



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115778936 A

(43) 申请公布日 2023.03.14

(21) 申请号 202211623191.8

(22) 申请日 2022.12.16

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 代重山 沈建忠

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

专利代理师 赵静

(51) Int. Cl.

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

松萝酸协同增效多黏菌素在抗革兰氏阴性细菌感染中的应用

(57) 摘要

本发明公开了松萝酸在制备增效多黏菌素抗细菌感染效力的药物中的用途,以及松萝酸和多黏菌素的组合物在制备抗细菌感染效力增强的药物中的用途。本发明不仅通过棋盘法最小抑菌浓度试验、体外细菌生长曲线证明松萝酸协同增效多黏菌素的抗菌活性,同时利用小鼠创伤感染模型证实了松萝酸可以有效增强多黏菌素在体内的有效性。本发明发现松萝酸可显著增效多黏菌素的抗菌活性作用,可以为临床治疗细菌感染的疾病提供了新的治疗策略。

1. 松萝酸或其药学上可接受的盐在制备增强多黏菌素类抗菌药物抗细菌感染效力的抗菌增效剂中的应用。

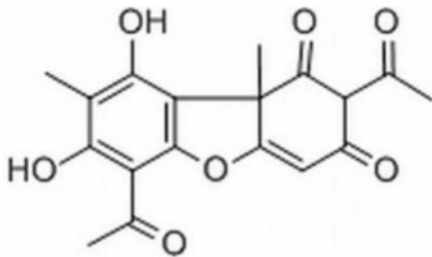
2. 松萝酸或其药学上可接受的盐在制备抗细菌感染性疾病的药物中的应用。

3. 一种抗菌组合物,包括松萝酸或其药学上可接受的盐和多黏菌素类抗菌药物。

4. 根据权利要求3所述的抗菌组合物,其特征在于:所述松萝酸或其药学上可接受的盐与多黏菌素类抗菌药物的质量比为(20~320):1,优选为(20~80):1。

5. 根据权利要求4所述的抗菌组合物,其特征在于:所述抗菌组合物用于治疗细菌性皮肤感染。

6. 根据权利要求1或2所述的应用或权利要求3-5任一项所述的抗菌组合物,其特征在于:所述松萝酸的结构式如式I所示:



式 I

所述多黏菌素类抗菌药物选自下述至少一种:1)多黏菌素E或其药学上可接受的盐;2)多黏菌素B或其药学上可接受的盐。

7. 根据权利要求1或2所述的应用或权利要求3或4所述的抗菌组合物,其特征在于:所述细菌为革兰氏阴性细菌;

进一步的,所述细菌为存在多黏菌素耐药基因的细菌;

进一步地,所述革兰氏阴性细菌为多重耐药革兰氏阴性细菌。

8. 根据权利要求7所述的应用或抗菌组合物,其特征在于:所述细菌为大肠杆菌、肺炎克雷伯、沙门氏菌、志贺杆菌、鲍曼不动杆菌中的一种或多种;优选地,所述大肠杆菌、肺炎克雷伯、沙门氏菌、志贺杆菌、鲍曼不动杆菌中的一种或多种存在多黏菌素耐药基因或多重耐药基因。

9. 一种抗菌产品,含有权利要求3-8中任一项所述的抗菌组合物。

10. 根据权利要求9所述的抗菌产品,其特征在于:所述产品为药物制剂,所述药物制剂的剂型选自下述任意一种:片剂、乳膏、胶囊、缓释片、控释片、口服液、糖浆、滴丸、注射液剂型、冻干粉针剂型。

松萝酸协同增效多黏菌素在抗革兰氏阴性细菌感染中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及松萝酸协同增效多黏菌素在抗革兰氏阴性细菌感染中的应用。

背景技术

[0002] 细菌耐药性问题已经成为一个全球性公共卫生问题,遏制细菌耐药性已经迫在眉睫。特别是近年来人类医学和动物临床由于耐碳青霉烯类革兰氏阴性菌的快速传播,导致临床可用的抗生素越来越少。尤其是一些多重耐药革兰氏阴性菌的出现,导致临床近乎无药可用,并造成一系列的公共卫生安全问题。近年来,国家各部门都对畜禽养殖业的健康可持续发展相当关注,我国近期出台了《遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)》、《全国遏制动物源细菌耐药行动计划(2017-2020年)》等一系列的政策和“行动计划”来遏制细菌耐药性的发展。

[0003] 多黏菌素(又称多粘菌素, polymyxin)类抗菌药物包含多黏菌素A、B、C、D、E等五种。其中,多黏菌素B和E应用于临床,对革兰氏阴性细菌作用较强,如大肠杆菌、肺炎杆菌、绿脓杆菌等。其中,多黏菌素E,又称为黏菌素, CAS号:1066-17-7,商品名抗敌素、可立斯丁、粘菌素。临床应用主要是硫酸盐或甲磺酸盐形式,即硫酸多黏菌素E和甲磺酸盐多黏菌素E。目前,多黏菌素E被认为是临床治疗耐碳青霉烯类大肠杆菌、多重耐药铜绿假单胞菌及多重耐药肺炎克雷伯等感染的最重要的抗菌药物之一。

[0004] 多黏菌素临床应用时,往往导致多重毒性副作用,包括肾毒性、神经毒性、肺毒性、皮肤毒性等,严重限制其应用。降低多黏菌素使用剂量可以显著降低其毒副作用,但显著降低其在机体内的杀菌效果,降低临床输出,同时也可能增加其耐药性的产生。此外,由于近年来大肠杆菌等致病菌携带多黏菌素耐药基因(MCR)质粒的出现和传播,导致部分革兰氏阴性菌对多黏菌素产生耐药。这些因素严重限制了多黏菌素在临床上的应用。因此,开发有效的多黏菌素增效剂,开发多黏菌素复方制剂,已经成为临床治疗多重耐药革兰氏阴性细菌感染的重要策略。

[0005] 松萝酸, CAS号为125-46-2,分子式 $C_{18}H_{16}O_7$,分子量为344.32,结构见附图1。松萝酸,又名地衣酸,可从地衣,可从天然松萝中分离得到。已有研究报道,松萝酸对金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌具有很好的抗菌活性(文献:Gupta VK, Verma S, Gupta S, Singh A, Pal A, Srivastava SK, Srivastava PK, Singh SC, Darokar MP. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec; 31(12):3375-83.)。此外,松萝酸对猪流行性腹泻病毒(PEDV)具有一定的抑制作用(文献:詹晶. 松萝酸对PEDV复制的影响及PEDV的细胞培养遗传稳定性分析[D]. 南京农业大学, 2020)。松萝酸还具有促进伤口愈合的功能(文献:王晓妮, 关立锋, 罗启云. 松萝酸通过PI3K/Akt通路对大鼠皮肤创面愈合及瘢痕增生的作用[J]. 中国皮肤性病杂志, 2021, 35(10):1111-1118+1131.)。松萝酸及其类似物还具有抗炎、抗氧化、抗癌、提高机体免疫力等生物学功能(文献:沙娜·吾肯, 焦顺刚, 杨鑫瑶, 高小力, 曲昌

海,张倩,刘春生,屠鹏飞,柴兴云.松萝酸及其类似物的化学成分和药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(19):3811-3821。)。迄今为止,松萝酸作为抗菌佐剂增效抗菌药物的抗菌活性尚未见报道。

发明内容

[0006] 为了解决多重耐药革兰氏阴性细菌治疗难的技术问题,本发明提供一种增强多黏菌素抗菌活性的方法,具体采用松萝酸联用多黏菌素(优选多黏菌素E),二者不仅是简单的功能相加,而是达到协同增效抗菌的作用。本发明还公开了松萝酸和多黏菌素E的抗菌组合配比,为临床治疗细菌感染,特别是多重耐药革兰氏阴性细菌感染,具体如存在多黏菌素耐药基因(MCR)的细菌感染提供了新的治疗策略。

[0007] 本发明的第一方面提供了松萝酸或其药学上可接受的盐在制备增强多黏菌素类抗菌药物抗细菌感染效力的抗菌增效剂中的用途。

[0008] 本发明的第二方面提供了松萝酸或其药学上可接受的盐在制备抗细菌感染性疾病的药物中的用途。

[0009] 本发明的第三方面提供了一种抗菌组合物。

[0010] 所述抗菌组合物,包括松萝酸或其药学上可接受的盐和多黏菌素类抗菌药物。

[0011] 进一步地,所述松萝酸或其药学上可接受的盐与多黏菌素类抗菌药物的质量比为(20~320):1,优选为(20~80):1,具体如20:1、40:1、80:1或320:1。

[0012] 所述抗菌组合物可以用于治疗细菌性皮肤感染。

[0013] 本发明的第四方面提供了一种抗菌产品。

[0014] 所述抗菌产品,含有上述的抗菌组合物以及药学上可接受的载体。

[0015] 所述抗菌产品的剂型可选自下述任意一种:片剂、乳膏、胶囊、缓释片、控释片、口服液、糖浆、滴丸、注射液剂型、冻干粉针剂型。

[0016] 所述药学上可接受的载体包括但不限于水溶性载体材料(如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、有机酸等)、难溶性载体材料(如乙基纤维素、胆固醇硬脂酸酯等)、肠溶性载体材料(如醋酸纤维素酞酸酯和羧甲乙纤维素等)。使用这些材料可以将上述抗菌产品制成多种剂型,包括但不限于片剂、胶囊、乳膏、糖浆、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、脂质体、透皮剂、口含片、栓剂、冻干粉针剂等。可以是普通制剂、缓释制剂、控释制剂及各种微粒给药系统。

[0017] 利用本发明提供的组合物在预防和/或治疗细菌感染时,给予受试者生物体有效量的抗菌组合物。

[0018] 本发明抗菌组合物的使用剂量和使用方法取决于诸多因素,包括患者的年龄、体重、性别、自然健康状况、营养状况、化合物的活性强度、服用时间、代谢速率、病症的严重程度以及诊治医生的主观判断。

[0019] 作为优选的,多黏菌素E和所述松萝酸的最终治疗剂量分别为0.5mg/kg和20mg/kg体重。

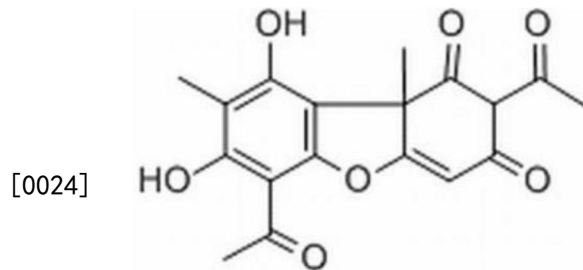
[0020] 本发明中,术语“有效量”是指可在受试者中实现治疗、预防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的剂量。

[0021] 本发明中,术语“受试者”可以指患者或者其它接受本发明抗菌组合物以治疗、预

防、减轻和/或缓解本发明所述疾病或病症的动物,特别是哺乳动物,例如人、狗、猴、牛、马等。

[0022] 本发明中,上述松萝酸药上可接受的盐具体可为松萝酸钠盐。

[0023] 本发明中,上述松萝酸的结构式如式I所示:



式 I

[0025] 本发明中,上述多黏菌素类抗菌药物选自下述至少一种:1)黏菌素(即多黏菌素E)或其药上可接受的盐(如硫酸多黏菌素E);2)多黏菌素B或其药上可接受的盐(如硫酸多黏菌素B)。

[0026] 本发明中,上述细菌为存在多黏菌素耐药基因的细菌。

[0027] 进一步地,所述细菌为革兰氏阴性细菌。

[0028] 进一步地,所述革兰氏阴性细菌为多重耐药革兰氏阴性细菌。

[0029] 进一步地,所述细菌为大肠杆菌、肺炎克雷伯、沙门氏菌、志贺杆菌、鲍曼不动杆菌中的一种或多种;优选地,所述大肠杆菌、肺炎克雷伯、沙门氏菌、志贺杆菌、鲍曼不动杆菌中的一种或多种存在多黏菌素耐药基因或多重耐药基因。

[0030] 进一步的,所述多黏菌素耐药基因包括多黏菌素耐药基因MCR-1。

[0031] 进一步地,所述细菌为肺炎克雷伯菌;优选地,所述肺炎克雷伯菌为存在多黏菌素耐药基因的或多重耐药的肺炎克雷伯菌。

[0032] 目前,虽然现有技术已经公开了多黏菌素联用其他抗菌药物,但大多数成药性很差,本发明不仅提供了松萝酸和多黏菌素联用的体外协同增效实验,还进一步提供动物水平实验证实其较好的协同杀菌效果。至今尚无研究报道关于松萝酸作为多黏菌素增效剂,在增强多黏菌素抗菌活性中的应用。

[0033] 本发明提供的松萝酸的新用途,用于增强多黏菌素抗菌活性的方法具有以下优异的技术效果:

[0034] (1) 本发明通过棋盘法最小抑菌浓度试验、体外杀菌曲线证明松萝酸协同增效多黏菌素的抗菌活性。

[0035] (2) 区别于已有的多黏菌素与抗生素联用,本发明给出了小鼠耐药细菌感染模型实验,在动物水平证实了松萝酸可以有效增强多黏菌素以及在体内的有效性,对下一步临床应用更有证明力。

[0036] (3) 本发明阐明了松萝酸可以恢复耐多黏菌素细菌的敏感性,并进一步评价了两者联合使用在体内外的有效性,有助于开发出一类新型的抗生素增效剂,缓解危害日趋严重的细菌耐药性问题。

[0037] (4) 本发明提供了松萝酸在增效多黏菌素类抗生素抗菌活性中的新用途,可解决

多黏菌素临床耐药性和治疗指数低等技术问题。

附图说明

- [0038] 图1为松萝酸联合多黏菌素E对大肠杆菌E.coli B2的时间杀菌曲线；
[0039] 图2为松萝酸联合多黏菌素E对大肠杆菌ATCC25922的时间杀菌曲线；
[0040] 图3为松萝酸联合多黏菌素E对大肠杆菌E.coli GZP080-8的时间杀菌曲线；
[0041] 图4为多黏菌素E、松萝酸单独及联合使用对小鼠皮肤伤口感染大肠杆菌E.coli B2的治疗效果评价。

具体实施方式

[0042] 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。

[0043] 下述实施例中使用的松萝酸,CAS号为125-46-2,分子式 $C_{18}H_{16}O_7$,分子量为344.32,购买于阿拉丁试剂公司,货号U275043,纯度>98%。硫酸黏菌素购买自阿拉丁试剂公司,货号C114323,活性>19000U/mg。硫酸多黏菌素B购自阿拉丁试剂公司,效价大于等于6000U/mg。称取一定量的硫酸黏菌素或硫酸多黏菌素B配置成母液浓度为16mg/mL。松萝酸使用DMSO配置成母液浓度40mg/mL浓度的母液。制备好后储存在-20度冰箱。

[0044] 下述实施例中所用的病原菌:

[0045] 大肠杆菌标准菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922(以下简称E.coli25922)购自中国兽医监察所菌种保存中心(中国兽医微生物菌种保藏管理中心);

[0046] 大肠杆菌B2(E.coli B2)携带黏菌素耐药基因1(MCR-1)质粒和新德里金属-β-内酰胺酶5(NDM-5)质粒,具体信息已在下列文献中记载:Song M,Liu Y,Huang X,Ding S,Wang Y,Shen J,Zhu K.Abroad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens.Nat Microbiol.2020Aug;5(8):1040-1050.

[0047] 肺炎克雷伯菌K.pneumoniae 1202(ST11,KPC-2-producer)+pHNSHP45(mcr-1),具体信息已在下列文献中记载:Liu YY,Wang Y,Walsh TR,Yi LX,Zhang R,Spencer J,Doi Y,Tian G,Dong B,Huang X,Yu LF,Gu D,Ren H,Chen X,Lv L,He D,Zhou H,Liang Z,Liu JH,Shen J.Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China:a microbiological and molecular biological study.Lancet Infect Dis.2016Feb;16(2):161-8.该菌株携因带MCR-1质粒,耐多黏菌素。

[0048] 铜绿假单胞菌标准菌株ATCC15692(即铜绿假单胞菌PA01)购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0049] 沙门氏菌SH16SF0764(*Salmonella* SH16SF0764),分离自临床,携带MCR-1质粒,由中国农业大学国家兽药安全评价中心保存和提供。

[0050] 鲍曼不动杆菌标准菌株ATCC 19606购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0051] 大肠杆菌E.coli 09b19、E.coli 13h1、E.coli GZP080-8记载于下列文献:Lu Yang,Yingbo Shen,Junyao Jiang,Xueyang Wang,Dongyan Shao,Margaret M.C.Lam,Kathryn E.Holt,Bing Shao,Congming Wu,Jianzhong Shen,Timothy R.Walsh,Stefan Schwarz,Yang Wang&Zhangqi Shen,Distinct increase in antimicrobial resistance

genes among *Escherichia coli* during 50years of antimicrobial use in livestock production in China, *Nature Food*, 2022, 3:197-205; 均携带MCR-1质粒, 耐多黏菌素。

[0052] 金黄色葡萄球菌ATCC29213购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0053] 金黄色葡萄球菌ATCC33591购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0054] 下述试验中使用细菌培养基:

[0055] MHB肉汤培养基购自北京陆桥技术股份有限公司, 配制方法如下: 称取25.0g于1L蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 121℃高压灭菌15min, 备用。

[0056] MHA培养基购自北京陆桥技术股份有限公司, 配制方法如下: 称取38.0g于1L蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 121℃高压灭菌15min, 冷至55℃倾注平板备用。

[0057] 脑心浸液培养基(BHI) 购自北京陆桥技术股份有限公司, 配制方法如下: 称取本品38.5g, 加热搅拌溶解于1000mL蒸馏水中, 调节pH至7.3, 121℃高压灭菌15分钟, 备用。

[0058] BHI固体培养基购自北京路桥技术股份有限公司, 配制方法如下: 称取本品50.0g于1000mL蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 121℃高压灭菌20min, 冷却至55℃倾注平板备用。

[0059] 实施例1、松萝酸和多黏菌素联合用药的协同抗菌活性评价

[0060] (1) 松萝酸、多黏菌素B和多黏菌素E单独用药的抗菌活性最低抑菌浓度(MIC)的测定

[0061] 按照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的标准方法检测不同菌株对松萝酸、多黏菌素B和多黏菌素E的最小抑菌浓度(MIC)。具体操作如下: 挑取细菌单菌落于BHI肉汤中, 在37℃摇床培养细菌至对数生长期, 用麦氏比浊仪调节菌液浓度至0.5麦氏浊度待用。用MHB培养基分别将松萝酸、多黏菌素B和多黏菌素E倍比稀释多个浓度梯度。取100μL菌液(每孔菌液终浓度为 1.0×10^6 CFUs/mL)加入96孔U型板中, 随后每孔加入不同药物。松萝酸药物终浓度依次为160μg/mL、80μg/mL、40μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL; 多黏菌素B和多黏菌素E的最终药物浓度均设置为16μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL、0.25μg/mL、0.125μg/mL、0.0625μg/mL。阴性对照组为只含有MHB培养基; 阳性对照组为含有100μL的待测菌液, 同时每孔加入1μL DMSO。加药后培养板放置37℃培养箱中恒温培养18h后观察结果, 96孔板中, 肉眼澄清的孔的所含药物浓度即为最低抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)。试验结果见表1。

[0062] 表1松萝酸、多黏菌素E、多黏菌素B对各菌的MIC值(μg/mL)

菌株	松萝酸	多黏菌素E	多黏菌素
E.coli 25922	>160 μg/mL	0.25μg/mL	0.25μg/mL
E.coli B2	>160 μg/mL	8μg/mL	8μg/mL
ATCC15692	>160 μg/mL	1 μg/mL	1 μg/mL

[0064]	K. pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1)	>160 μg/mL	8 μg/mL	8 μg/mL
	E.coli 09b19	>160 μg/mL	4μg/mL	4μg/mL
	E.coli 13h1	>160 μg/mL	8μg/mL	4μg/mL
	E.coli GZP080-8	>160 μg/mL	8 μg/mL	4μg/mL
	ATCC29213	20μg/mL	>16μg/mL	>16μg/mL
	ATCC33591	20μg/mL	>16μg/mL	>16μg/mL
	ATCC 19606	>160 μg/mL	0.5μg/mL	0.5μg/mL
	Salmonella SH16SF0764	>160 μg/mL	8 μg/mL	8 μg/mL

[0065] 由表1可知,松萝酸对所测试菌株E.coli 25922、E.coli B2、ATCC15692、K.pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1)、E.coli 09b19、E.coli13h1、E.coli GZP080-8、ATCC 19606、Salmonella SH16SF0764等革兰氏阴性菌的抗菌活性均大于所测最大浓度,即>160μg/mL;多黏菌素E对上述革兰氏阴性菌的MIC分别为0.25μg/mL、8μg/mL、1μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、8μg/mL、0.5μg/mL、8μg/mL;多黏菌素B对上述革兰氏阴性菌的MIC分别为0.25μg/mL、8μg/mL、1μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、4μg/mL、4μg/mL、0.5μg/mL、8μg/mL。松萝酸对革兰氏阳性菌ATCC29213、ATCC33591的MIC均为20μg/mL。

[0066] 多黏菌素B和多黏菌素E对革兰氏阳性菌ATCC29213、ATCC33591的MIC均大于所测试最大浓度,即>16μg/mL。

[0067] 2、松萝酸和抗菌药物多黏菌素联合应用抑菌活性实验

[0068] 松萝酸和抗菌药物多黏菌素联合应用对病原菌的联合用药指数(FICI)测定:使用棋盘法测定松萝酸与抗菌药物联合应用对E.coli 25922、E.coli B2、ATCC15692、K.pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1)、E.coli 09b19、E.coli13h1、E.coli GZP080-8、ATCC 19606、Salmonella SH16SF0764等菌株的FICI值。具体操作如下:

[0069] 抗菌药物多黏菌素E(作为甲药)和松萝酸(作为乙药)分别以各自的2MIC为最高浓度,以MHB肉汤培养基倍比稀释成8-11个浓度,分别沿96微孔培养板横轴、纵轴加入含有不同浓度两药的MHB肉汤培养基50μL,然后分别加入各种病原菌菌液50μL,使最终病原菌含量为 1×10^6 CFU/孔,37℃恒温培养18~24h,观察结果。记录两药分别单用和联用时各自的MIC,按下述公式计算FICI值(部分抑菌浓度指数)。

[0070] $FICI = MIC_{\text{甲药联合}} / MIC_{\text{甲药单用}} + MIC_{\text{乙药联合}} / MIC_{\text{乙药单用}}$

[0071] 判断标准: $FICI \leq 0.5$,协同作用; $0.5 < FICI \leq 1$,相加作用; $1 < FICI \leq 2$,无关作用; $FICI > 2$,拮抗作用。即:松萝酸和多黏菌素E的 $FICI = MIC(\text{多黏菌素E联合}) / MIC(\text{多黏菌素E单用}) + MIC(\text{松萝酸联合}) / MIC(\text{松萝酸单用})$ 。

[0072] 表2松萝酸与抗菌药物联合应用对大肠杆菌标准菌株E.coli 25922、E.coli B2、ATCC15692、K.pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1)、E.coli

09b19、E.coli 13h1、E.coli GZP08-8、ATCC 19606、Salmonella SH16SF0764等菌株的FICI值

[0073]

菌株	联合应用方案	药物	MIC 单用 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC 联合 ($\mu\text{g/mL}$)	FICI
ATCC25922	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	5	0.28
		多黏菌素 E	0.25	0.0625	
K. pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1)	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.25
		多黏菌素 E	8	1	
ATCC15692	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	40	0.75
		多黏菌素 E	1	0.5	
E.coli B2	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	40	0.375
		多黏菌素 E	8	1	
E.coli 09b19	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.375
		多黏菌素 E	4	1	
E.coli 13h1	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.25
		多黏菌素 E	8	1	
E.coli GZP08-8	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.25
		多黏菌素 E	8	1	
ATCC 19606	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.25
		多黏菌素 E	0.5	0.0625	
Salmonella SH16SF0764	松萝酸+多黏菌素 E	松萝酸	大于 160	20	0.25
		多黏菌素 E	8	1	

[0074] 针对本试验中所有检测的细菌,结果如下:

[0075] 体外MIC测定结果显示,松萝酸单独用药对上述革兰氏阴性菌的MIC均大于最大测试浓度,即 $>160\mu\text{g/mL}$ 。松萝酸与多黏菌素E联用能够提高多黏菌素的抗菌活性:

[0076] 针对大肠杆菌标准菌株ATCC25922,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为 $5\mu\text{g/mL}$,多黏菌素E浓度为 $0.0625\mu\text{g/mL}$,二者发挥最大协同作用,FICI为0.28,判定为协同作用。

[0077] 针对临床大肠杆菌E.coli B2菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为 $40\mu\text{g/mL}$,多黏菌素E浓度为 $1\mu\text{g/mL}$,二者发挥最大协同作用,FICI为0.375,判定为协同作用。

[0078] 针对ATCC15692菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为 $40\mu\text{g/mL}$,多黏菌素E浓度为 $0.5\mu\text{g/mL}$,二者发挥最大协同作用,FICI为0.75,判定为相加作用。

[0079] 针对K.pneumoniae 1202 (ST11, KPC-2-producer) +pHNSHP45 (mcr-1) 菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为 $20\mu\text{g/mL}$,多黏菌素E浓度为 $1\mu\text{g/mL}$,二者发挥最大协同作用,FICI为0.25,判定为协同作用。

[0080] 针对临床大肠杆菌E.coli 09b19菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸

浓度为20 μ g/mL,多黏菌素E浓度为1 μ g/mL,二者发挥最大协同作用,FICI为0.375,判定为协同作用。

[0081] 针对临床大肠杆菌E.coli 13h1菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为20 μ g/mL,多黏菌素E浓度为1 μ g/mL,二者发挥最大协同作用,FICI为0.25,判定为协同作用。

[0082] 针对临床大肠杆菌E.coli GZP11-15菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为20 μ g/mL,多黏菌素E浓度为1 μ g/mL,二者发挥最大协同作用,FICI为0.25,判定为协同作用。

[0083] 针对ATCC 19606菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为20 μ g/mL,多黏菌素E浓度为0.0625 μ g/mL,二者发挥最大协同作用,FICI为0.25,判定为协同作用。

[0084] 针对临床Salmonella SH16SF0764菌株,多黏菌素E和松萝酸联合应用时,在松萝酸浓度为20 μ g/mL,多黏菌素E浓度为1 μ g/mL,二者发挥最大协同作用,FICI为0.25,判定为协同作用。

[0085] 综上所述,松萝酸在5-40 μ g/mL添加时,可显著增效多黏菌素抗革兰氏阴性菌的抗菌活性。

[0086] 实施例2、多黏菌素联合松萝酸联合使用的协同杀菌曲线

[0087] 1、试验材料

[0088] 松萝酸和硫酸黏菌素同实施例1。

[0089] 2、体外杀菌曲线试验

[0090] 分别将Ecoli B2、ATCC25922和E.coli GZP080-8于BHI肉汤中培养6小时后加入等体积的DMSO(终浓度为0.1%)、硫酸多黏菌素E、松萝酸、硫酸多黏菌素E和松萝酸混合液。

[0091] (1) 针对Ecoli B2菌株,分组和剂量如下:

[0092] 对照组:0.1%的DMSO;

[0093] 多黏菌素E组:硫酸多黏菌素E 4 μ g/mL;

[0094] 松萝酸组:松萝酸80 μ g/mL;

[0095] 松萝酸和多黏菌素E联合组:松萝酸80 μ g/mL,硫酸多黏菌素E 4 μ g/mL。

[0096] 然后分别于1h、3h、6h、12h和24h取100 μ L菌液涂布于直径为10cm的MHA琼脂培养板上,培养过夜后进行菌落计数。

[0097] (2) 针对大肠杆菌ATCC25922菌,分组和剂量如下:

[0098] 对照组:0.1%的DMSO;

[0099] 多黏菌素E组:硫酸多黏菌素E 0.25 μ g/mL;

[0100] 松萝酸组:松萝酸20 μ g/mL;

[0101] 松萝酸和多黏菌素E联合组:松萝酸20 μ g/mL,硫酸多黏菌素E 0.25 μ g/mL。

[0102] 然后分别于1h、3h、6h、12h和24h取100 μ L菌液涂布于直径为10cm的MHA琼脂培养板上,培养过夜后进行菌落计数。

[0103] (3) 针对大肠杆菌E.coli GZP080-8菌株,分组和剂量如下:

[0104] 对照组:0.1%的DMSO;

[0105] 多黏菌素E组:硫酸多黏菌素E 4 μ g/mL;

[0106] 松萝酸组:松萝酸80 μ g/mL;

[0107] 松萝酸和多黏菌素E联合组:松萝酸80 μ g/mL,硫酸多黏菌素E 4 μ g/mL。

[0108] 然后分别于1h、3h、6h、12h和24h取100 μ L菌液涂布于直径为10cm的MHA琼脂培养板上,培养过夜后进行菌落计数。

[0109] 结果如下:

[0110] 如图1所示,针对E.coli B2菌株,与对照组相比,在第24h,多黏菌素E和松萝酸单独处理对细菌菌落数没有显著影响。当松萝酸和多黏菌素E联合处理时,在处理第3h时,菌落数为2.97Log₁₀ CFU/mL;在第6h时,菌落数为0Log₁₀ CFU/mL,直至第24h,菌落数均为0Log₁₀ CFU/mL。

[0111] 如图2所示,针对ATCC25922菌株,与对照组相比,在第24h,多黏菌素E处理组,菌落数降低至5.2Log₁₀CFU/mL,松萝酸对细菌菌落数没有显著影响。当松萝酸和多黏菌素E联合处理时,在第1h、3h、6h、12h、24h时,菌落数降低至3.8Log₁₀CFU/mL、3.4Log₁₀CFU/mL、3.0Log₁₀CFU/mL、0Log₁₀CFU/mL、0Log₁₀CFU/mL。

[0112] 如图3所示,针对E.coli GZP080-8菌株,与对照组相比,在第24h,多黏菌素E处理组和松萝酸单独处理组,菌落数没有明显变化。当松萝酸和多黏菌素E联合处理时,在第1h、3h、6h、12h、24h时,菌落数降低至4.7Log₁₀CFU/mL、4.6Log₁₀CFU/mL、3.9Log₁₀CFU/mL、0Log₁₀CFU/mL、0Log₁₀CFU/mL。

[0113] 实施例3、多黏菌素E联合松萝酸对小鼠创伤感染细菌清除率的治疗效果

[0114] 雌性BALB/c小鼠,体重18~20g,购买自北京维通利华有限公司。小鼠饲养于中国农业大学动物医学院国家兽药安全中心实验动物房,室温(25 \pm 2 $^{\circ}$ C,相对湿度50 \pm 10%),采用常规光照,昼:夜=12h:12h,饲喂常规小鼠维持颗粒饲料。正式试验前小鼠在动物房适应性饲养1周。所有动物实验全部经过中国农业大学动物伦理道德委员会批准。

[0115] 小鼠在实验室适应性饲养1周后,所有小鼠建立皮肤创伤模型,主要步骤如下:用电动脱毛器除去背部毛发,腹腔注射4%水合氯醛麻醉小鼠,每只按照10mg/kg给药。用酒精给背部脱毛部位消毒,记号笔预先做圆形记号,高压灭菌眼科剪剪开背部皮肤,做出直径为1cm的圆形伤口,并将皮肤剪下。随后,小鼠感染接种E.coli B2,用微量移液枪在伤口上滴加10 μ L(1 \times 10⁹CFU/mL)的E.coli B2菌液,每只小鼠的感染的细菌量为1 \times 10⁷CFU,对照组于创伤表面滴加PBS,等待皮肤将滴加的液体吸收,并观察小鼠状态至苏醒。将感染E.coli B2的小鼠再继续分为4组,分别为溶剂治疗对照组、多黏菌素E治疗组、松萝酸治疗组、多黏菌素E联合松萝酸治疗组,每组6只小鼠。分别在大肠杆菌感染第1h和24h,分别在皮肤感染处直接滴加10 μ L的生理盐水、10 μ L多黏菌素E(1mg/mL,相当于每只小鼠给予多黏菌素E的剂量为0.5mg/kg体重)、10 μ L松萝酸(40mg/mL,相当于每只小鼠给予松萝酸的剂量为20mg/kg体重)、10 μ L多黏菌素E(1mg/mL)+松萝酸(40mg/mL)(相当于每只小鼠同时给予多黏菌素E的剂量为0.5mg/kg体重和松萝酸的剂量为20mg/kg体重)的混合液。在感染后第48h后,麻醉处死小鼠,用高压灭菌手术器械将创口及周围皮肤组织剪下,并剥离皮下粘连组织。将皮肤组织到2mL研磨离心管中,加入500 μ L PBS、研磨珠,于高温低速组织研磨仪中研磨,选取皮肤组织研磨程序,4 $^{\circ}$ C条件下充分研磨。将组织匀浆稀释至合适的倍数(500倍):取20 μ L原液于2mL离心管中,加入1.98mL无菌PBS倍比稀释。取100 μ L稀释后的菌液,滴加于含有多黏菌素E(终浓度为2 μ g/mL,主要目的是防治操作过程中的其它杂菌污染)的BHI固体培养基上,使用涂布器将菌液涂布均匀,于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养14~16h,观察菌落生长情况,并计数。

[0116] 结果如下:如图4所示,溶剂治疗对照组皮肤伤口载菌量平均值为 $7.1\text{Log}_{10}\text{CFU}$,多黏菌素E和松萝酸治疗组的载菌量平均值分别为 $6.5\text{Log}_{10}\text{CFU}$ 和 $4.5\text{Log}_{10}\text{CFU}$,多黏菌素E和松萝酸联合治疗组菌落数平均值降低到 $0.87\text{Log}_{10}\text{CFU}$ 。这表明,多黏菌素E和松萝酸联合治疗较黏菌素E或松萝酸单独治疗,显著提高了对皮肤伤口的细菌清除率。

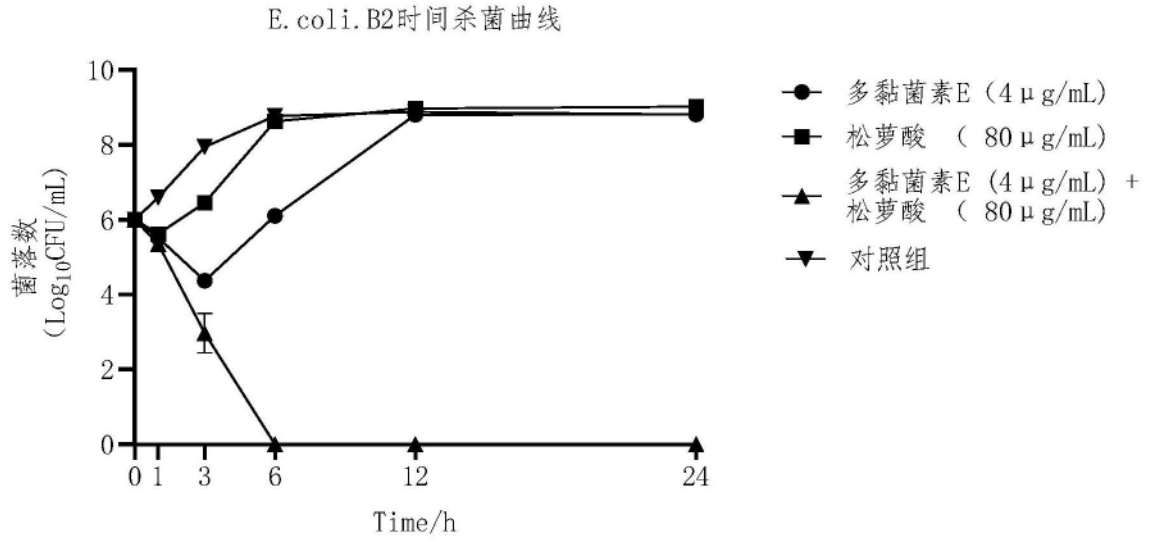


图1

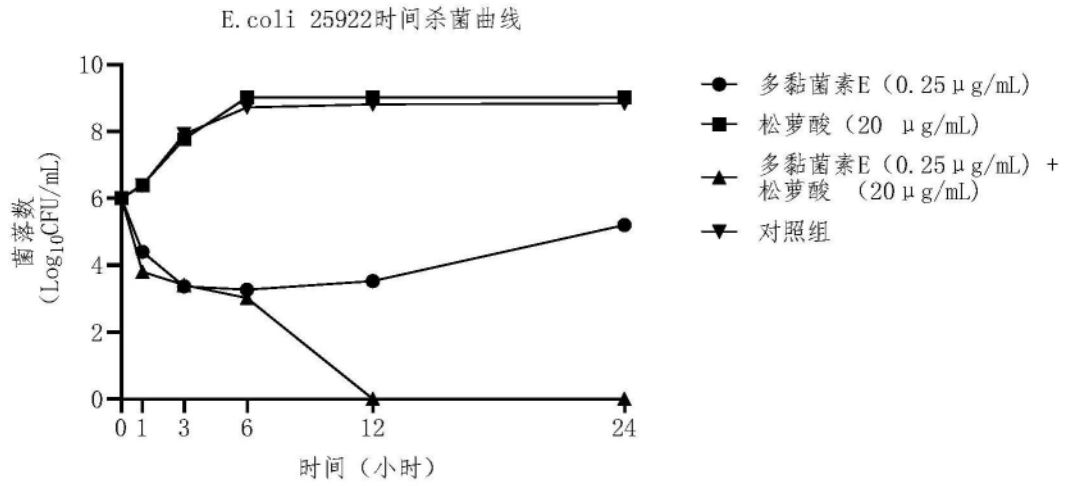


图2

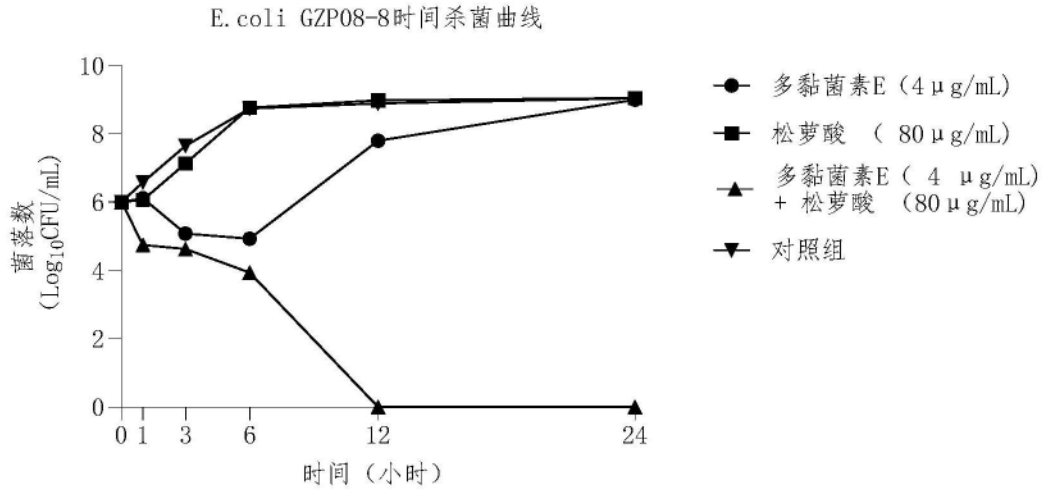


图3

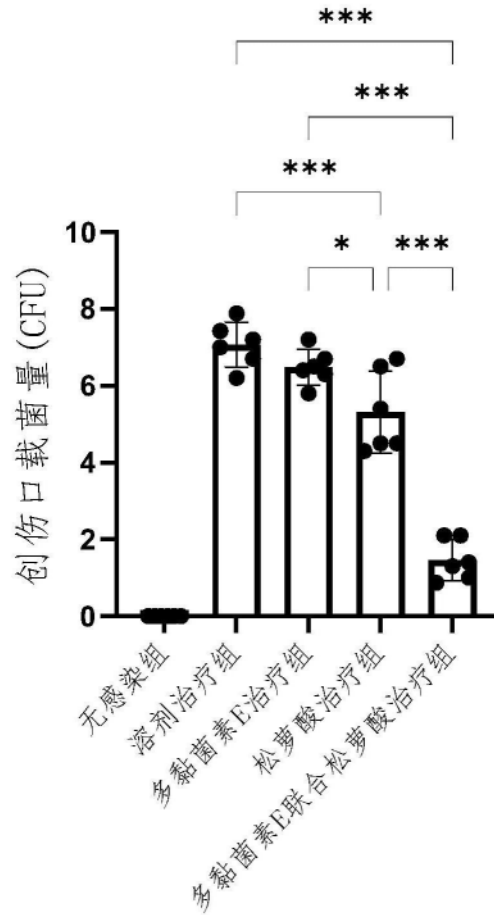


图4