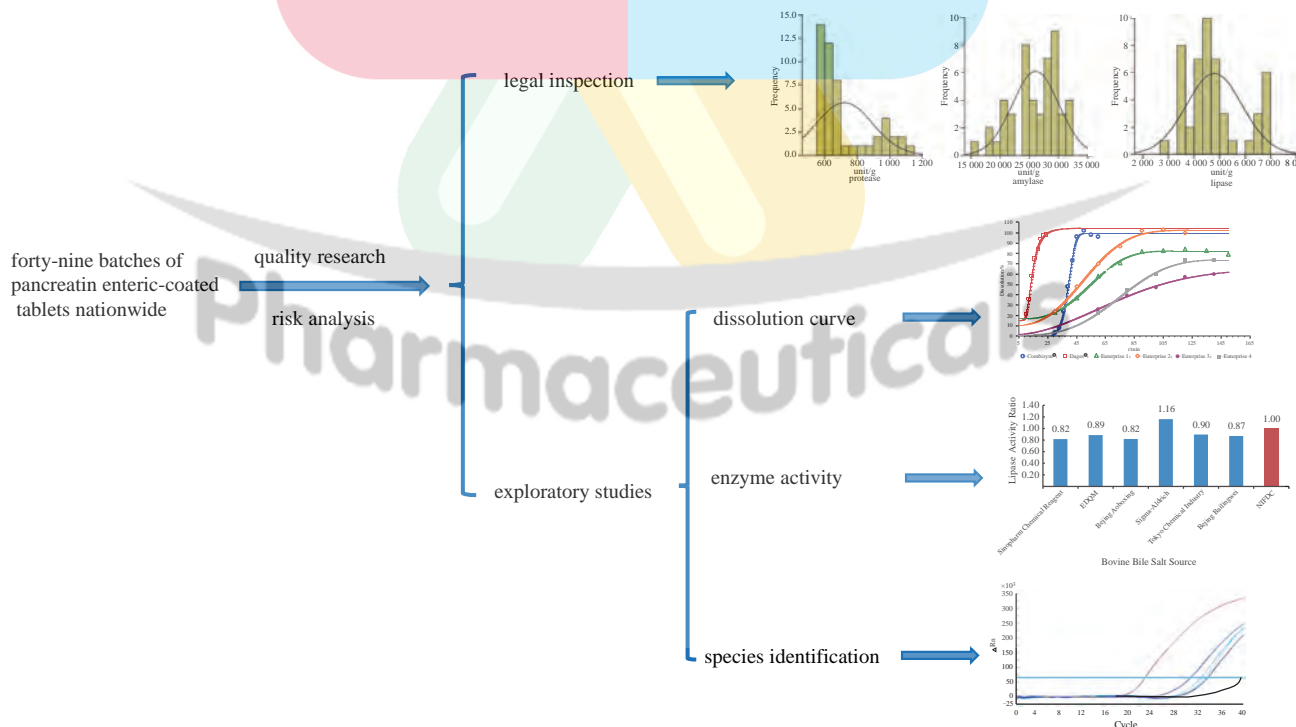


- 687 丙烯酸交联聚合物用于眼部给药系统的研究进展.....王淑娟, 张建华, 庄鹏飞, 葛育红, 陈再新*
 Research Progress of Acrylate Crosspolymer for Ophthalmic Drug Delivery.....
WANG S J, ZHANG J H, ZHUANG P F, GE Y H, CHEN Z X*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.003

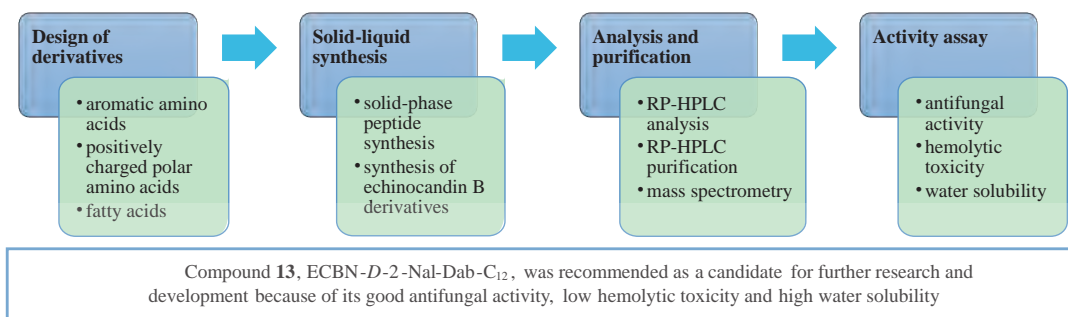


· 研究论文 (Paper) ·

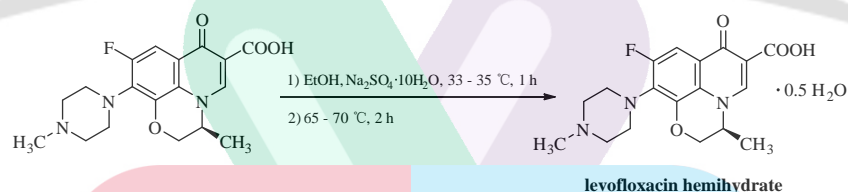
- 696 国产胰酶肠溶片的质量研究与风险分析.....郑璐侠, 张颖, 邵泓, 陈钢, 陈桂良*
 Quality Research and Risk Analysis of Domestic Pancreatin Enteric-coated Tablets.....
ZHENG L X, ZHANG Y, SHAO H, CHEN G, CHEN G L*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.004



- 704** 棘白菌素 B 新型衍生物的设计合成及体外抗真菌活性……朱 冰, 东圆珍, 张喜全, 马 洁*
Design, Synthesis and *in vitro* Antifungal Activities of Novel Echinocandin B Derivatives……………
……………ZHU B, DONG Y Z, ZHANG X Q, MA J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.005

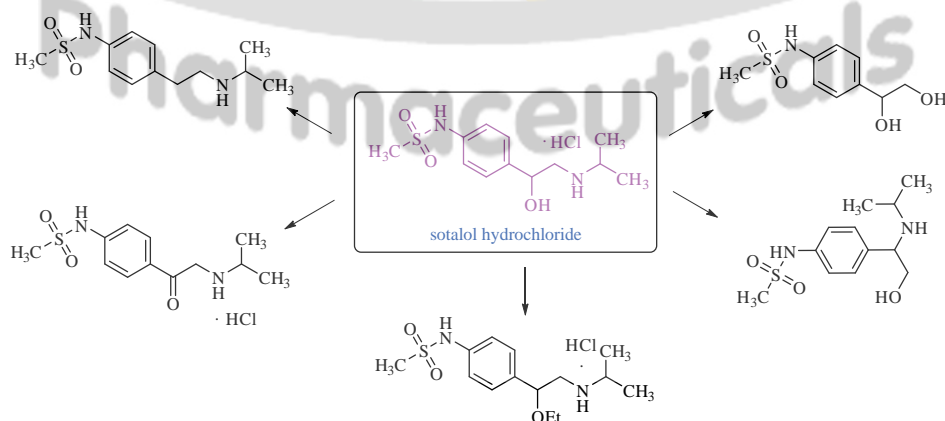


- 713** 左氧氟沙星半水合物的制备工艺……舒理建, 沈晓峰, 杨平爱, 杜 超, 王哲清
Preparation Process of Levofloxacin Hemihydrate……………
……………SHU L J, SHEN X F, YANG P A, DU C, WANG Z Q
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.006



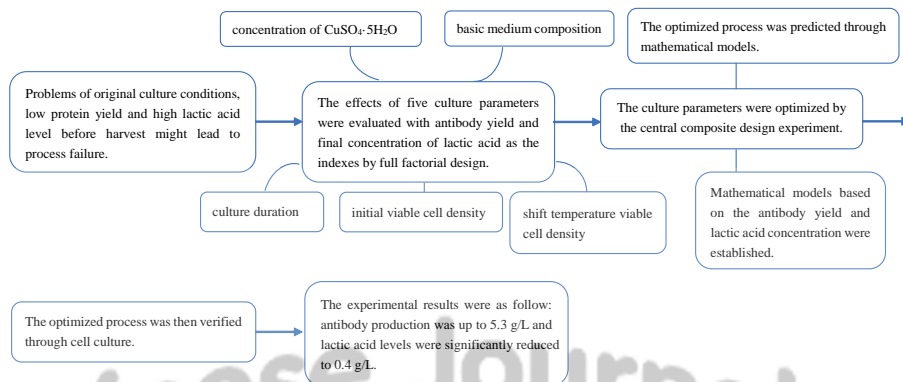
An improved synthetic process of levofloxacin hemihydrate was reported. This process solved the problems of large residual amounts of high-boiling solvents in target product and large amounts of low-boiling solvents used in levofloxacin hemihydrate preparation.

- 716** 盐酸索他洛尔有关物质的合成……叶 欣, 孙忠华, 陈益林, 胡小丽, 朱怡君*
Synthesis of the Related Substances of Sotalol Hydrochloride……………
……………YE X, SUN Z H, CHEN Y L, HU X L, ZHU Y J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.007

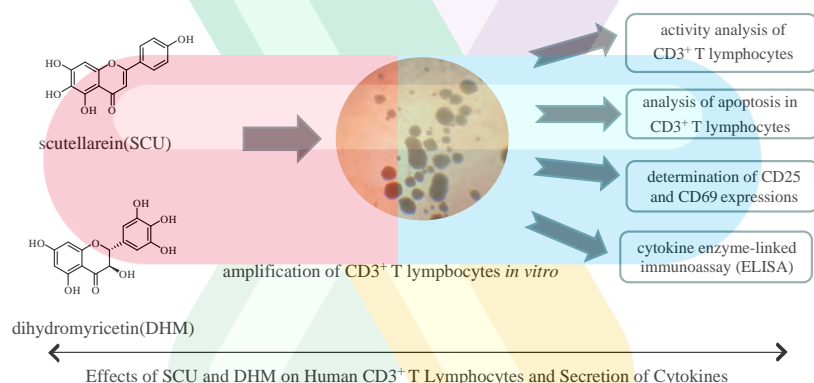


In order to control the quality of the bulk drug and preparation of sotalol hydrochloride, five related substances including one novel impurity of sotalol hydrochloride were prepared and their structures were confirmed.

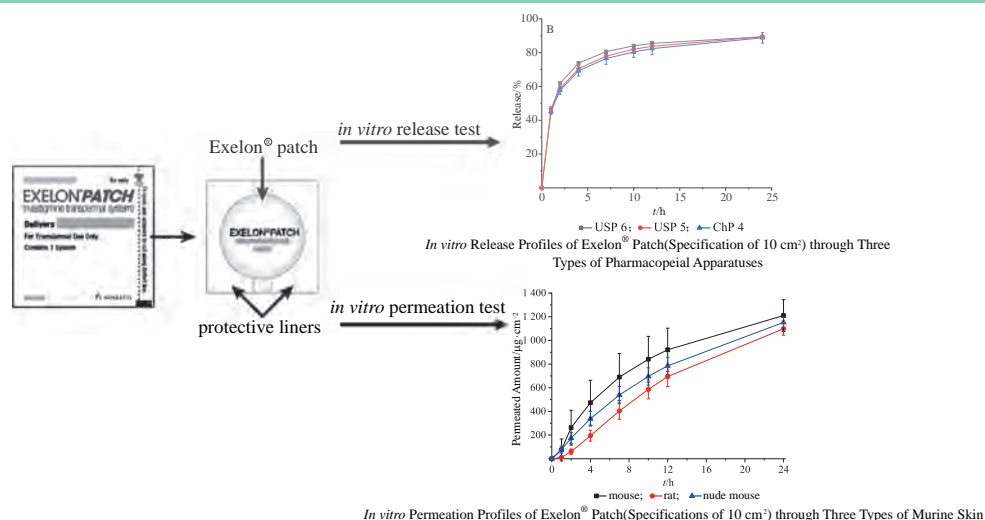
- 721 基于试验设计与响应面分析法的重组贝伐珠单抗细胞培养工艺优化.....丁 钰, 杨倩倩, 沈智勇, 赵 瑾, 邱树毅*
Cell Culture Process Optimization of Recombinant Bevacizumab Based on Experimental Design and Response Surface Analysis.....DING Y, YANG Q Q, SHEN Z Y, ZHAO J, QIU S Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.008



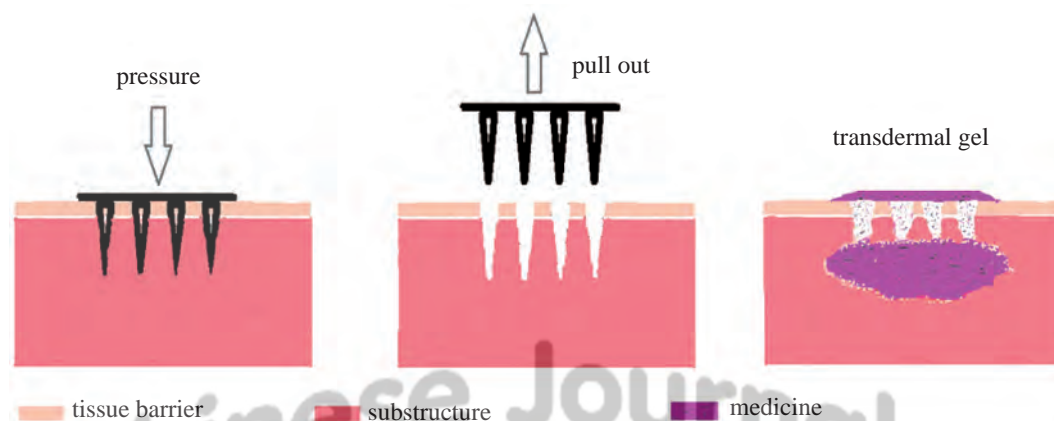
- 729 灯盏乙素昔元和二氢杨梅素对人 CD3⁺ T 淋巴细胞的影响.....严伟杰, 杨兆祥, 魏晓慧, 徐宇虹*
Effects of Scutellarein and Dihydromyricetin on Human CD3⁺ T Lymphocytes.....YAN W J, YANG Z X, WEI X H, XU Y H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.009



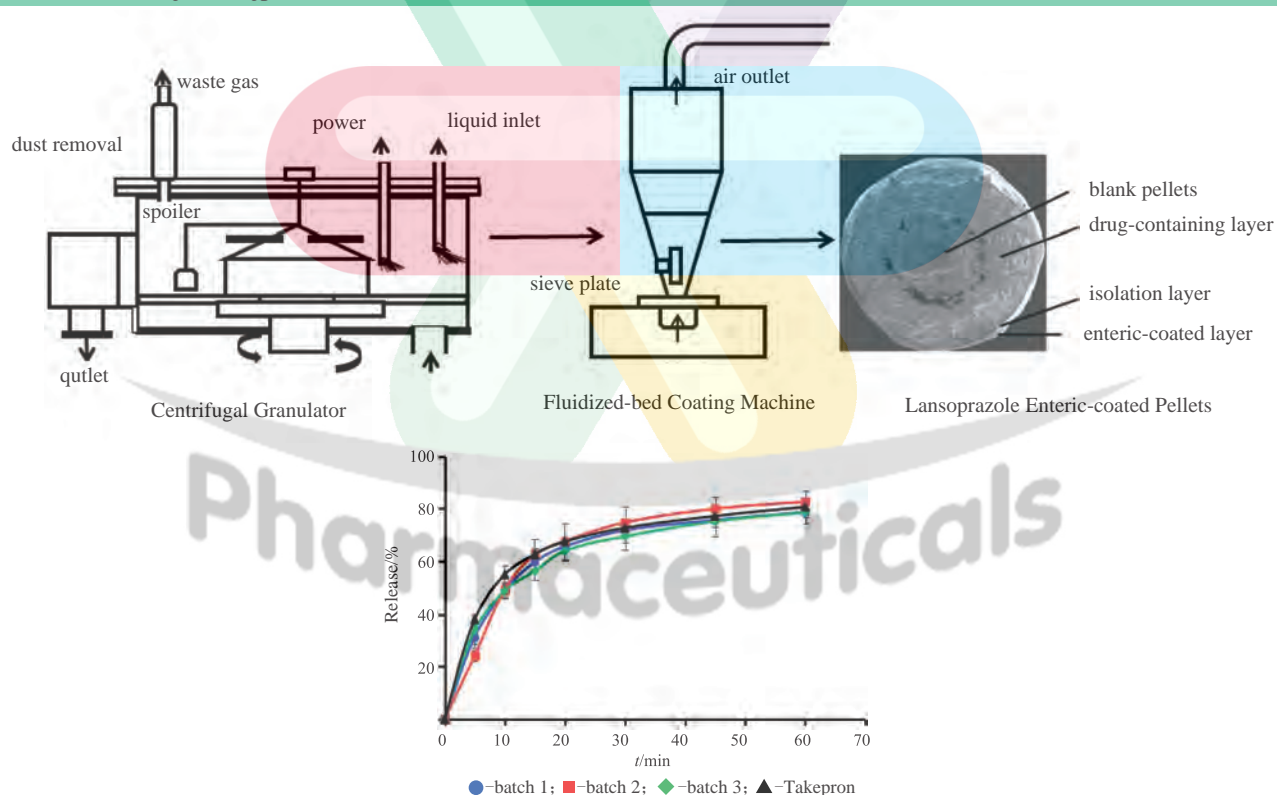
- 735 检测方法对利斯的明透皮贴剂体外释放的影响及体外渗透与体内相关性的评价.....陈亚楠, 汪 晴*
Effect of Determination Method on *in vitro* Release Profiles of Rivastigmine Transdermal Patches and Correlation between Penetration *in vitro* and Absorption *in vivo*.....CHEN Y N, WANG Q*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.010



- 741** 微针技术联合微乳型凝胶对黄芪多糖经皮渗透率影响的考察.....巫传玲, 邓晶晶*
Investigation on Transdermal Permeability of *Astragalus* Polysaccharide Microemulsion-based Gel Combined with Microneedle Technique.....WU C L, DENG J J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.011

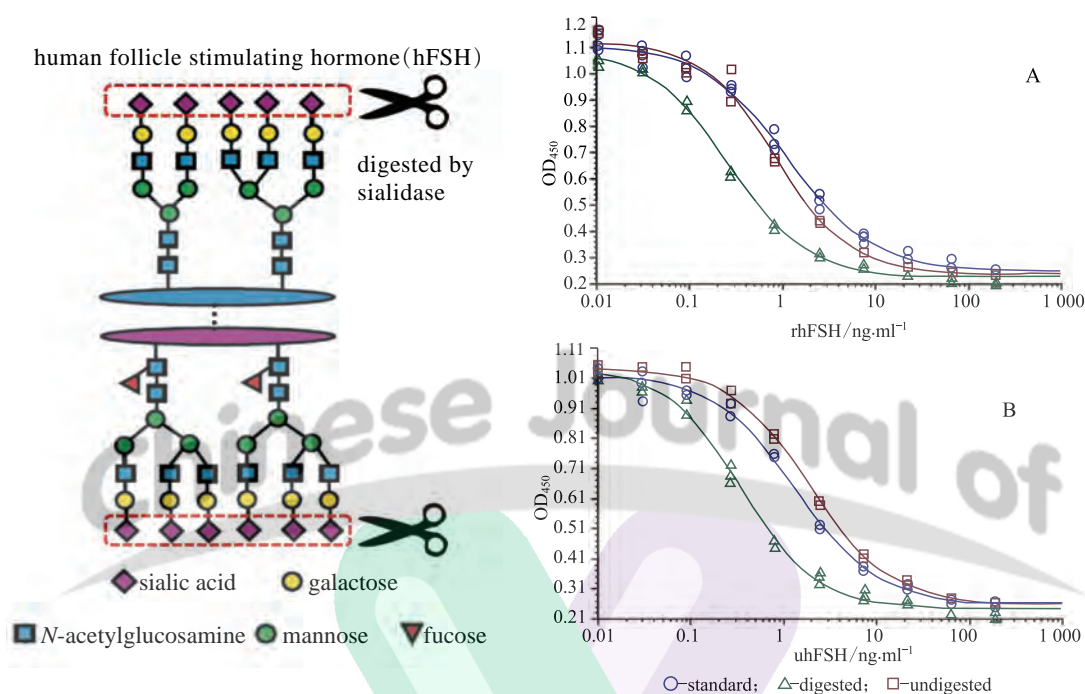


- 746** 兰索拉唑肠溶微丸的研制和体外评价.....曹爱晨, 于双雨, 刘璐, 刘艳华*
Preparation and *in vitro* Evaluation of Lansoprazole Enteric-coated Pellets.....CAO A C, YU S Y, LIU L, LIU Y H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.012

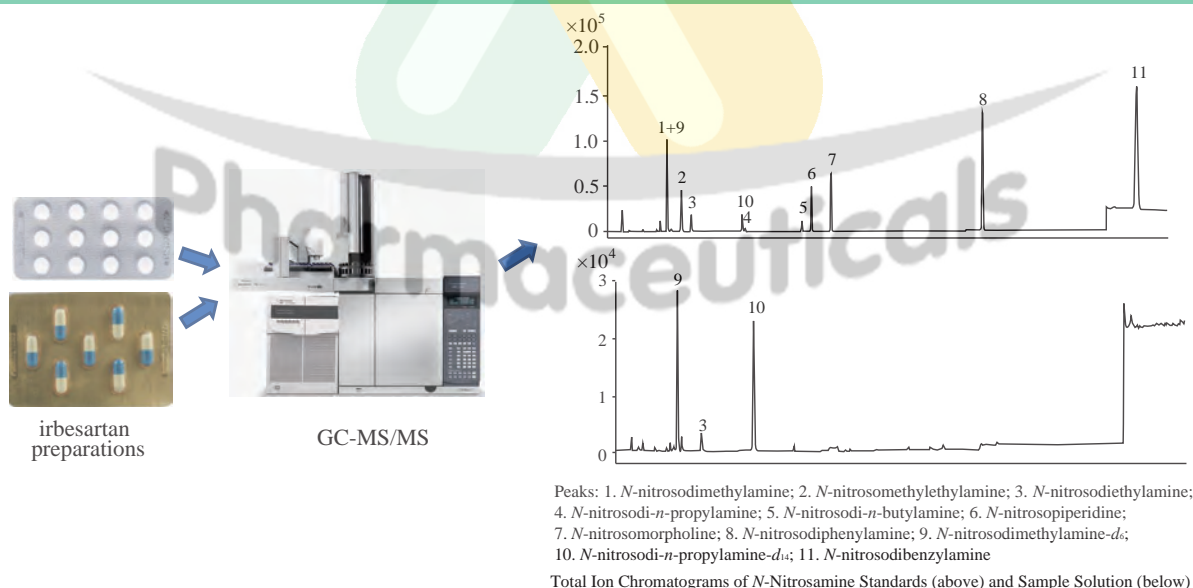


Release Curves of Three Batches of the Optimal Pellets in pH 6.8 PBS

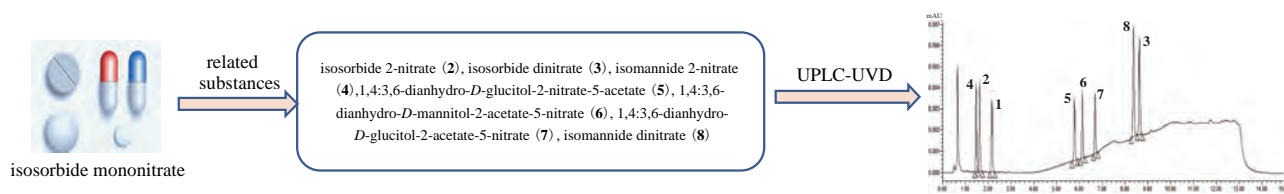
- 753 唾液酸对人卵泡刺激素生物活性评价的影响……汪泓, 王灿, 王自强, 陈钢, 邵泓*
Effect of Sialic Acid on Human Follicle Stimulating Hormone Bioactivity Assessment……………
……………WANG H, WANG C, WANG Z Q, CHEN G, SHAO H*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.013



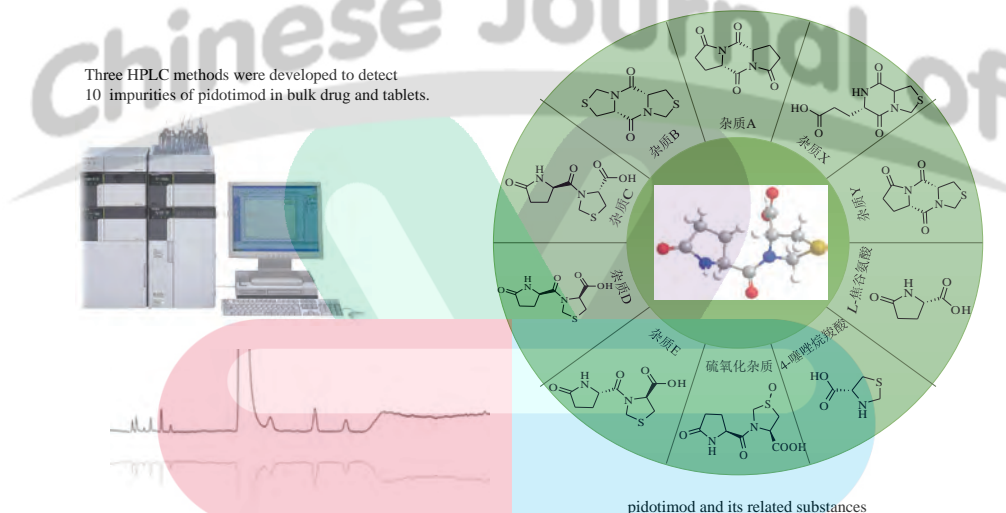
- 759 厄贝沙坦制剂中 *N*-亚硝胺类基因毒性杂质的 GC-MS/MS 测定……葛雨琦, 叶晓霞, 乐健, 杨永健, 王彦*
Simultaneous Determination of Genotoxic *N*-Nitrosamine Impurities in Irbesartan Preparations by GC-MS/MS……………
……………GE Y Q, YE X X, LE J, YANG Y J, WANG Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.014



- 765** UPLC 法测定单硝酸异山梨酯中的有关物质……刘彩云, 刘朝辉, 张敏敏, 刘思光, 张贵民*
Determination of the Related Substances in Isosorbide Mononitrate by UPLC……
……LIU C Y, LIU C H, ZHANG M M, LIU S G, ZHANG G M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.015



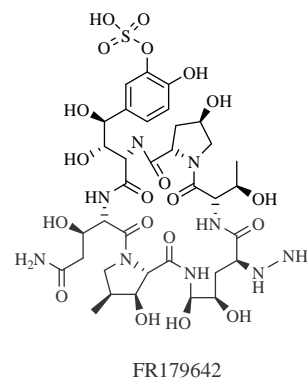
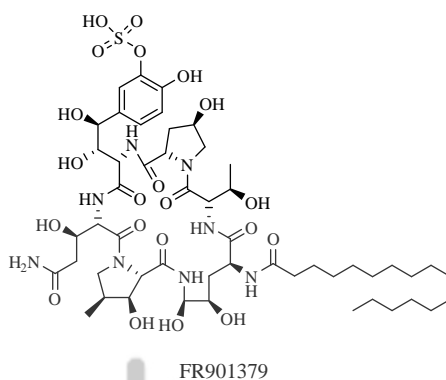
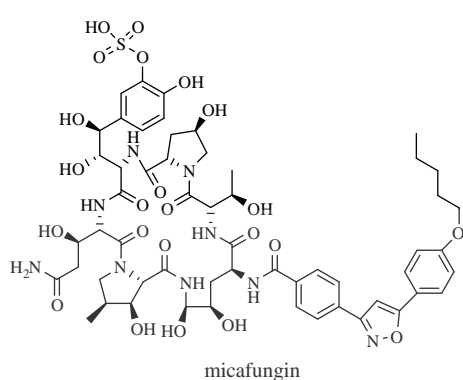
- 771** HPLC 法测定匹多莫德原料及片剂的有关物质…陈 东, 吴仲夏, 扶昭发, 刘晖晖, 吴传斌*
Determination of Related Substances in Pidotimod and Its Tablets by HPLC……
……CHEN D, WU Z X, FU Z F, LIU H H, WU C B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.016



- 778** 银杏二萜内酯葡胺注射液与一次性输液器的相容性考察……胡军华, 钱频非, 于桂芳, 王 雪, 王振中*
Compatibility between Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection and Infusion Sets for Single Use
……HU J H, QIAN P F, YU G F, WANG X, WANG Z Z*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.017

Diterpene Ginkgolides Meglumine Injection				
compatibility				
	PVC	TPU	TPE	ULDPE
adsorption test	pH	pH	pH	pH
	UV absorption	UV absorption	UV absorption	UV absorption
	content	content	content	content
extraction test	metal elements	2,4-TDI 1,5-naphthalene diisocyanate	metal elements	metal elements
	epoxyethane	2,6-TDI	epoxyethane	DBP
	vinyl chloride	HMDI	styrene	epoxyethane
migration test	DEHP	1076	vinyl chloride	octylene
	DBP	1010	1076	butylethylene
	DMP	cyclohexyl isocyanate phenyl isocyanate	1010	propylene

- 784** 米卡芬净中间体 FR901379 的分离纯化.....李 敏, 谢新宇, 王晶珂, 郑学丽, 张雪霞*
 Separation and Purification of Micafungin Intermediate FR901379.....
LI M, XIE X Y, WANG J K, ZHENG X L, ZHANG X X*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.018



· 药学管理与信息 (Pharmaceutical Management & Information) ·

- 789** 小容量注射剂共线生产的质量风险控制研究.....田文淼, 梁 毅*
 Quality Risk Control Study on Co-line Production of Small Volume Injections.....
TIAN W M, LIANG Y*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.019

- 795** 基于风险评估的技术转移及其管理.....李 力, 丁满生, 路慧丽, 朱建伟*
 A Risk-based Approach in Technology Transfer and Management.....
LI L, DING M S, LU H L, ZHU J W*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.020

· 其他 ·

广告索引 (695)

Pharmaceuticals

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2020年第51卷 第6期 6月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.51 No.6 June 10, 2020

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	王 盈, 许文倩	Executive Editor	WANG Ying, XU Wenqian
编 辑 出 版	《中国医药工业杂志》编辑部	Edited by	Editorial Board of Chinese Journal of Pharmaceuticals
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号 (200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广 告 发 行 联 系			
电 话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市邮政公司报刊发行局	Domestic Distributed by	Shanghai Post Company Newspaper Issuance Bureau
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*142*zh*P*20.00* *20*2020-06

版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十六届编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》

(以姓名拼音为序)

名誉主编 (HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫* (SANG Guowei)

主任编委 (EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿* (CHEN Fener)

顾问 (CONSULTANT)

白 骅 (BAI Hua)

孔德云 (KONG Deyun)

吴晓明 (WU Xiaoming)

陈凯先* (CHEN Kaixian)

李绍顺 (LI Shaoshun)

杨胜利* (YANG Shengli)

丁 健* (DING Jian)

沈竞康 (SHEN Jingkang)

朱宝泉 (ZHU Baoquan)

侯惠民* (HOU Huimin)

王广基* (WANG Guangji)

副主任编委 (ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) ([△]常务副主任编委)

陈代杰[△] (CHEN Daijie)

林剑秋 (LIN Jianqiu)

王军志* (WANG Junzhi)

张 霁 (ZHANG Ji)

周伟澄[△] (ZHOU Weicheng)

陈桂良 (CHEN Guiliang)

潘广成 (PAN Guangcheng)

魏树源 (WEI Shuyuan)

张万斌 (ZHANG Wanbin)

朱建伟 (ZHU Jianwei)

胡文浩 (HU Wenhao)

唐 岳 (TANG Yue)

杨 超 (YANG Chao)

张绪穆 (ZHANG Xumu)

李明华 (LI Minghua)

王 浩[△] (WANG Hao)

张贵民 (ZHANG Guimin)

周 斌 (ZHOU Bin)

编委 (MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳 (CAI Zhengyan)

程卯生 (CHENG Maosheng)

范代娣 (FAN Daidi)

甘 勇 (GAN Yong)

何 军 (HE Jun)

胡又佳 (HU Youjia)

李范珠 (LI Fanzhu)

刘玲玲 (LIU Lingling)

龙亚秋 (LONG Yaqiu)

罗国强 (LUO Guoqiang)

潘红娟 (PAN Hongjuan)

沈 琦 (SHEN Qi)

孙小强 (SUN Xiaoqiang)

涂家生 (TU Jiasheng)

王 健 (WANG Jian)

王玉成 (WANG Yucheng)

吴 勇 (WU Yong)

杨苏蓓 (YANG Subei)

张福利 (ZHANG Fuli)

张卫东 (ZHANG Weidong)

赵文杰 (ZHAO Wenjie)

钟为慧 (ZHONG Weihui)

朱建英 (ZHU Jianying)

常 艳 (CHANG Yan)

邓卫平 (DENG Weiping)

方 浩 (FANG Hao)

干荣富 (GAN Rongfu)

何 菱 (HE Ling)

黄则度 (HUANG Zedu)

李建其 (LI Jianqi)

刘新泳 (LIU Xinyong)

卢 懿 (LU Yi)

罗一斌 (LUO Yibin)

潘卫三 (PAN Weisan)

宋秋玲 (SONG Qiuling)

孙 逊 (SUN Xun)

涂 涛 (TU Tao)

王 旻 (WANG Min)

吴传斌 (WU Chuanbin)

吴勇琪 (WU Yongqi)

杨玉社 (YANG Yushe)

张启明 (ZHANG Qiming)

张英俊 (ZHANG Yingjun)

郑高伟 (ZHENG Gaowei)

周虎臣 (ZHOU Huchen)

朱雪焱 (ZHU Xueyan)

陈少欣 (CHEN Shaoxin)

丁锦希 (DING Jinxi)

冯 军 (FENG Jun)

古双喜 (GU Shuangxi)

何严萍 (HE Yanping)

黄志红 (HUANG Zhihong)

李三鸣 (LI Sanming)

刘 忠 (LIU Zhong)

陆伟根 (LU Weigen)

吕 扬 (LÜ Yang)

朴虎日 (PIAO Huri)

苏为科 (SU Weike)

汤 磊 (TANG Lei)

屠永锐 (TU Yongrui)

王全瑞 (WANG Quanrui)

吴 彤 (WU Tong)

杨立荣 (YANG Lirong)

殷 明 (YIN Ming)

张庆伟 (ZHANG Qingwei)

张志荣 (ZHANG Zhirong)

郑起平 (ZHENG Qiping)

周建平 (ZHOU Jianping)

庄春林 (ZHUANG Chunlin)

陈笑艳 (CHEN Xiaoyan)

董 琳 (DONG Lin)

傅 磊 (FU Lei)

郭 文 (GUO Wen)

胡海峰 (HU Haifeng)

金 拓 (JIN Tuo)

刘东飞 (LIU Dongfei)

柳 红 (LIU Hong)

陆伟跃 (LU Weiyue)

马 璟 (MA Jing)

邵 蓉 (SHAO Rong)

孙会敏 (SUN Huimin)

陶 涛 (TAO Tao)

王建新 (WANG Jianxin)

王 彦 (WANG Yan)

吴 伟 (WU Wei)

杨 明 (YANG Ming)

尤启冬 (YOU Qidong)

张庆文 (ZHANG Qingwen)

赵临襄 (ZHAO Linxiang)

钟大放 (ZHONG Dafang)

周一萌 (ZHOU Yimeng)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员 (EDITORIAL STAFF)

总编辑 (Managing Editor): 周伟澄 (ZHOU Weicheng)

副总编辑 (Associate Managing Editor): 黄志红 (HUANG Zhihong), 刘玲玲 (LIU Lingling)

责任编辑 (Editor): 刘玲玲 (LIU Lingling) (兼), 王 盈 (WANG Ying), 许文倩 (XU Wenqian), 刘艺楠 (LIU Yinan)

美术编辑 (Art Editor): 沈建成 (SHEN Jiancheng), 陆燕玲 (LU Yanling), 钱苗苗 (QIAN Miaomiao)

编辑助理 (Editorial Assistant): 韦旭华 (WEI Xuhua)

广告、发行负责 (Advertisement Manager): 李朝凤 (LI Chaofeng), 刘敬岩 (LIU Jingyan), 金 雷 (JIN Lei), 欧阳怡 (OUYANG Yi)

棘白菌素 B 新型衍生物的设计合成及体外抗真菌活性

朱 冰¹, 东圆珍², 张喜全³, 马 洁^{2*}

(1. 复旦大学药学院, 上海 201203; 2. 上海多米瑞生物技术有限公司, 上海 201203;

3. 正大天晴药业集团股份有限公司, 江苏南京 210000)

摘要: 本研究以棘白菌素 B 母核 (ECBN) 为基础, 在侧链中引入了多肽结构, 并探索出了棘白菌素 B 新型衍生物的固相及液相联合合成的路线。以不同芳香性氨基酸、极性带正电荷氨基酸以及脂肪酸为原料合成了 14 个新的棘白菌素 B 衍生物, 分别对其进行了抗真菌活性、溶血毒性、水溶性评估, 筛选得到了 ECBN-[3-(2-萘基)-D-丙氨酸]-(2,4-二氨基丁酸)-月桂酸 (ECBN-D-2-Nal-Dab-C₁₂, **13**)。相比于阿尼芬净, **13** 在保留抗真菌活性的同时, 溶血毒性大大降低, 并且水溶性得到极大改善, 时间-杀菌曲线也证实二者对白念珠菌和克柔念珠菌有相似的杀菌效果。因此, **13** 可作为候选化合物进一步研究和开发。

关键词: 棘白菌素 B 衍生物; 抗真菌药; 固-液相合成; 抗真菌活性; 水溶性

中图分类号: R914.2; R978.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2020)06-0704-09

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.06.005

Design, Synthesis and *in vitro* Antifungal Activities of Novel Echinocandin B Derivatives

ZHU Bing¹, DONG Yuanzhen², ZHANG Xiquan³, MA Jie^{2*}

(1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 2. Shanghai Duomirui Biotechnology Ltd., Shanghai 201203;

3. Chitai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 210000)

ABSTRACT: In this study, some peptides were introduced into the side chain on the nucleus of echinocandin B (ECBN) by a new solid-liquid synthesis route to obtain a series of novel echinocandin B derivatives. Using aromatic amino acids, positively charged polar amino acids and fatty acids as materials, fourteen derivatives were synthesized. According to the evaluation results of antifungal activity, hemolytic toxicity and water solubility, ECBN-[3-(2-naphthyl)-D-alanine]-(2,4-diaminobutyric acid)-lauric acid (ECBN-D-2-Nal-Dab-C₁₂, **13**) was found, which showed a comparable fungicidal effect, high water solubility and low hemolytic toxicity compared with anidulafungin. Moreover, the time-killing assay against *Candida. albicans* and *C. krusei* also confirmed that both compound **13** and anidulafungin showed the similar fungicidal effect, so compound **13** could be recommended as a candidate for further research and development.

Key Words: echinocandin B derivative; antifungal agent; solid-liquid synthesis; antifungal activity; water solubility

收稿日期: 2020-03-12

基金项目: 国家重点研发计划“新型畜禽药创制与产业化研究”项目 (2017YFD0501404)

作者简介: 朱 冰(1996—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 微生物与生化药学。

Tel: 021-20572000×8713

E-mail: 17211030037@fudan.edu.cn

通信联系人: 马 洁(1988—), 女, 博士, 助理研究员, 从事多肽药物研究。

Tel: 17714419331

E-mail: ma2222jie@163.com

棘白菌素 B (echinocandin B, ECB) 是从构巢曲霉菌 (*Aspergillus nidulans*) 的发酵培养液中分离得到的一种脂肽类化合物, 具有环状六肽母核和亚油酰基侧链^[1], 其结构如图 1 所示。ECB 对多数念珠菌和曲霉菌都有较好的抗真菌活性, 但同时存在抗菌谱窄、水溶性极差和溶血毒性强等致命性缺点, 使其不能应用于临床^[2], 因此研究人员对 ECB 进行了大量的结构改造和修饰研究, 获得了上市药物

阿尼芬净(anidulafungin)和多种衍生物。

棘白菌素类抗真菌药通过非竞争性抑制真菌细胞的 β -1,3-葡聚糖合成酶,使真菌细胞壁重要组成成分 β -1,3-葡聚糖的合成受阻,细胞壁的完整性被破坏,从而导致真菌细胞溶解死亡^[3],且由于人体细胞不含有细胞壁,缺乏 β -1,3-葡聚糖合成酶,因此该类药物对人体的毒性较低,是迄今为止安全性较高的一类抗真菌药物。棘白菌素类抗真菌药具有抗菌谱广、抗真菌活性强、安全性高、无交叉耐药性和药物相互作用少等特点,已被推荐用作治疗侵袭性真菌感染的一线药物^[4]。虽然有这么多令人满意的优势,水溶性差仍是棘白菌素类药物不容忽视的问题,且该类药物成本较高,售价昂贵,因此开发水溶性好、抗菌活性强、不良反应小以及成本较低的化合物,是研究人员努力的方向。

本研究以棘白菌素 B 母核(echinocandin B nucleus, ECBN, 图 1 方框中所示结构)为基础,在侧链中引入多肽结构,以不同的芳香性氨基酸、极性带正电荷的氨基酸以及脂肪酸等为原料设计合成了一系列新的 ECB 衍生物,并通过抗真菌活性、溶血毒性和水溶性测试对化合物进行评价,以期获得抗真菌活性强、水溶性好且毒性低的化合物。

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);600E-2487 型制备型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);R-300 型旋转蒸发仪(Buchi 公司);

SHP-150 型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司);SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

阿尼芬净(含量 98%,批号 160801)、ECBN 盐酸盐(ECBN·HCl,含量 98%,批号 20151001)和注射用乙酸卡泊芬净(含量 99%,批号 M046925)(正大天晴药业集团股份有限公司);2-氯三苯甲基氯树脂[2-CTC 树脂,取代度(SD)值=1.08 mmol/g,西安蓝晓科技新材料股份有限公司,规格 10 g,批号 03-190223];N-9-苄甲氧羰基-L-苯丙氨酸(Fmoc-Phe-OH,含量 99%,批号 GLS140623-35701);1-羟基苯并三唑(HOBt,含量 99%,批号 GLS151006-00602)、N,N-二异丙基乙胺(DIEA,含量 99%,批号 GLS161007-00810)、2-(7-氧化苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU,含量 99%,批号 GLS170604-00703)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSU,含量 99%,批号 GLS110906-10501)和 N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC,含量 99%,批号 GLS111129-00802)[吉尔生化(上海)有限公司];N-9-苄甲氧羰基-3-(2-噻吩基)-L-丙氨酸(Fmoc-Thi-OH,含量 99%,批号 F02041170501)、N-9-苄甲氧羰基-3-(2-萘基)-D-丙氨酸(Fmoc-D-2-Nal-OH,含量 99%,批号 H21403160926)、N α -9-苄甲氧羰基-N ϵ -烯丙氧羰基-L-赖氨酸[Fmoc-Lys(Alloc)-OH,含量 99%,批号 F01232160919]和 N α -9-苄甲氧羰基-N γ -烯丙氧羰基-L-2,4-二氨基丁酸[Fmoc-Dab(Alloc)-OH,含量 99%,批号 H00401180416][希施生物科技(上海)有限公司];N-月桂酰肌氨酸(上海迈瑞尔化学技术有限公司,含量 99%,批号 P1069358);正辛酸(含量 99%,批

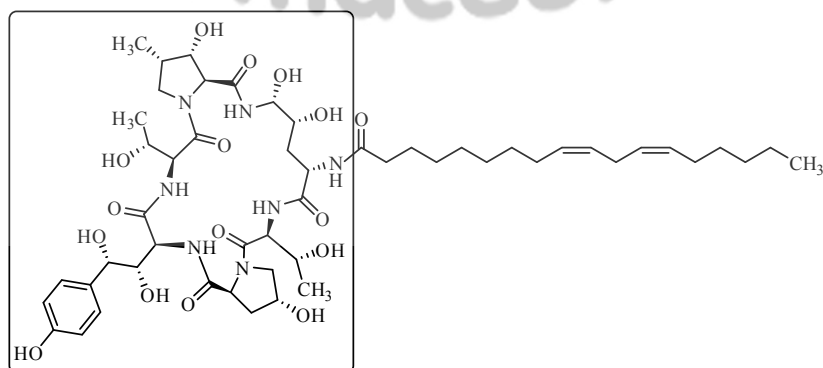


图 1 ECB 的结构式
Fig.1 Structure of ECB

号 20181109)、癸酸 (含量 99%, 批号 20180522)、月桂酸 (lauric acid, 含量 99%, 批号 20161222)、苯酚 (含量 99%, 批号 20190509)、无水乙醇 (批号 1803250416, 分析纯)、哌啶 (PIP, 含量 99%, 批号 20190715)、无水乙醚 (批号 20190709, 分析纯)、二甲亚砜 (DMSO, 批号 20191105, 分析纯) 和茚三酮 (含量 99%, 批号 20190617) (国药集团化学试剂有限公司); 三氟乙酸 (TFA, 含量 99%, 批号 P1459110) 和二异丙基碳二亚胺 (DIC, 含量 99%, 批号 F1712040) [阿拉丁试剂 (上海) 有限公司]; 三氟乙醇 (TFE, 含量 99%, 批号 77827048)、苯硅烷 (phenylsilane, 含量 99%, 批号 FJ200161) 和四 (三苯膦) 钯 [Pd(PPh₃)₄, 含量 99%, 批号 CE05117] [萨恩化学技术 (上海) 有限公司]; Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 批号 05118006); 无菌脱脂羊血 (郑州九龙生物制品有限公司, 批号 20191008)。

白念珠菌 (*Candida albicans*, ATCC 10231, 每毫升含 4×10^5 CFU, 中国食品药品检定研究院); 克柔念珠菌 (*C. krusei*, ATCC 6258, 每毫升含 5×10^5 CFU, 南京便诊生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 ECB 新型衍生物的设计

ECB 存在抗真菌谱窄、水溶性差及溶血毒性等缺点, 不能直接应用于临床, 且有研究表明溶血毒性仅与其亚油酰基侧链有关^[5], 因此研究人员对其侧链结构进行了大量的改造和修饰工作。修饰策略主要包括改变脂肪链的长度、引入苯环等, 并先后获得了西洛芬净 (cilofungin)、阿尼芬净以及 CD101 (rezafungin) 等, 但是水溶性差、生物利用度低的问题仍未解决。以上侧链修饰大都为烷氧苯基侧链, 多采用传统的化学合成方法获得, 目前尚无多肽结构修饰侧链的报道, 因此引入多肽结构进行改造是一种新颖且高效的修饰策略。

本研究以芳香性氨基酸和不同长度的脂肪链为原料合成侧链结构, 并将其与 ECBN 结构相连得到新的 ECB 衍生物。此外, 考虑到生理条件下真菌细胞膜带负电荷, 尝试在侧链结构中引入极性带正电荷氨基酸, 如赖氨酸 (Lys)、2,4-二氨基丁酸 (Dab), 一方面可以增加与细胞膜的相互作用, 另

一方面也能适度增加化合物极性, 希望能对水溶性有所改善。试验中所涉及到的氨基酸及脂肪酸的缩写及结构如表 1 所示, 所合成衍生物 1~14 的结构序列见表 2。

表 1 氨基酸及脂肪酸的缩写及结构

Tab.1 Abbreviations and Structures of Amino Acids and Fatty Acids

名称	缩写	结构
苯丙氨酸	Phe	
3-(2-萘基)-D-丙氨酸	D-2-Nal	
3-(2-噻吩)丙氨酸	Thi	
赖氨酸	Lys	
2,4-二氨基丁酸	Dab	
正辛酸	C ₈	
癸酸	C ₁₀	
月桂酸	C ₁₂	
月桂酰肌氨酸	Sar-C ₁₂	

2.2 ECB 新型衍生物的合成

本研究提出了一条 ECB 新型衍生物的固相及液相联合合成的路线, 采用经典 Fmoc 固相合成法合成多肽, 并在液相环境中与 ECBN 偶联形成衍生物。合成路线见图 2, 以合成 ECBN-D-2-Nal-Dab-C₁₂ (13) 为例。以 2-CTC 树脂 (a, SD=1.08 mmol/g) 作为固相载体, 经溶胀后, 与 Fmoc-D-2-Nal-OH 发生缩合反应, 之后脱除 Fmoc 保护基得到 b, 并使用茚三酮监测反应进程。之后加入 Fmoc-Dab (Alloc)-OH 再次进行缩合, 用茚三酮监测反应进程, 反应完全后再脱除 Fmoc 保护基。最后加入月桂酸进行缩合, 反应完全后得到 C 端连接于树脂且侧链受保护的化合物 d。树脂肽经裂解、

表 2 ECB 新型衍生物的结构序列、纯度、质谱结果及最低抑菌浓度 (MIC)

Tab.2 Sequences, Purities, MS Results and MICs of Novel ECB Derivatives

化合物	结构序列	纯度/%	理论相对 分子质量	[M+H] ⁺ m/z	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
					白念珠菌 (ATCC 10231)	克柔念珠菌 (ATCC 6258)
阿尼芬净	—	—	—	—	0.25	0.25
卡泊芬净	—	—	—	—	0.5	0.5
1	ECBN-Phe-C ₈	96.42	1 070.51	1 071.10	>32	>32
2	ECBN-Phe-C ₁₀	95.49	1 098.54	1 099.31	>32	>32
3	ECBN-Phe-C ₁₂	97.72	1 126.57	1 127.16	1.0	4.0
4	ECBN-Phe-Sar-C ₁₂	96.65	1 197.61	1 198.65	2.0	4.0
5	ECBN-D-2-Nal-C ₁₂	97.68	1 176.59	1 176.44	0.5	1.0
6	ECBN-Thi-C ₁₂	97.14	1 132.53	1 132.54	2.0	4.0
7	ECBN-Phe-Dab-C ₁₂	95.94	1 226.64	1 227.85	2.0	4.0
8	ECBN-Phe-Dab-Dab-C ₁₂	96.21	1 326.70	1 327.63	4.0	8.0
9	ECBN-Phe-Dab-Dab-Dab-C ₁₂	94.48	1 426.77	1 427.87	>32	>32
10	ECBN-Phe-Lys-C ₁₂	96.43	1 254.67	1 255.83	2.0	8.0
11	ECBN-Phe-Lys-Lys-C ₁₂	95.50	1 382.76	1 383.95	8.0	>32
12	ECBN-Phe-Lys-Lys-Lys-C ₁₂	97.33	1 510.86	1 511.14	>32	>32
13	ECBN-D-2-Nal-Dab-C ₁₂	98.46	1 276.65	1 277.68	1.0	2.0
14	ECBN-D-2-Nal-Dab-Dab-C ₁₂	95.62	1 376.72	1 377.84	4.0	8.0

过滤、旋蒸后洗涤、再次旋蒸、乙醚沉淀得到多肽 C₁₂-Dab (Alloc)-D-2-Nal-COOH (**e**)，**e** 经减压干燥后进行下一步反应，即 ECB 衍生物的合成。在缩合剂 DCC 和 HOSU 的作用下，多肽 **e** 转变为活化酯 **f**，再经过滤、旋蒸等步骤处理后，活化酯 **f** 在催化剂 DIEA 作用下，与 ECBN 进行反应，最后加入四 (三苯膦) 钯及苯硅烷脱侧链保护基 Alloc，沉淀得到粗产物 **13**。其余衍生物的合成过程与之相似，不含侧链保护基的化合物则不需脱除反应，与 ECBN 反应结束后直接乙醚沉淀即可得粗产物。

2.3 色谱分析及纯化

采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法分析粗产物，再用半制备型 RP-HPLC 进行纯化，最后通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 法对纯化后的 ECB 衍生物进行鉴定。

2.3.1 RP-HPLC 分析

以 **13** 为例，称取适量 **13** 粗产物，加水或流动相 A 配制约 1 mg/ml 的溶液，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。使用 RP-HPLC 法进行分析，色谱条件如下：色谱柱 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相 A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为含 0.1% TFA 的乙腈溶液，梯度洗脱 (0—5 min: A 70%，5—15 min: A 70%—10%，15—24 min: A 10%，24—26 min: A 10%—70%，26—30 min: A 70%)；流

速 1.0 ml/min；柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 210 nm；进样量 5 μl 。**13** 的粗产物的色谱图如图 3A 所示。

2.3.2 半制备型 RP-HPLC 纯化

称取适量粗产物，加水或流动相 C 配制约 50 mg/ml 的 ECB 新型衍生物溶液 (若不能完全溶解，可加入适量流动相 D 助溶)，再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，最后采用半制备型 RP-HPLC 进行纯化。色谱纯化条件如下：色谱柱 Kromasil C₁₈ 制备柱 (10 mm×250 mm, 10 μm)；流动相 C 为 1% 乙酸水溶液，D 为含 1% 乙酸的乙腈溶液，梯度洗脱 (0—10 min: C 90%，10—70 min: C 90%—40%，70—80 min: C 40%—20%，80—90 min: C 20%)；流速 5.0 ml/min；检测波长 215 和 280 nm。

经 RP-HPLC 纯化后，收集洗脱液，按“2.3.1”项下方法进行分析，合并纯度大于 95% 的收集液，经减压浓缩去除溶液中的乙腈及乙酸，再减压冷冻干燥，得到 ECB 新型衍生物纯品。各化合物纯化后的 HPLC 纯度列于表 2，其中 **13** 纯化后的 RP-HPLC 图谱见图 3B。

2.4 质谱鉴定

采用 ESI-MS 法检测纯化后的 ECB 衍生物，结果表明，各 ECB 衍生物的准分子离子峰与理论相对分子质量相符。图 4 为 **13** 的质谱检测结果，可见 m/z 为 1 277.68 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，与其理论相对分子质量

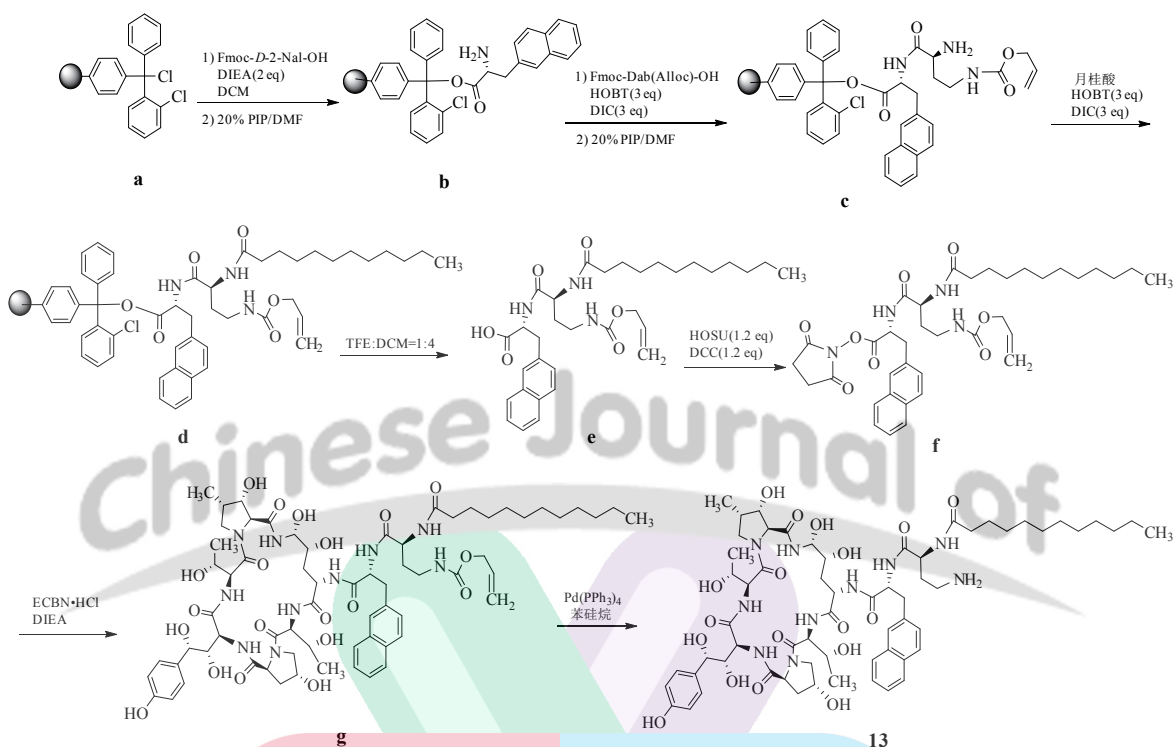
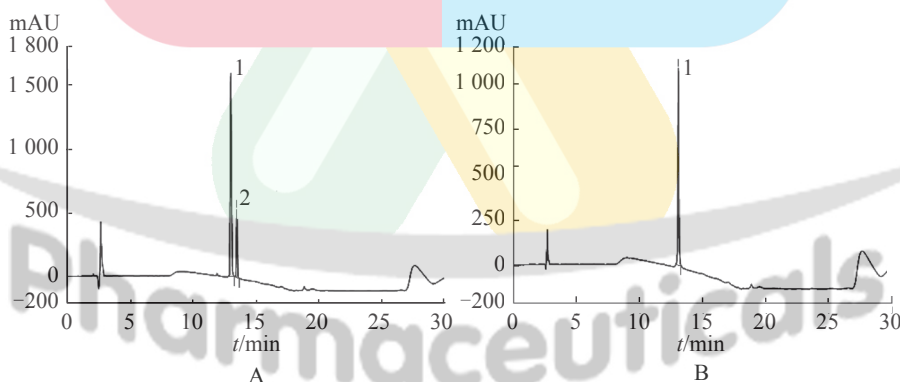


图 2 13 的合成路线
Fig.2 Synthetic Route of Compound 13



1-13; 2-杂质

图 3 13 粗产物 (A) 和 13 纯化后 (B) 的 RP-HPLC 图谱
Fig.3 RP-HPLC Chromatograms of Crude 13 (A) and Purified 13 (B)

1 276.65 相符, 其余化合物的质谱检测结果见表 2。

2.5 抗真菌活性测定

根据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 推荐的微量稀释法测定 ECB 新型衍生物的最低抑菌浓度 (MIC), 白念珠菌 (*C. albicans*) 和克柔念

珠菌 (*C. krusei*) 培养基采用 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基^[6]。

2.5.1 抗真菌药贮备液的制备

精密称取待测样品和阴性对照品阿尼芬净各 2 mg, 分别加入适量的 DMSO 配制成 320 μg/ml 的

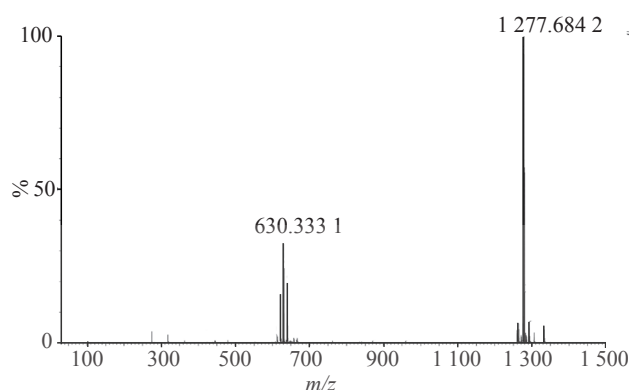


图4 13的质谱图

Fig.4 Mass Spectrum of Compound 13

贮备液，于 -20°C 冷藏避光保存。

2.5.2 接种菌悬液的制备

取对数生长期的菌液用 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基调整其浊度达到 0.5 麦氏标准，相当于每毫升含 $(1 \sim 5) \times 10^6$ CFU。取此菌悬液用 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基进行 1 : 20 稀释后，再进行 1 : 50 稀释作为待接种物，此时菌悬液浓度相当于每毫升含 $(1 \sim 5) \times 10^3$ CFU。

2.5.3 MIC 测定

采用 NCCLS 颁布的 M27-A 方法测定白念珠菌和克柔念珠菌对衍生物的敏感性^[7]，以肉眼观察，无真菌生长时确定为该样品的 MIC。各衍生物的 MIC 测定结果如表 2 所示。可见，在 14 个 ECB 新型衍生物中有 4 个化合物失去了抗真菌活性，而 3、5 和 13 的抗真菌活性较好，与阿尼芬净相比稍有所降低。

2.6 溶血毒性测定

2.6.1 受试物的制备

精密称取阿尼芬净适量，先以 DMSO 溶解制成 25.6 mg/ml 的溶液，再用 pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释为 1.28 mg/ml 的待测液。精密称取待检测的 ECB 衍生物样品适量，用含 0.5% Tween-80 的 PBS 配制为 1.28 mg/ml 的待测液。

2.6.2 血细胞处理

参考医用输液、输血、注射器具检验方法^[8]，以无菌脱纤维羊血作为试验对象。以 20 倍量的 pH 7.4 的 PBS 洗涤羊血，混匀后以离心 ($400 \times g$)

10 min，除去上清液，沉淀的红细胞用 PBS 重复上述洗涤操作 2 ~ 3 次，直至上清液不显红色。将所得红细胞用 PBS 配制成 2% 的混悬液，于 4°C 保存备用。

2.6.3 溶血率的测定

照张友等描述的溶血率测定方法进行试验^[9]，阿尼芬净的阴性对照为 2.5% DMSO/PBS、ECB 衍生物的阴性对照为 0.25% Tween-80/PBS，阳性对照为双蒸水。照下式计算溶血率，结果见表 3。

$$\text{溶血率} = \frac{\text{OD}_{540} - \text{OD}_{\text{阴性对照}}}{\text{OD}_{\text{阳性对照}} - \text{OD}_{\text{阴性对照}}} \times 100\%$$

溶血率小于 5% 为阴性，无溶血现象，大于 5% 为阳性，有溶血现象^[10]。各衍生物的溶血毒性测定结果显示，阿尼芬净的最低溶血浓度 (minimum lytic concentration, MLC) 为 $5 \mu\text{g/ml}$ ，即阿尼芬净的浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ (文献^[11]: $6 \mu\text{g/ml}$) 时已出现溶血现象，表现出较为严重的溶血毒性；而衍生物 1 ~ 14 的 MLC 均大于 $640 \mu\text{g/ml}$ ，即衍生物 1 ~ 14 即使在 $640 \mu\text{g/ml}$ 时都未见溶血现象，表明其溶血毒性远小于阿尼芬净。

表3 ECB 衍生物的溶血率测定结果

Tab.3 Hemolytic Activities of ECB Derivatives

化合物	OD ₅₄₀			溶血率/%
	第一孔	阴性对照	阳性对照	
阿尼芬净	0.072	0.044	0.472	6.5
1	0.051	0.039	0.488	2.7
2	0.048	0.036	0.459	2.8
3	0.057	0.041	0.483	3.6
4	0.059	0.04	0.476	4.4
5	0.046	0.039	0.442	1.7
6	0.047	0.037	0.474	2.3
7	0.047	0.039	0.468	1.9
8	0.063	0.047	0.450	4.0
9	0.053	0.040	0.462	3.1
10	0.068	0.049	0.490	4.3
11	0.065	0.051	0.460	3.4
12	0.053	0.039	0.472	3.2
13	0.055	0.043	0.455	2.9
14	0.060	0.045	0.466	3.6

2.7 溶解性能测定

通过对 MIC 和溶血毒性的结果进行综合分析可见，相比于阿尼芬净，化合物 3、5 和 13 在保留抗真菌活性的同时溶血毒性大大降低，可作为有潜

力的化合物进一步探究。为了评估极性、带正电荷的氨基酸的引入对化合物溶解性的影响,本研究初步测试了化合物 **3**、**5** 和 **13** 的水溶性,结果如表 4 所示。由表 4 可知,阿尼芬净溶解度极差,几乎不溶于水,**3** 和 **5** 在水中的溶解度也较差,但比阿尼芬净稍高。相比之下,在侧链结构中引入 Dab 后,**13** 的溶解度得到了提高,高于阿尼芬净、卡泊芬净、**3** 和 **5**。

表 4 ECB 衍生物在水中的溶解度 ($n=3$)
Tab.4 Solubility of ECB Derivatives in Water ($n=3$)

ECB 衍生物	溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
阿尼芬净	<0.01
卡泊芬净	28.12 ± 0.63
3	0.54 ± 0.19
5	0.11 ± 0.05
13	>50

2.8 时间-杀菌曲线试验

在所合成的衍生物中,**13** 不仅保留了抗真菌活性,而且溶血毒性大大降低,水溶性也得到了极大地改善,是一种比较有竞争力的候选化合物。本研究对阿尼芬净和 **13** 进行时间-杀菌曲线的探究,将一定浓度的受试药物与不同念珠菌株共同孵育,在不同的时间点对菌落进行计数,以此来评价二者对念珠菌的杀菌速率和抗菌活性^[12]。

2.8.1 抗真菌药贮备液的制备

称取适量阿尼芬净和 **13**,加入 DMSO,分别配制浓度为 100 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液,避光条件下于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。将各贮备液用 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基分别稀释 200 倍后得到化合物待测液,现配现用。

2.8.2 菌液的接种

取一块 96 孔板,分别加入稀释后的待测物溶液和含 0.5% DMSO 的 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基各 180 μl ,接着加入浊度达到 0.5 麦氏标准的菌液 20 μl ,混匀。其中阿尼芬净 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 **13** (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 为待测组,含 0.5% DMSO 的 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基为对照组。将接种后的 96 孔板置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气孵箱中孵育 48 h,在固定时

间点 0、2、4、6、12、24、48 h 时取样后稀释涂布平板。在取样点时对照组和待测组各取样 6~10 μl ,并分别用 Hyclone 改良型 RPMI-1640 培养基连续稀释后,将其涂布接种于 YPD 固体平板上。当预计菌落数少于 200 CFU/ml 时,可直接从溶液中取样 5 μl 涂布于平板。

2.8.3 孵育

接种真菌的 YPD 平板于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。

2.8.4 结果

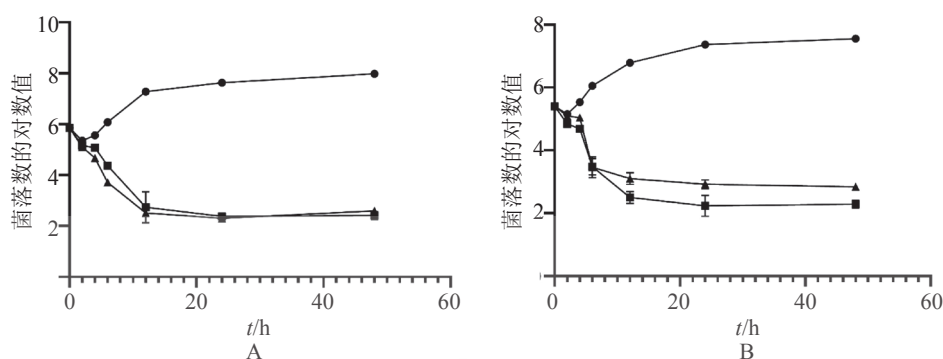
对孵育后的 YPD 平板上的菌落进行读取并记录,并以平板上生长菌落数 20 个为最低限。以取样时间为横坐标,菌落数的对数值为纵坐标绘制时间-杀菌曲线,结果如图 5 所示。

在 0~24 h 内,与阿尼芬净和 **13** 共孵育组的菌落数对数值呈现持续下降的趋势,与 0 h 时相比,24 h 时的菌落数对数值下降了 3 以上,且在 24~48 h 维持这一菌浓,证明二者对所测白念珠菌和克柔念珠菌均具有杀菌效果。杀菌曲线的斜率反映出药物对真菌的杀灭速率,**13** 对白念珠菌的杀菌速率与阿尼芬净较为相近,而对克柔念珠菌的杀菌速率则稍弱,这也与体外抗菌活性结果较为一致。

3 讨论

本研究在 ECB 的侧链中引入了多肽结构,并探索出一条 ECB 新型衍生物的固相及液相联合合成的路线,即首先以不同的氨基酸和脂肪酸为原料采用经典 Fmoc 固相合成的方法合成多肽结构,接着在液相环境中将多肽活化使其与 ECBN 相连得到新型 ECB 衍生物。分别选取了芳香性氨基酸 (Phe、*D*-2-Nal、Thi)、极性带正电荷的氨基酸 (Dab、Lys)、脂肪酸 (C_8 、 C_{10} 、 C_{12}) 为原料,参照上述路线合成了 14 个衍生物,体外抗菌试验结果表明这些化合物之间活性相差较大。

化合物 **1**~**3** 在结构上仅存在脂肪链长度的不同,对其 MIC 结果进行比较后可见,当脂肪链小于 12 个 C 时化合物失去抗真菌活性,以 C_{12} 修饰的 **3** 抗真菌活性较好。Debono 等在以一系列脂肪酰基修饰 ECBN 的过程中同样发现链长低于 10 个 C 的化合物的抗念珠菌活性较小^[13],本研究结果



A: 白念珠菌 ATCC 10231, B: 克柔念珠菌 ATCC 6258

●-对照组, ▲-2 µg/ml 的 13, ■-0.5 µg/ml 的阿尼芬净

图5 阿尼芬净和 13 对白念珠菌和克柔念珠菌的时间-杀菌曲线图

Fig.5 Time-killing Curves of Compound 13 (2 µg/ml) and Anidulafungin (0.5 µg/ml) against *C. albicans* ATCC 10231 and *C. krusei* ATCC 6258

与之较为一致。随后 Debono 等又探究了 $C_{12} \sim C_{22}$ 范围的脂肪酸修饰, 结果表明链长在 C_{13} 和 C_{18} 之间的类似物具有最佳活性, 但是考虑到脂肪链越长的化合物疏水性越强, 不利于提高其在水中的溶解度, 因此本研究选择以 C_{12} 进行修饰。此外, 4 与 3 的脂肪链长度相同, 只比后者多一个氨基酸, 但活性稍弱于后者, 以上结果表明侧链中的脂肪酸长度需要维持在一定范围内, 引入月桂酸后的化合物活性较好, 脂肪链较短可能导致化合物亲脂性偏低, 从而失去抗真菌活性。

本研究还对不同芳香性氨基酸的影响进行了探究, 将 3 中的 Phe 替换后得到了 5 和 6, 保留了化合物的抗真菌活性, 其中 5 的活性较为突出, 仅与阿尼芬净的活性相差 1 倍, 这可能与苯基修饰的化合物亲脂性较高有关。

以抗真菌活性较好的 3 和 5 的结构为基础, 分别引入不同数目的极性带正电荷的氨基酸得到了 7 ~ 14, 对其 MIC 结果的比较可见, 当只引入 1 个极性带正电荷的氨基酸时, 化合物的抗真菌活性均较好, 随着氨基酸数目的增加, 活性逐渐下降, 在引入氨基酸的数目达到 3 个时, 衍生物就已失去活性。此外, 相比 Dab, Lys 在结构上多 2 个 $-CH_2$, 结果引入 Lys 的衍生物活性比引入 Dab 的衍生物稍差, 这也对侧链的长度提出了一定的要求, 需要进一步探究。

从抗真菌活性和溶血毒性的结果来看, 3、5 和 13 表现较好, 抗真菌活性得到保留且溶血毒性大大降低, 但是前二者与阿尼芬净的水溶性均较差, 相比之下 13 的水溶性得到了极大提高, 表明极性带正电荷氨基酸的引入可以在保留抗真菌活性的基础上增加化合物的溶解度。此外, 时间-杀菌曲线结果也证实 13 具有与阿尼芬净类似的杀菌速率和杀菌效果, 本课题组在后续的研究中将其细胞毒性、体内药效和毒性进行深入研究, 以综合评估该化合物的活性和毒性。

参考文献:

- [1] NYFELER R. Metabolites of microorganisms. 143. Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components [J]. *Helv Chim Acta*, 1974, **57**(8): 2459-2477.
- [2] BARRETT D. From natural products to clinically useful antifungals [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1587**(2/3): 224-233.
- [3] PATIL A, MAJUMDAR S. Echinocandins in ocular therapeutics [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2017, **33**(5): 340-352.
- [4] CHANG C C, SLAVIN M A, CHEN S C A. New developments and directions in the clinical application of the echinocandins [J]. *Arch toxicol*, 2017, **91**(4): 1613-1621.
- [5] DEBONO M, TURNER W W, LAGRANDEUR L, et al.

Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB [J]. *J Med Chem*, 1995, **38**(17): 3271-3281.

- [6] BALOUIRI M, SADIKI M, IBNSOUDA S K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review [J]. *J Pharm Anal*, 2016, **6**(2): 71-79.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-fourth edition (M27-A) [S]. USA: CLSI/NCCLS, 2017.
- [8] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 14233. 2-2005 医用输液, 输血, 注射器具检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 6-7.
- [9] 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): 1378-1387.
- [10] WANG Q, TAN L L, YANG K. Cytocompatibility and hemolysis of AZ31B magnesium alloy with Si-containing coating [J]. *J Mater Sci Technol*, 2015, **31**(8): 845-851.
- [11] PETER T, BISSINGER R, LIU G, *et al.* Anidulafungin-induced suicidal erythrocyte death [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, **38**(6): 2272-2284.
- [12] CANTON E, PEMAN J, VALENTIN A, *et al.* *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(7): 3108-3111.
- [13] DEBONO M, ABBOTT B J, TURNER J R, *et al.* Synthesis and evaluation of LY121019, a member of a series of semisynthetic analogues of the antifungal lipopeptide echinocandin B [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, **544**(1): 152-167.