

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2019 年 9 月 26 日 (26.09.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/178954 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/194 (2006.01) A61K 31/43 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/090752

(22) 国际申请日: 2018 年 6 月 12 日 (12.06.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201810231615.3 2018年3月20日 (20.03.2018) CN

(71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(72) 发明人: 李惠 (LI, Hui); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 彭博 (PENG, Bo); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。 彭宣宪

(PENG, Xuanxian); 中国广东省广州市海珠区新港西路135号, Guangdong 510275 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路191号中石化大厦B塔4416室, Guangdong 510620 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: APPLICATION OF SUCCINIC ACID IN IMPROVING SENSITIVITY OF BACTERIA ON ANTIBIOTIC

(54) 发明名称: 琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用

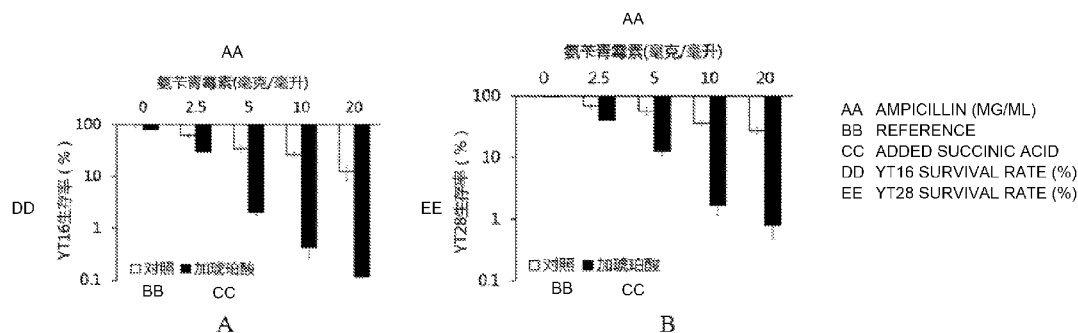


图1

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of pharmacy. Disclosed is an application of succinic acid in improving the sensitivity of bacteria on an antibiotic. The present invention discovers that a proton motive force of bacteria is increased by the succinic acid so as to increase the number of antibiotics entering the bacteria and finally kill the bacteria. Therefore, the succinic acid can improve the sensitivity of bacteria on the antibiotic so as to solve the problem of the bacterial drug resistance. A joint application of the succinic acid and the antibiotic can significantly improve the sterilization effect of the antibiotic, and has a better effect and higher security and operability compared with the existing single use of the antibiotic as an anti-bacterial drug.

(57) 摘要: 本发明属于医药技术领域, 具体公开了琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用。本发明发现琥珀酸通过提高细菌的质子动力势, 从而使进入细菌内部的抗生素数量增加, 最终使细菌死亡, 因此琥珀酸能够提高细菌对抗生素的敏感性, 从而克服细菌耐药性的问题。将琥珀酸与抗生素联用可以显著提高抗生素的杀菌作用, 与现有的只用抗生素作为抗细菌药物相比, 具有更好的效果以及更高的安全性和可操作性。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用

5 技术领域

本发明属于医药技术领域，具体地，涉及琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用。

背景技术

病原性细菌严重危害人类身体健康和养殖业的可持续性发展，需要采取有效措施进行防治。自从 1929 年弗莱明（Fleming）发现青霉素以来，各种抗生素的大量研究开启了人类的抗
10 生素时代，其在感染疾病的治疗中发挥着重大的作用，使得抗生素的使用日益广泛。虽然采用
抗生素可以有效防治疾病，但抗生素的滥用和误用会导致细菌产生耐药性。耐药菌株对原本有
效的抗生素产生耐受，导致感染难以控制。因此，采用新的方法控制细菌特别是耐药菌的感染
十分重要。

目前研究的热点是通过提高耐药菌对抗生素的敏感性，使得原本无效或低效的抗生素变得
15 有效，将耐药菌杀死。近年来，已发现一些小分子可以协同抗生素促进杀菌作用，将其与抗生
素一起制备成复方制剂，对控制细菌特别是耐药菌的感染具有重要意义。

琥珀酸是三羧酸循环中重要的四碳二羧酸中间产物，也是某些氨基酸的降解物。琥珀酸的
天然来源是松属植物的树脂久埋于地下而成的琥珀等，此外还广泛存在于多种植物、动物的组
织中。医药工业中可用它合成解毒剂、利尿剂、镇静剂、止血药、抗痉挛剂、松痰剂、磺胺药、
20 抗生素以及维生素 A、维生素 B 等。琥珀酸还可作为化学试剂，用作碱量法标准试剂、缓冲
剂、气相色谱对比样品。在食品工业中可用于调味剂、酸味剂、缓冲剂，用于火腿、香肠、水
产品、调味液等，还可用做防腐剂、pH 值调节剂和助溶剂。但是，关于琥珀酸能否提高细菌
对抗生素敏感性尚未见相关报道。

发明内容

25 本发明为了克服现有技术的上述不足，提供琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应
用，本发明发现琥珀酸能够提高细菌对抗生素的敏感性，从而克服细菌耐药性的问题。

本发明的另一目的在于提供一种抑菌或杀菌的药物。

本发明的另一目的在于提供一种提高细菌对抗生素敏感性的方法。

本发明的另一目的在于提供琥珀酸在制备清除生物膜细菌的制剂或药物中的应用。

30 为了实现上述目的，本发明是通过以下方案予以实现的：

本发明发现添加琥珀酸后，可以提高临床大肠埃希菌对氨苄青霉素的敏感性，该作用具有
抗生素浓度梯度、琥珀酸浓度梯度和时间效应。

本发明还发现添加琥珀酸后，可以提高临床大肠埃希菌对其它抗生素（如氨苄青霉素、羟
苄青霉素、青霉素 G、庆大霉素、环丙沙星、四环素、红霉素、克林霉素和利福平等）的敏感
5 性。

以上结果表明，可以通过抗生素与琥珀酸联用提高细菌对抗生素敏感性的方法来达到治疗
耐药菌的目的。

本发明发现添加琥珀酸后，氨苄青霉素对其它细菌或耐药菌（如大肠杆菌、溶藻弧菌、副
溶血弧菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞菌和乙型链球菌）的杀菌作用明显提高，结果表明，琥
10 珀酸可以增强其它细菌或耐药菌对氨苄青霉素的敏感性。

本发明发现琥珀酸通过提高细菌的质子动力势，从而使进入细菌内部的抗生素含量增加，
最终使细菌死亡。

本发明构建了体外临床大肠埃希菌生物膜，通过琥珀酸和氨苄青霉素联用的方法，证明能
有效清除生物膜细菌。进一步采用小鼠慢性尿道感染模型，于尿道中植入临床大肠埃希菌生物
15 膜，然后注射琥珀酸和氨苄青霉素。结果发现，添加琥珀酸和氨苄青霉素的实验组具有明显的
杀菌效果，能显著减少生物膜上的耐药菌，说明琥珀酸可提高临床大肠埃希菌生物膜对氨苄青
霉素的敏感性。以上结果表明，琥珀酸联合抗生素可以清除动物机体内的耐药菌。

综上所述，在抗生素中添加琥珀酸能明显提高细菌或耐药菌对抗生素的敏感性，从而达到
抑菌或杀菌的目的。因此，本发明请求保护琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用。

20 优选地，所述细菌为大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞菌或
乙型链球菌中的至少一种。

优选地，所述抗生素选自氨苄青霉素、羟苄青霉素、青霉素 G、庆大霉素、环丙沙星、四
环素、红霉素、克林霉素或利福平中的至少一种。

优选地，为琥珀酸在提高大肠杆菌对氨苄青霉素敏感性方面的应用。

25 优选地，为琥珀酸在提高大肠杆菌对羟苄青霉素、青霉素 G、庆大霉素、环丙沙星、四环
素、红霉素、克林霉素或利福平敏感性方面的应用。

优选地，为琥珀酸在提高溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞菌或乙型链
球菌对氨苄青霉素敏感性方面的应用。

本发明还请求保护一种抑菌或杀菌的药物，含有抗生素和琥珀酸。

30 本发明还请求保护一种提高细菌对抗生素敏感性的方法，将琥珀酸与抗生素联用。

在上述方法中，所述细菌为敏感菌或耐药菌。

优选地，所述细菌包括但不限于大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞菌和乙型链球菌。因为这些细菌是常见的人类和养殖动物致病菌，如大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华氏菌和铜绿假单胞菌均为革兰氏阴性菌，乙型链球菌为革兰氏阳性菌。这些细菌可以是耐药菌，也可以是敏感菌。

优选地，所述抗生素选自但不限于氨苄青霉素、羟苄青霉素、青霉素 G、庆大霉素、环丙沙星、四环素、红霉素、克林霉素和利福平。因为氨苄青霉素、羟苄青霉素、青霉素 G 为 β -内酰胺类抗生素；庆大霉素为氨基糖苷类抗生素；环丙沙星为喹诺酮类抗生素；四环素为四环素类抗生素；红霉素为大环内酯类抗生素；克林霉素为林可酰胺类抗生素；利福平为抗结核药类。这些包括了目前临床使用的主要抗生素类型。

优选地，所述的琥珀酸与抗生素的剂量比按重量计为 1: 0.0015~300。

优选地，应用上述方法来提高细菌对抗生素的敏感性时，琥珀酸的使用量为 3mg~30g/次给药。

本发明还请求保护琥珀酸在制备清除生物膜细菌的制剂或药物中的应用。

优选地，所述细菌为临床大肠埃希菌。

与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明首次发现琥珀酸能够提高细菌对抗生素的敏感性，从而克服细菌耐药性的问题，进一步研究发现琥珀酸通过提高细菌的质子动力势，从而使进入细菌内部的抗生素含量增加。将琥珀酸与抗生素联用可以显著提高抗生素的杀菌作用，与现有的只用抗生素作为抗菌药物相比，具有更好的效果以及更高的安全性和可操作性，具有较好的应用前景。

附图说明

图 1 为实施例 1 在不同浓度的氨苄青霉素中添加 20mM 琥珀酸后，临床大肠埃希菌的生存率；A 为临床大肠埃希菌 YT16，B 为临床大肠埃希菌 YT28。

图 2 为实施例 1 在 10mg/mL 氨苄青霉素中添加 20mM 琥珀酸后，不同时间下临床大肠埃希菌 YT16 和 YT28 的生存率。

图 3 为实施例 1 在 10mg/mL 氨苄青霉素中添加不同浓度琥珀酸后，临床大肠埃希菌 YT16 和 YT28 的生存率。

图 4 为实施例 1 在 10mg/mL 氨苄青霉素中添加 20mM 琥珀酸后，28 株临床大肠埃希菌的生存率和杀菌率增加的倍数；A 为生存率，B 为杀菌率增加的倍数。

图 5 为实施例 2 在不同青霉素类抗生素中添加 20mM 琥珀酸后，临床大肠埃希菌 YT16

和 YT28 的生存率；A 为羟苄青霉素，B 为羧苄青霉素，C 为青霉素 G 钠盐。

图 6 为实施例 2 在不同抗生素中添加 20mM 琥珀酸后，临床大肠埃希菌 YT16 的生存率；A 为庆大霉素，B 为环丙沙星，C 为四环素、红霉素、克林霉素和利福平。

图 7 为实施例 3 在氨苄青霉素中添加 20mM 琥珀酸后，不同细菌的生存率。

5 图 8 为实施例 4 琥珀酸联合氨苄青霉素对临床大肠埃希菌的治疗效果；A 为临床大肠埃希菌生物膜体外杀菌实验结果，B 为在小鼠体内尿道和肾脏中耐药菌的清除效果。

图 9 为实施例 5 在氨苄青霉素中添加琥珀酸后，细菌体内氨苄青霉素含量变化情况。

图 10 为实施例 6 添加琥珀酸后，细菌质子动力势变化情况。

具体实施方式

10 下面结合说明书附图及具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述，所述实施例只用于解释本发明，并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，为可从商业途径得到的试剂和材料。

实施例 1 琥珀酸提高临床大肠埃希菌对氨苄青霉素的敏感性

1、临床大肠埃希菌耐药性分析

15 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是临床中最常见的一种细菌，将从临床上获得的 30 株大肠埃希菌，命名为 YT1~30。根据 NCCLS 方法检测这 30 株临床获得的大肠埃希菌对 8 种抗生素的最小抑菌浓度 (MIC)，同时用大肠埃希菌 K12 作为对照。测定结果见表 1，从此结果看出，这 30 株菌 MIC 均比对照 *E.coli* K12 高 4 倍以上 (除 YT1 对头孢他啶的 MIC 与对照相同外)，即这 30 个临床大肠埃希菌均为多重耐药菌，特别是对氨苄青霉素的 MIC 是对
20 照的 64~4000 倍。

表1 30种大肠埃希临床菌对8种抗生素的最小抑菌浓度 (MIC)

	丁胺卡那霉素	氨苄青霉素	巴洛沙星	头孢他啶	盐酸克林霉素	庆大霉素	四环素	罗红霉素
对照	0.61	6.1	0.015	0.122	24.414	0.61	1.526	9.765
YT1	9.765	25000	0.244	0.122	390.625	2.441	6.1	39.0625
YT2	9.765	6250	3.906	0.488	390.625	156.25	24.414	625
YT3	9.765	390.625	15.625	0.488	390.625	156.25	97.656	625
YT4	9.765	6250	250	0.488	1562.5	9.765	390.625	156.25
YT5	9.765	25000	250	7.81	6250	625	390.625	625
YT6	9.765	1562.5	62.5	1.953	1562.5	156.25	97.656	625
YT7	9.765	1562.5	15.625	0.488	6250	625	97.656	625
YT8	9.765	1562.5	250	0.488	6250	625	97.656	625
YT9	2.441	1562.5	250	0.488	1562.5	156.25	97.656	625
YT10	39.0625	6250	15.625	7.812	6250	625	97.656	625
YT11	2500	1562.5	3.906	7.812	25000	2500	97.656	625

YT12	2500	6250	62.5	0.488	25000	2500	6250	625
YT13	2500	6250	62.5	0.488	25000	2500	6250	625
YT14	2500	6250	15.625	0.488	25000	2500	6250	2500
YT15	2500	6250	15.625	0.488	25000	2500	6250	2500
YT16	2500	6250	250	0.488	25000	2500	6250	625
YT17	2500	6250	250	0.488	25000	2500	6250	625
YT18	2.441	6250	62.5	0.488	390.625	2.441	1562.5	625
YT19	9.76	1562.5	62.5	0.488	390.625	625	1562.5	625
YT20	2.441	1562.5	62.5	0.122	390.625	156.25	1562.5	625
YT21	2500	1562.5	15.625	0.488	390.625	2500	1562.5	625
YT22	625	6250	62.5	0.488	390.625	2500	1562.5	625
YT23	9.765	1562.5	15.625	0.488	390.625	156.25	1562.5	625
YT24	9.765	6250	15.625	7.812	390.625	625	1562.5	625
YT25	2500	6250	0.244	31.25	390.625	2500	6.103	625
YT26	2500	6250	15.625	31.25	390.625	2500	97.656	625
YT27	9.765	6250	15.625	0.488	390.625	625	97.656	625
YT28	2500	1562.5	15.625	31.25	1562.5	2500	390.625	2500
YT29	9.765	6250	15.625	7.812	390.625	625	390.625	625
YT30	2.441	25000	15.625	7.812	390.625	39.0625	390.625	156.25

2、试验样本的准备

为研究琥珀酸是否可提高临床大肠埃希菌对氨苄青霉素的敏感性，选取 30 株临床菌中的 2 株（YT16 和 YT28），对临床菌在不同浓度琥珀酸、不同浓度抗生素以及不同作用时间，对氨苄青霉素敏感性提高的效果进行了深入研究。

从固体 LB 平板上挑取临床菌的单菌落，接种于 5mL LB 液体培养基中，于 37℃、200rpm 条件下培养 16h；按 1: 100 (v/v) 的比例接种于 100mL LB 液体培养基中，于 37℃培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0。收集 20mL 菌液，于 8000rpm 条件下离心 5min，除去上清并用等体积 0.85%生理盐水洗涤菌体，最后用 1×M9 基本培养基（含 10mM 乙酸盐）悬浮菌体，调菌液 OD 值为 0.5，然后分装 5mL 于试管中，用于以下试验研究。

3、琥珀酸胺提高临床菌对抗生素敏感性具有抗生素浓度梯度效应

为了解在不同抗生素浓度时琥珀酸提高临床菌对抗生素敏感性的作用，设置20mM琥珀酸及四个浓度的氨苄青霉素（2.5、5、10和20mg/mL）分别处理细菌，4h后进行活菌计数，比较在相同抗生素浓度情况下，添加琥珀酸和未添加琥珀酸后临床菌的生存率。

结果表明，在加入琥珀酸后，随着氨苄青霉素浓度的升高，其对临床菌杀菌效率的提高越显著。具体情况是：

对于临床菌YT16（如图1A所示），添加20mM琥珀酸后，当氨苄青霉素浓度为2.5mg/mL时，杀菌效率提高了2倍多（生存率由未添加琥珀酸的61.04%下降到添加琥珀酸后的30.06%）；

当氨苄青霉素浓度为5mg/mL时，临床菌的杀菌效率则提高到16.75倍（生存率由未添加琥珀酸的34.53%下降到添加琥珀酸后的2.06%）；当氨苄青霉素浓度为10mg/mL时，临床菌的杀菌效率提高了62.25倍（生存率由未添加琥珀酸的25.99%下降到添加琥珀酸后的0.41%）；当氨苄青霉素浓度为20mg/mL时，临床菌的杀菌效率提高了105.96倍（生存率由未添加琥珀酸的12.47%下降到添加琥珀酸后的0.12%）。

对于临床菌 YT28（如图 1B 所示），添加 20mM 琥珀酸后，当氨苄青霉素浓度为 2.5mg/mL 时，杀菌效率提高了 1.65 倍多（生存率由未添加琥珀酸的 68.38% 下降到添加琥珀酸后的 41.62%）；当氨苄青霉素浓度为 5mg/mL 时，临床菌的杀菌效率则提高到 4.42 倍（生存率由未添加琥珀酸的 56.25% 下降到添加琥珀酸后的 12.71%）；当氨苄青霉素浓度为 10mg/mL 时，临床菌的杀菌效率提高了 21.06 倍（生存率由未添加琥珀酸的 35.87% 下降到添加琥珀酸后的 1.7%）；当氨苄青霉素浓度为 20mg/mL 时，临床菌的杀菌效率提高了 34.48 倍（生存率由未添加琥珀酸的 27.09% 下降到添加琥珀酸后的 0.79%）。

4、琥珀酸提高临床菌对抗生素敏感性具有时间效应

为进一步了解琥珀酸提高临床菌对抗生素敏感性的作用是否具有时间效应，在添加 20mM 琥珀酸和 10mg/mL 氨苄青霉素时，分别在 1~7h 内进行活菌计数，观察其杀菌效率与时间的关系。

结果如图 2 所示，临床菌在添加氨苄青霉素基础上再添加琥珀酸后，活菌数随着时间的延长明显下降：

YT16 在 1h 时，杀菌效率仅为 1.33 倍（生存率由仅添加氨苄青霉素的 93.89% 降低到添加氨苄青霉素和琥珀酸后的 71.54%），而 4h 时杀菌效率达到 60.66 倍（生存率由 47.34 % 降低到 0.78%），7h 时杀菌效率达到 1744.19 倍（生存率由 18.45% 降低到 0.01%）。

YT28 在 1h 时，杀菌效率仅为 1.44 倍（生存率由 96.79% 降低到 66.81%），而 4h 时杀菌效率达到 21.45 倍（生存率由 26.79% 降低到 1.25%），7h 时杀菌效率达到 78.34 倍（生存率由 14.18% 降低到 0.18%）。

5、琥珀酸提高临床菌对抗生素的敏感性具有浓度依赖性

为了解琥珀酸浓度与杀菌效率之间是否存在梯度效应以及其最佳杀菌浓度，在添加 10mg/mL 氨苄青霉素的基础上加入不同浓度的琥珀酸（1.25mM~20mM）作用 4h，然后进行活菌计数，并计算生存率，公式为添加不同浓度琥珀酸浓度时活菌数/不添加琥珀酸时活菌数×100%。

结果如图 3 所示，YT16 没有添加琥珀酸的生存率为 73.8%，而随着添加琥珀酸浓度的升

高，细菌的生存率从 69.23%降低为 1.19%，杀菌效率从 1.07 倍提高至 61 倍。YT28 没有添加琥珀酸的生存率为 86.21%，而随着添加琥珀酸浓度的升高，细菌的生存率从 80.31%降低为 4.24%，杀菌效率从 1.07 倍提高至 20 倍。

6、琥珀酸提高临床大肠埃希菌对氨苄青霉素的敏感性是普遍存在的

5 为研究添加琥珀酸后，不同耐药性的临床大肠埃希菌是否对氨苄青霉素的敏感性都得到了提高，参照本实施例步骤 2 的方法制备其余 28 株临床菌样品，分别添加 20mM 琥珀酸和 10mg/mL 氨苄青霉素，作用 4h 后统计活菌数量，计算生存率。

结果如图 4 所示，琥珀酸能提高所有临床菌对氨苄青霉素的敏感性（如图 4A 所示），其提高敏感性的程度不同，提高倍数在 17~127 倍之间（如图 4B 所示）。

10 实施例 2 琥珀酸提高临床大肠埃希临床耐药菌对其他抗生素的敏感性

1、提高对青霉素类抗生素的敏感性

为研究添加琥珀酸后，临床大肠埃希菌是否对青霉素类抗生素都有作用效果，按照实施例 1 步骤 2 制备 YT16 和 YT28 两种临床大肠埃希菌样品，分别添加 20mM 琥珀酸和 3 种青霉素，作用 4h 后统计活菌数量，计算生存率。

15 结果表明，琥珀酸能提高临床大肠埃希菌 YT16 和 YT28 对这 3 种抗生素的敏感性。具体情况如下：

对于羟苄青霉素，加入 20mM 琥珀酸后，添加 5mg/mL 羟苄青霉素可分别提高 YT16 和 YT28 的敏感性 15.86 和 13.94 倍；添加 7.5mg/mL 羟苄青霉素可分别提高 YT16 和 YT28 的敏感性为 3.37 和 31.85 倍（如图 5A 所示）。

20 对于羧苄青霉素，加入 20mM 琥珀酸后，添加 1.25mg/mL 羧苄青霉素可分别提高 YT16 和 YT28 的敏感性 1.99 和 1.8 倍；添加 2.5mg/mL 羧苄青霉素可分别提高 YT16 和 YT28 的敏感性 11.65 和 15.85 倍（如图 5B 所示）。

对于青霉素 G 钠盐，加入 20mM 琥珀酸后，添加 0.5mg/mL 青霉素 G 钠盐可分别提高 YT16 和 YT28 的敏感性 4.96 和 2.66 倍；添加 0.75mg/mL 青霉素 G 钠盐可分别提高 YT16 和 YT28 25 的敏感性 5.13 和 9.34 倍（如图 5C 所示）。

2、提高对其他抗生素的敏感性

为研究添加琥珀酸后，临床大肠埃希菌是否对青霉素类以外的其他抗生素也有效，实施例 1 步骤 2 制备 YT16 样品，分别添加 20mM 琥珀酸和多种抗生素（庆大霉素，环丙沙星，四环素，红霉素，克林霉素和利福平），作用 4h 后统计活菌数量，计算生存率。

30 结果如图 6 所示，琥珀酸均能提高 YT16 对这几种抗生素的敏感性 2 倍左右。

实施例3 琥珀酸提高多种细菌对氨苄青霉素的敏感性

挑取大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟钝爱德华菌、铜绿假单胞菌、乙型链球菌等多种细菌单克隆到100mL LB液体培养基中，于37℃或30℃、200rpm条件下培养16h达饱和状态。分别收集20mL各细菌菌液，于8000rpm条件下离心5min，除去上清并以等体积的0.85%生理盐水洗涤菌体，最后用1× M9基本液体培养基（含10mM乙酸盐）悬浮菌体，调节菌液OD值至0.5，然后分别分装5mL于试管中备用。

将上述制备好的菌液按照细菌种类分别分为2组：对照组（只添加氨苄青霉素）和实验组（添加氨苄青霉素和琥珀酸）。添加20mM琥珀酸和各自菌2倍最低抑菌浓度的氨苄青霉素，于37℃、200rpm摇床中孵育4h后，取100μL菌液进行活菌计数，计算其生存率。

结果如图7所示，添加琥珀酸后，这些细菌对氨苄青霉素的敏感性普遍都提高了1.5~2.2倍。

综上所述，添加琥珀酸不仅能提高临床大肠埃希菌对氨苄青霉素的敏感性，青霉素类其他3种抗生素也具有类似的效果，而且也能提高临床大肠埃希菌对其他抗生素的敏感性。琥珀酸还能提高多种细菌对氨苄青霉素的敏感性。以上结果表明，可以通过抗生素与琥珀酸联合使用来提高细菌对抗生素敏感性的方法来达到治疗细菌（包括临床大肠埃希耐药菌）的目的。

实施例4 琥珀酸可提高临床大肠埃希菌生物膜的清除效率

1、临床大肠埃希菌生物膜的制备

挑取9株临床大肠埃希菌（YT3, 11, 12, 16, 17, 21, 22, 23, 28, 33）单克隆于LB培养基中过夜培养，按1: 200转接至2mL新鲜LB培养基中，并加入经紫外灭菌的6mm PE-50生物导管，于37℃培养箱中培养24h，每天用1mL LB培养基更换菌液，将导管连续培养3天。将制备好的生物膜用1mL无菌生理盐水洗涤5遍后置于1.5mL EP管中。

2、生物膜体外杀菌实验

实验分为4组：生理盐水对照组、琥珀酸组、氨苄青霉素组、氨苄青霉素+琥珀酸组，于37℃、200rpm摇床中处理导管。琥珀酸的使用剂量为580mg/kg，氨苄青霉素使用剂量为：对于YT16为2000mg/kg，对于YT28为500mg/kg。6h后，超声波清洗15min，将导管上的生物膜洗脱并充分混匀，梯度稀释后点板计数。细菌存活率计算公式为：每组活菌数/对照组活菌数×100%。

3个实验组生物膜上的细菌生存率如图8A所示，由此结果可以看出：（1）单独使用琥珀酸和氨苄青霉素不能清除生物膜上的大肠埃希临床菌；（2）只有当二者联合使用时才可清除大肠埃希临床菌，且其清除效率较明显，可提高9~106倍。

3、琥珀酸可提高氨苄青霉素耐药菌的体内清除效果

进一步以小鼠为试验动物，将制备好的临床大肠埃希菌生物膜植入小鼠尿道中，构建小鼠慢性尿道感染模型，进行体内临床大肠埃希菌清除试验：向5周龄昆明雌性小鼠（约20g）尿道中植入培养3天形成的临床大肠埃希菌生物膜的6mm PE-50生物导管。48h后，将小鼠分为2组，每组5只，分别为氨苄青霉素组和氨苄青霉素+琥珀酸组。小鼠于腹腔注射590mg/kg琥珀酸和适量的氨苄青霉素抗生素（MIC=6250 μ g/mL的细菌注射2000 mg/kg，MIC=1560 μ g/mL的细菌注射500mg/kg），每天2次，连续3天。最后一次24h后，取导管管材于生理盐水中超声悬浮生物膜细菌，梯度稀释并平板计数，计算导管生物膜上的细菌存活率。计算公式为注射物质组活菌数/对照组活菌数 $\times$ 100%。

如图8B所示，结果表明，添加抗生素的同时添加琥珀酸能显著减少生物膜上的耐药菌，菌株的杀菌效率分别增加了14、5、53、30、5、9、38、17和53倍。结合上述生物膜试验结果，说明琥珀酸可提高临床大肠埃希菌生物膜对氨苄青霉素的敏感性。

实施例5 琥珀酸提高临床大肠埃希菌中氨苄青霉素的含量

细菌死亡与进入细菌内部的抗生素数量有关，细菌耐药是由于进入细菌体内的抗生素浓度低于使其死亡的浓度。为研究琥珀酸提高临床大肠埃希菌对抗生素敏感性的作用机理，验证是否通过增加进入细菌内部的抗生素数量而起作用，按照实施例1步骤2的方法制备细菌样本，将实验分为2组：1个对照组（只添加氨苄青霉素）和1个实验组（添加氨苄青霉素和琥珀酸），于37 $^{\circ}$ C、200rpm条件下摇床孵育6h。将培养好的细菌清洗后重悬于生理盐水中，调节OD₆₀₀值至1.0，取1mL菌体超声破碎，离心后取上清用于抗生素含量测定。采用氨苄青霉素ELISA快速诊断试剂盒（购自深圳市绿诗源生物科技有限公司，检测范围在2~1000g/mL）进行检测，具体步骤如下：将50 μ L样品（或标准品）和50 μ L抗体加入96孔板中，轻轻混匀后于25 $^{\circ}$ C孵育30min，洗板4~5次；加入酶标物100 μ L，轻轻混匀后于25 $^{\circ}$ C避光孵育30min，洗板4~5次；分别加入50 μ L底物A和B，轻轻混匀后于25 $^{\circ}$ C避光孵育15min；最后加入反应终止液终止反应，设定酶标仪于450nm处测定反应产物的吸光值。以标准品的百分吸光率为纵坐标，以氨苄青霉素标准品浓度（ng/mL）的半对数为横坐标绘制标准曲线，AMP实际浓度=样品检测浓度 $\times$ 稀释倍数。

结果如图9所示，添加氨苄青霉素和琥珀酸的实验组细菌体内抗生素数量，与只加氨苄青霉素对照组相比，YT16增加了5.97倍，YT28增加了7.99倍。结果表明琥珀酸确实可以提高进入细菌体内的抗生素数量。

实施例6 琥珀酸提高临床大肠埃希菌的质子动力势

由实施例 5 可知，添加琥珀酸后，进入临床大肠埃希菌内部的抗生素数量显著增加，但具体的作用机理尚不清楚。为研究琥珀酸促进抗生素进入细菌内部的作用机理，将实验（实验样品制备按照实施例 1 步骤 2 的方法进行）分为 2 组：1 个对照组（不添加氨苄青霉素和琥珀酸）和 1 个实验组（添加琥珀酸），于 37℃、200rpm 条件下摇床孵育 6h。将经过处理的细菌分别
5 调节浓度至 10^6 CFU/mL，取 1mL 转移至 1.5mL EP 管中，加入 10 μ L 3mM DiOC₂（3,3'-diethyloxa-carbocyanine iodide），充分混匀后于 37℃振荡孵育 30min。上机前转移至流式细胞术分析管中，使用流式细胞仪 FACSCalibur flow cytometer（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）进行检测，参数设置按照仪器操作规程进行。染料 DiOC₂（3）的绿色荧光激发波长 488nm，发射波长 530nm，红色荧光激发波长 488nm、发射波长 610nm。红光强度与绿光
10 强度的比值表示膜电位的强度，质子动力势（PMF）值计算公式为 $\text{LOG} (10^{3/2} * Y_{\text{mean}}/X_{\text{mean}})$ ，Y mean 和 X mean 分别表示红光强度和绿光强度，按照 BacLight bacterial membrane potential kit（Invitrogen）试剂盒说明进行测定。

结果如图 10 所示，发现添加琥珀酸后，细菌的质子动力势增加 1.2 倍（YT16）和 1.45 倍（YT28）。此结果表明，添加琥珀酸后可引起细菌质子动力势增加，由此使进入细菌内部的
15 抗生素含量增加，最终使细菌死亡。

最后所应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，对于本领域的普通技术人员来说，在上述说明及思路的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动，这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

1. 琥珀酸在提高细菌对抗生素敏感性方面的应用。
2. 一种抑菌或杀菌的药物，其特征在于，含有抗生素和琥珀酸。
3. 一种提高细菌对抗生素敏感性的方法，其特征在于，将琥珀酸与抗生素联用。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述细菌为敏感菌或耐药菌。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于，所述细菌为大肠杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、迟缓爱德华菌、铜绿假单胞菌或乙型链球菌中的至少一种。
6. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于，所述抗生素选自氨苄青霉素、羟苄青霉素、青霉素 G、庆大霉素、环丙沙星、四环素、红霉素、克林霉素或利福平中的至少一种。
7. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述琥珀酸与抗生素的剂量比按重量计为 1:0.0015~300。
8. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述琥珀酸的使用量为 3mg~30g/次给药。
9. 琥珀酸在制备清除生物膜细菌的制剂或药物中的应用。
10. 根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述细菌为临床大肠埃希菌。

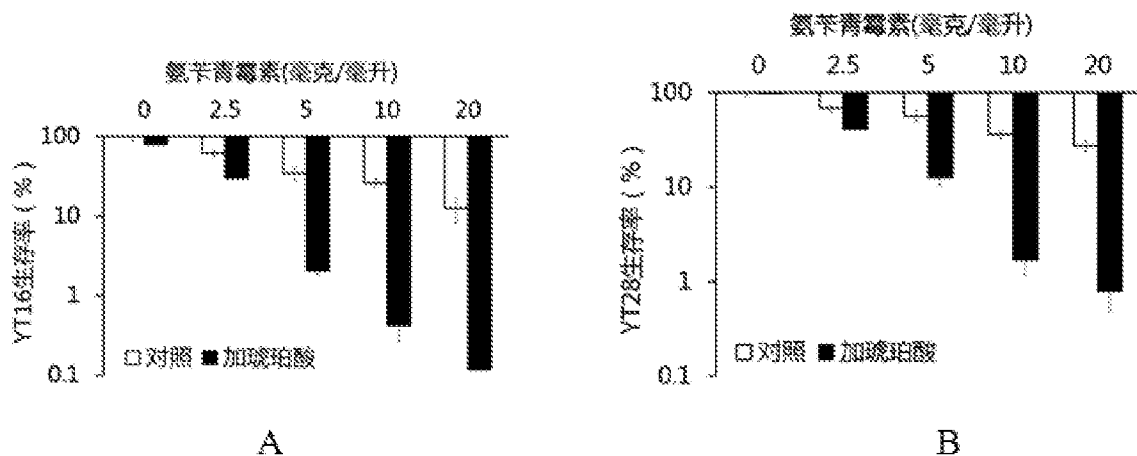


图1

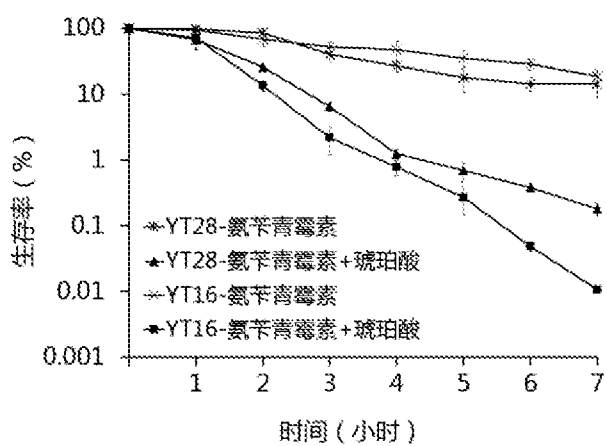


图2

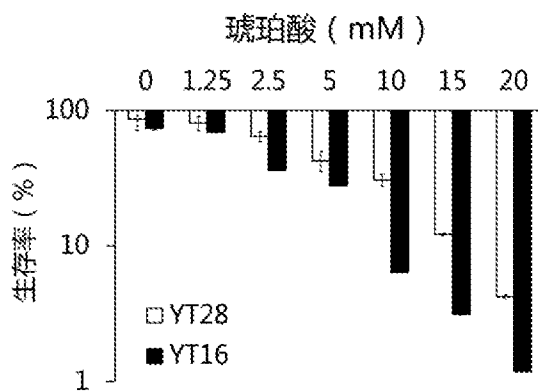


图3

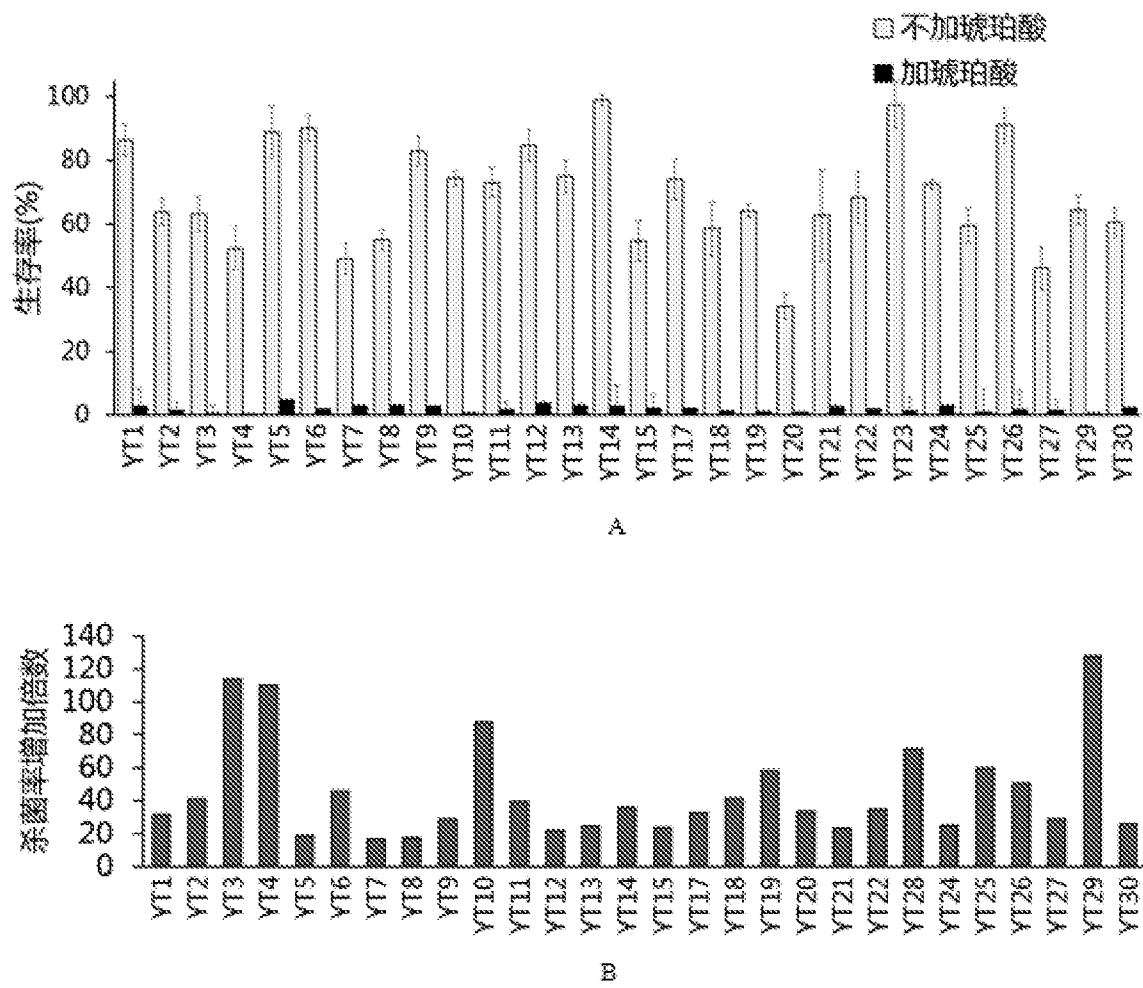


图 4

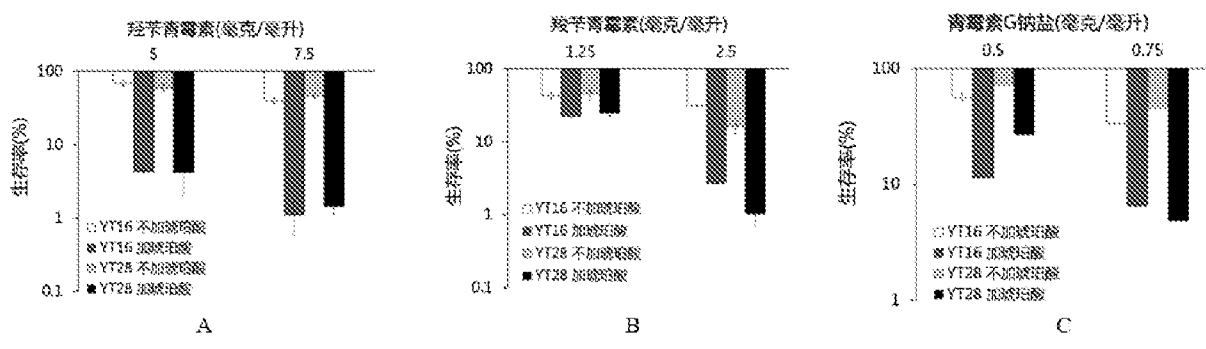


图5

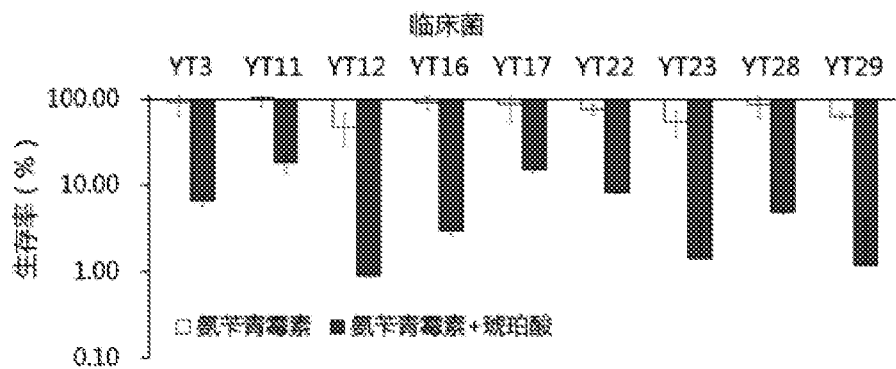
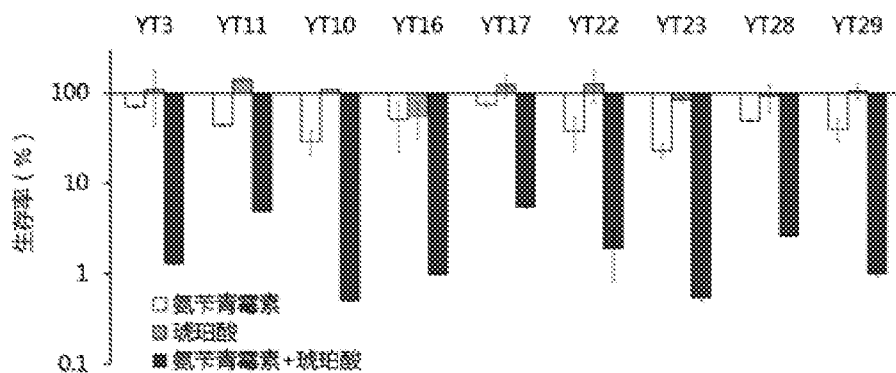
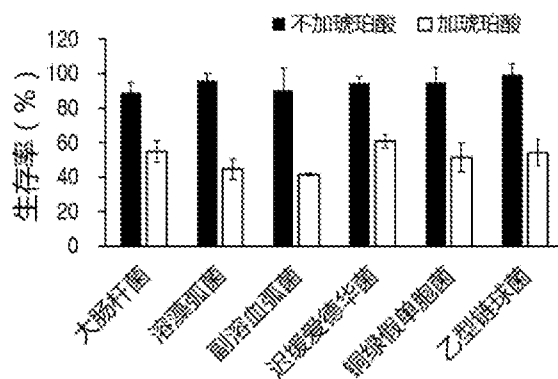
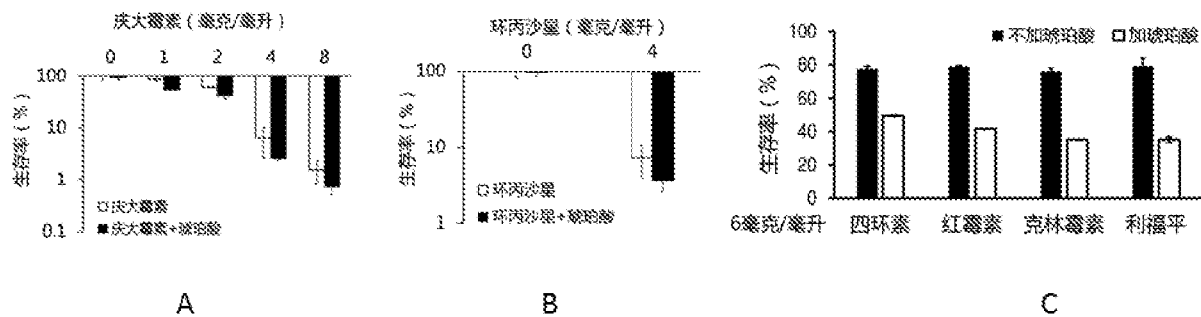


图8

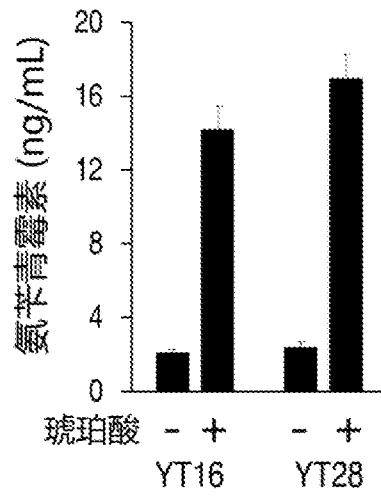


图9

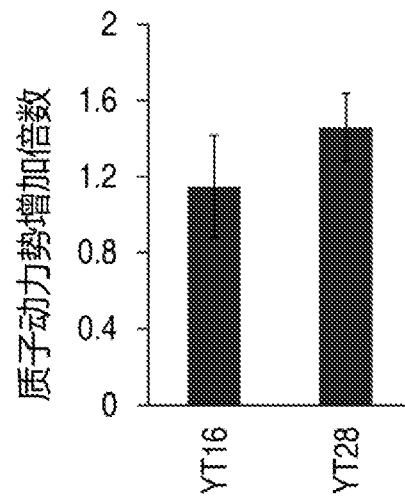


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/090752

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/194(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/43(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, VEN, STN, ISI-WEB OF SCIENCE: 琥珀酸, 丁二酸, 抗生素, 抗菌素, 青霉素, 耐药, 耐受, 大肠埃希, 大肠杆菌; amber acid; butanedioic acid; SA; succinic acid; antibiotic; laevomyces; PC; PCN; Pen; pen.; penicillin; penicillinum; penlc; drug fast; drug-resistance, antibiotic resistance; Bacillus coli; Bacterium coli; E coli; E. coli; Escherichia coli

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	宋志军 等 (SONG, Zhijun et al.). "细菌生物膜与抗生素耐药 (Non-official translation: Bacterial Biofilm and Antibiotic Resistance)" <i>生理科学进展 (Progress in Natural Sciences)</i> , Vol. 13, No. 10, 31 October 2003 (2003-10-31), pp. 1015-1021	1-10
A	尹琳 (YIN, Lin). "大肠杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展 (Research Progress of Carbapenem Resistance Mechanisms in Escherichia Coli)" <i>热带医学杂志 (Journal of Tropical Medicine)</i> , Vol. 17, No. 9, 30 September 2017 (2017-09-30), pp. 1263-1267	1-10
A	CN 105492004 A (LUODA PHARMA PTY LIMITED) 13 April 2016 (2016-04-13) claims	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2018

Date of mailing of the international search report

24 December 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/090752

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1,3-8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] These claims relate to a method for the treatment of diseases and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). However the international search report is still made on the corresponding pharmaceutical application thereof.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/090752

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105492004	A	13 April 2016	CA	2900372	A1	14 August 2014
				EP	2953623	A1	16 December 2015
				HK	1216389	A0	11 November 2016
				BR	112015018990	A2	15 August 2017
				AU	2014214547	A1	20 August 2015
				MX	2015010190	A	03 August 2016
				US	9943500	B2	17 April 2018
				KR	20150119007	A	23 October 2015
				WO	2014121342	A9	09 September 2016
				RU	2015132212	A	15 March 2017
				AU	2014214547	B2	30 August 2018
				US	2016000748	A1	07 January 2016
				IN	201502261	P3	27 May 2016
				WO	2014121342	A1	14 August 2014
				JP	2016507532	A	10 March 2016
				ZA	201506653	A	21 December 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/090752

A. 主题的分类 A61K 31/194(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 31/43(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, VEN, STN, ISI-WEB OF SCIENCE 琥珀酸, 丁二酸, 抗生素, 抗菌素, 青霉素, 耐药, 耐受, 大肠埃希, 大肠杆菌; amber acid; butanedioic acid; SA; succinic acid; antibiotic; laevomycetin; PC; PCN; Pen; pen.; penicilin; penicillinum; penlc; drug fast; drug-resistance, antibiotic resistance; Bacillus coli; Bacterium coli; E coli; E. coli; Escherichia coli														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>宋志军 等. "细菌生物膜与抗生素耐药" 自然科学进展, 第13卷, 第10期, 2003年 10月 31日 (2003 - 10 - 31), 1015-1021页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>尹琳. "大肠杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展" 热带医药杂志, 第17卷, 第9期, 2017年 9月 30日 (2017 - 09 - 30), 1263-1267页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105492004 A (罗达制药有限公司) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求书</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	宋志军 等. "细菌生物膜与抗生素耐药" 自然科学进展, 第13卷, 第10期, 2003年 10月 31日 (2003 - 10 - 31), 1015-1021页	1-10	A	尹琳. "大肠杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展" 热带医药杂志, 第17卷, 第9期, 2017年 9月 30日 (2017 - 09 - 30), 1263-1267页	1-10	A	CN 105492004 A (罗达制药有限公司) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求书	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	宋志军 等. "细菌生物膜与抗生素耐药" 自然科学进展, 第13卷, 第10期, 2003年 10月 31日 (2003 - 10 - 31), 1015-1021页	1-10												
A	尹琳. "大肠杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展" 热带医药杂志, 第17卷, 第9期, 2017年 9月 30日 (2017 - 09 - 30), 1263-1267页	1-10												
A	CN 105492004 A (罗达制药有限公司) 2016年 4月 13日 (2016 - 04 - 13) 权利要求书	1-10												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期												
2018年 12月 10日		2018年 12月 24日												
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员												
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		李钢 电话号码 62411207												

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 1, 3-8
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 这些权利要求涉及疾病的治疗方法，属于不检索的主题（PCT细则39.1(iv)），但本报告还是对其相应的制药应用进行检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/090752

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105492004	A	2016年 4月 13日	CA	2900372	A1	2014年 8月 14日
				EP	2953623	A1	2015年 12月 16日
				HK	1216389	A0	2016年 11月 11日
				BR	112015018990	A2	2017年 8月 15日
				AU	2014214547	A1	2015年 8月 20日
				MX	2015010190	A	2016年 8月 3日
				US	9943500	B2	2018年 4月 17日
				KR	20150119007	A	2015年 10月 23日
				WO	2014121342	A9	2016年 9月 9日
				RU	2015132212	A	2017年 3月 15日
				AU	2014214547	B2	2018年 8月 30日
				US	2016000748	A1	2016年 1月 7日
				IN	201502261	P3	2016年 5月 27日
				WO	2014121342	A1	2014年 8月 14日
				JP	2016507532	A	2016年 3月 10日
				ZA	201506653	A	2016年 12月 21日