(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **155916 B**

P.B.

(21) Patentansøgning nr.: **1626/78**

(51) Int.Cl.[4] **A 61 K 35/84**

(22) Indleveringsdag: **13 apr 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **14 okt 1978**

(44) Fremlagt: **05 jun 1989**

(86) International ansøgning nr.: **-**

(30) Prioritet: **13 apr 1977 JP 52/41513**

(71) Ansøger: ***KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA; No. 9-11, Horidome-cho 1-chome; Nihonbashi; Chuo-ku; Tokyo, JP**

(72) Opfinder: **Chikao *Yoshikumi; JP, Yoshio *Ohmura; JP, Tetsuya *Hotta; JP**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree**

(54) **Middel til fremme af følsomheden over for antibiotika hos bakterier, der er blevet resistente herimod**

(56) Fremdragne publikationer

———

DK 155916 B

Opfindelsen angår et middel til fremme af følsomheden over for antibiotika hos bakterier, der er blevet resistente herimod.

Fremskridtene inden for kemoterapien og navnlig fremkomsten af en række antibiotika har bevirket en drastisk reduktion i forekomsten af bakterielle infektionssygdomme, såsom tuberkulose, dysenteri osv., og disse antibiotikas betydning for folkesundheden kan næppe overdrives. Disse moderne resultater har imidlertid på den anden side medført en kraftig forøgelse af de såkaldte antibiotikaresistente bakterier, som ikke påvirkes af de eksisterende kemoterapeutika. Hvad der gør sagen værre er, at mange "flerantibiotikaresistente bakterier", dvs. bakterier, som er resistente mod to eller flere antibiotika, er blevet udviklet ud fra de mere ubehagelige sygdomsfremkaldende bakterier, såsom Mycobacteria, Shigella, Staphylococci etc., og disse nyskabninger volder alvorlige problemer inden for kemoterapiområdet.

Af denne grund har antibiotiske præparater sædvanligvis en kort levetid, og medicinproducenterne er således tvunget til at markedsføre de nye antibiotikatyper hurtigt efter hinanden med kolossale omkostninger til resultat. Dette kan medføre et enormt tab, som man af samfundsøkonomiske årsager ikke kan se bort fra.

På denne baggrund er de antibiotikaresistente bakterier blevet underkastet grundige studier, og det har herved vist sig, at brugen af et nærmere bestemt nitrogenholdigt polysaccharid i forbindelse med antibiotika kan medføre en tydelig forøgelse af antibiotikafølsomheden hos de bakterier, som er blevet resistente mod de antibiotiske stoffer. Det viste sig også, at det nitrogenholdige polysaccharid ikke blot er i stand til at øge antibiotikumets virkning over for de resistente bakterier, men også til at udstrække dets virkning således, at langvarig anvendelse af de antibiotiske midler uden virkningsændring blev mulig.

Disse virkninger har det vist sig muligt at opnå med midlet ifølge opfindelsen, som er ejendommeligt ved, at det som aktiv bestanddel indeholder et nitrogenholdigt polysaccharid med en molekylvægt - bestemt ved ultracentrifugering - på fra 5.000 til 300.000, at polysaccharidet indeholder 42,0-46,0% carbon, 5,3-7,0% hydrogen og

0,5-8,0% nitrogen, at det har en specifik drejningsevne på fra 0 til $+50^0$, at det er letopløseligt i vand, men uopløseligt i acetone, pyridin, chloroform og hexan, at det i sit IR-absorptionsspektrum har karakterisktiske absorptioner ved 840 cm^{-1} og 890 cm^{-1}, og at forholdet mellem saccharidelen og proteindelen ligger på fra 62:38 til 97:3 ifølge NMR-spektroskopi, samt at det fremstilles ved at ekstrahere mycelium af basidiomyceter hørende til slægten Coriolus af Polyporaceae med et vandigt opløsningsmiddel efterfulgt af i og for sig kendte oprensningsprocesser.

Andre med opfindelsen opnåelige fordele vil fremgå af nedenstående detaljerede beskrivelse og af tegningen, hvor

fig. 1 er et IR-absorptionspektrum af det nitrogenholdige polysaccharid (NP) i midlet ifølge opfindelsen,

fig. 2 er et NMR-absorptionsspektrum af stoffet, og

fig. 3-6 er grafiske afbildninger, som viser virkninger af midlet ifølge opfindelsen.

Opfindelsen vil nu blive beskrevet mere detaljeret nedenfor.

Det nitrogenholdige polysaccharid, der benyttes som aktiv bestanddel i midlet ifølge opfindelsen, kan frembringes ved at ekstrahere mycelia af basidiomyceter hørende til slægten Coriolus af Polyporaceae med et vandigt opløsningsmiddel. Betegnelsen "mycelium af basidiomyceter hørende til slægten Coriolus af Polyporaceae" er, som den benyttes i den foreliggende sammenhæng, baseret på klassificeringen i "Coloured Illustration of Fungi of Japan" af Rokuya Imazeki og Tsugio Hongo (Hoikusha Pub. Co.), 1965.

Fremgangsmåden til fremstilling af det nitrogenholdige polysaccharid, der benyttes som den aktive bestanddel i midlet ifølge opfindelsen, er beskrevet kort nedenfor.

Det mycelium af basidiomyceter hørende til slægten Coriolus, der benyttes som udgangsmateriale for ekstraktionsprocessen, kan fremstilles enten naturligt eller ved dyrkning. For så vidt angår

dyrkning af svampene under benyttelse af et væskeformigt medium, er det muligt som udgangsmateriale at benytte hele kulturproduktet indbefattende ikke blot det dannede mycelium, men også eluatet i det væskeformige medium efter dyrkning. Det således fremkomne udgangsmateriale ekstraheres med et vandigt opløsningsmiddel, og ekstraktet underkastes passende behandlinger, såsom filtrering, neutralisation, koncentrering af filtratet, dialyse, udsaltning etc., til fjernelse af det lavmolekylære materiale (med en molekylvægt på under 5000) fra ekstraktet og tørres til opnåelse af et pulveragtigt stof. Det således fremkomne pulveragtige stof er sammensat af et nitrogenholdigt polysaccharid og kan benyttes som den aktive bestanddel i midlet ifølge opfindelsen. Det nitrogenholdige polysaccharid, der er fremkommet på den ovenfor beskrevne måde, har følgende egenskaber.

Fysiokemiske egenskaber:

(1) Generelt

Stoffet er pulveragtigt og har en brun farve, udviser ikke noget veldefineret smeltepunkt og carboniseres ved stærk opvarmning. Det er uopløseligt i organiske opløsningsmidler, såsom pyridin, chloroform, benzen, hexan etc., men opløseligt i vand.

(2) IR-absorptionsspektrum

IR absorptionsspektret for stoffet viser absorption ved og i nærheden af 3.600-3.200 cm^{-1}, 2.920-2.900 cm^{-1}, 1.660-1.610 cm^{-1}, 1.460 cm^{-1}, 1.410 cm^{-1}, 1.360 cm^{-1}, 1.230 cm^{-1}, 1.150 cm^{-1}, 1.080 cm^{-1}, 1.060-990 cm^{-1}, 925 cm^{-1}, 890 cm^{-1}, 840 cm^{-1}, 755 cm^{-1} og 705 cm^{-1}. Der bemærkes således absorption af β-bindinger af glucan i saccharidelen ved 890 cm^{-1} og en anden absorption af α-bindinger i glucan ved 840 cm^{-1}.

(3) Grundstofanalyse.

Sammensætningen af stoffet målt ved grundstofanalyse er 42-46% carbon, 5,3-7,0% hydrogen og 0,5-8,0% nitrogen. Resten er oxygen.

(4) Optisk drejning.

Den optiske drejning af stoffet udtrykt ved den specifikke drejningsevne $[\alpha]_D^{25}$er 0-50°.

(5) Farvereaktion.

Stoffet giver positiv phenol-svovlsyrereaktion, anthron-svovlsyrereaktion og ninhydrinreaktion. Det positive resultat af disse farvereaktioner viser, at det aktive stof, som benyttes ifølge opfindelsen, er sammensat af saccharid og protein. For at få kendskab til saccharidsammensætningen af det nitrogenholdige polysaccharid, hydrolyseredes en prøve med methanolisk saltsyre og underkastedes, efter trimethylsilylering ved en velkendt metode, gaschromatografi. Resultatet viste, at stoffet i det væsentlige er sammensat af glucose og også indeholder mannose, galactose, xylose og fucose. En aminosyreanalyse af proteindelen af det nitrogenholdige polysaccharid afslørede, at proteindelen af stoffet er sammensat af asparaginsyre, threonin, serin, glutaminsyre, prolin, glycin, alanin, cystin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin, tryptophan, phenylalanin, lysin, histidin og alginin. Heriblandt er asparaginsyre, threonin, glutaminsyre, glycin, alanin, valin og leucin de dominerende, og de bidrager med mere end 70% af den samlede mængde af aminosyrer.

(6) NMR-spektrum.

NMR-absorptionsspektroskopi gennemførtes til bestemmelse af forholdet mellem saccharidelen og proteindelen i det nitrogenholdige polysaccharid, såvel som saccharidbindingerne.

NMR-absorptionsspektret af prøven måltes ved 100 MHz under anvendelse af tungt vand som opløsningsmiddel, og natrium 2,2-dimethyl-2-silanopentan-5-sulfonat (D.S.S.) som intern standard. Som det fremgår af figur 2, ses absorptioner ved 0,9±0,2 ppm, 1,2±0,2 ppm 2,0±0,2 ppm, 4,5±0,2 ppm, 4,7±0,2 ppm, 5,0±0,2 ppm og 5,4±0,2 ppm, og der ses et bredt absorptionsbånd ved 3,0-4,4 ppm. Proteindelen undersøgtes ved at antage, at området 0,5-2,5 ppm er forbundet med proteindelens protonintensitet, og området 2,5-6,0 ppm er forbundet

med saccharidets protonintensitet. Proteindelen vurderedes til mindre end 40%. Idet det endvidere antages, at området 4,4-4,9 ppm er forbundet med β-bindinger i sacchariddelen, og området 4,9-5,4 ppm er forbundet med α-bindinger, bestemtes dette (β-bindinger/α-bindinger)-forhold til at ligge i området 85/15-40/60. - Forholdet mellem sacchariddel og proteindel i stoffet blev ved NMR-spektroskopi bestemt til 67:33.

(7) Molekylvægt.

Molekylvægten af det nitrogenholdige polysaccharid, målt ved ultracentrifugering, lå i området fra 5.000 til 300.000.

Akut toksicitet.

Prøven gennemførtes på 4-5 uger gamle mus af ICR-JCL-stammen, hvilke mus vejede 21-25 g, og rotter af Donryu-stammen, hvilke rotter var 4-5 uger gamle og vejede 100-150 g. Midlet, opløst i en fysiologisk saltvandsopløsning, blev indgivet ad nedenstående fire veje: intravenøst, subkutant, intraperitonealt og oralt. De generelle symptomer, død og forandring i legemsvægten hos forsøgsdyrene, blev observeret over en periode på 7 dage, og derefter blev dyrene aflivet og obduceret. Hverken for rotter eller mus forekom der dødsfald, selv ved den højeste af de i tabel 1 angivne doseringer. Bestemmelse af LD_{50} var umulig, eftersom ingen af dyrene døde under forsøget.

Tabel 1

Dyr	Indgivelsesmåde	LD_{50} (mg/kg)	
		hundyr	handyr
Mus	Intravenøst	>1.300	>1.300
	Subkutant	>5.000	>5.000
	Intraperitonealt	>5.000	>5.000
	Oralt	>20.000	>20.000

	Intravenøst	>600	>600
	Subkutant	>5.000	>5.000
Rotter	Intraperitonealt	>5.000	>5.000
	Oralt	>20.000	>20.000

Virkningen af det nitrogenholdige polysaccharid (i det følgende simpelthen betegnet midlet ifølge opfindelsen) med hensyn til fremme af antibiotikafølsomheden hos antibiotikaresistente bakterier, der er blevet resistente mod antibiotiske midler, vil nu blive beskrevet.

De antibiotiske midler, som påvirker de antibiotikaresistente bakterier ved kombination med midlet ifølge den foreliggende opfindelse, er sådanne midler, som hidrører fra svampe, bakterier, actinomyceter og lignende, og typiske eksempler på sådanne antibiotiske midler er de nedenfor angivne:

Penicillin G (i det følgende forkortet PG)
Streptomycin (i det følgende forkortet SM)
Kanamycin (i det følgende forkortet KM)
Chloramphenicol (i det følgende forkortet CP)
Tetracyclin (i det følgende forkortet TC)
Erythromycin (i det følgende forkortet EM)
Aminobenzylpenicillin (i det følgende forkortet ABPC)
Cephaloridin (i det følgende forkortet CER)
Colistin (i det følgende forkortet CL)

Midlet ifølge opfindelsen har den virkning, at det fremmer antibiotikafølsomheden hos følgende bakterier, som er resistente over for antiobiotiske midler:

Escherichia coli
Streptococcus faecalis
Staphylococcus aureus
Enterobacter aerogenes
Salmonella enteritidis
Shigella Sonnei
Klebsiella pneumoniae
Proteus mirabilis

Pseudomonas aeruginosa

Virkningen af midlet ifølge opfindelsen med hensyn til fremme af antibiotikafølsomheden hos de antibiotikaresistente bakterier bekræftedes på følgende måde.

De antibiotikaresistente bakterier fremkom som beskrevet nedenfor ved koncentrationsgradientpladekultur (se "Chemotherapeutics and Resistant Bacteria", 1970, af Chikara Watanabe, Asakura Shoten).

Der fremstilledes agarplader med antibiotikakoncentrationsgradienter på fra 10 til 100 µg/ml, og bakterier fra hver stamme, som skulle undersøges, blev udstrøget som stregkultur eller udsmurt. Disse plader blev opbevaret ved 37°C i adskillige dage, og en koloni dannet i højkoncentrationsområdet isoleredes og inokuleredes igen på tilsvarende måde på pladerne. Denne operation blev gentaget adskillige gange til opnåelse af bakteriestammer, som var resistente over for de respektive antibiotika.

Antibiotikafølsomheden hos de antibiotikaresistente stammer og hos de oprindelige stammer (følsomme stammer) sammenlignedes ved hjælp af den minimale væksthæmningskoncentration (i det følgende forkortet MIC) af the Japanese Chemotherapeutical Association (se "Chemotherapy", bind 22, nr. 6, 1126, (1974), af MIC Determination Method Reform Committee) angivne standardmetode. Nærmere bestemt fremstilledes dobbelt fortyndede systemer af hvert antibiotikum, og de blandedes med hjerteinfusionsagarmediet (Nippon Eiyo Kagaku Co., Ltd.) til dannelse af agarpladerne. Derefter udsmurtes en løkkefuld af hver stamme, som var blevet dyrket ved 37°C i Trypto-soyabouillon (Nippon Eiyo Kagaku Co., Ltd.) i 18 timer, på hver plade, og efter dyrkning i 18 timer ved 37°C iagttoges væksten af stammen på hver plade.

For at kunne bedømme ændringen af MIC for hver resistent stamme ved den forenede anvendelse af midlet ifølge den foreliggende opfindelse og de antibiotiske midler (de midler, som ikke længere havde virkning på bakteriestammerne) gennemførtes samme procedure som beskrevet ovenfor med undtagelse af, at der yderligere indblandedes 10-1.000 µg/ml af midlet ifølge den foreliggende opfindelse i

systemerne, og MIC-værdien bestemtes ved ovennævnte agarpladem etode.

MIC reduceredes til halvdelen eller mindre end halvdelen af niveauet inden tilsætning ved tilsætning af midlet ifølge den foreliggende opfindelse. Den mængde af midlet ifølge den foreliggende opfindelse, som tilsættes, er over 10 µg/mg, fortrinsvis mere end 100 µg/ml. pH-Værdien i mediet blev holdt på 7,2±0,1, således at MIC ikke påvirkedes af mediets pH-værdi. Det konstateredes endvidere på forhånd ved agarfortyndingskulturmetoden, at midlet ifølge den foreliggende opfindelse ikke i sig selv havde nogen antibakteriel aktivitet på de undersøgte bakteriestammer.

Terapeutisk afprøvning over for infektionssygdomme:

Den terapeutiske afprøvning over for infektionssygdomme gennemførtes på følgende måde.

En mus inokuleredes intraperitonealt med 1×10^8 celler af de antibiotikaresistente bakterier, og 1-3 timer senere blev der indgivet 10-1.000 mg/kg (legemsvægt af mus) antibiotika og $1\text{-}10^4$ mg/kg af midlet ifølge den foreliggende opfindelse enten intraperitonealt eller oralt. Daglig observation gennemførtes i 7 dage efter indgivelsen til bestemmelse af overlevelsestallet med henblik på at vurdere effektiviteten af midlet ifølge den foreliggende opfindelse. I dette tilfælde viste det sig, at den effektive dosis af midlet ifølge den foreliggende opfindelse fortrinsvis var over 10 mg/kg ved intraperitoneal indgivelse og over 100 mg/kg ved oral indgivelse. Det var over 40%.

Det konstateredes således, at midlet ifølge den foreliggende opfindelse er i stand til ikke blot at øge den terapeutiske effekt ved in vitro anvendelser, men også ved kemoterapi af de undersøgte infektionssygdomme.

Midlet ifølge den foreliggende opfindelse udviser også en ekstremt lav akut toksicitet og kan indgives på talrige måder, såsom ved intraperitoneal injektion, dermal indgivelse, oral indgivelse og intrarectal indgivelse. Midlet ifølge den foreliggende opfindelse kan således blandes med et antibiotikum under

antibiotikafremstilling eller kan indgives for sig.

Når midlet tilberedes til tabletter, korn, pulver, kapsler eller lignende, beregnet til oral indgivelse, kan et hvilket som helst af sådanne præparater indeholde tilsætningsstoffer af den type, som er generelt anvendt ved antibiotikafremstilling, såsom bindemidler, inclusionsmidler, excipiens, smøremiddel, desintegrator, befugtningsmiddel etc. Når midlet benyttes som væske til oral indgivelse, kan den fremstilles i form af en væskeformig medicin, såsom en rysteblanding, suspension, emulsion, sirup etc., eller den kan fremstilles i form af et tørt produkt samt genopløses umiddelbart inden brug. Sådanne væskeformige præparater kan også indeholde de tilsætningsstoffer og/eller præserveringsmidler, som almindeligvis benyttes i antibiotikapræparater. Midler til injektion kan indeholde tilsætningsstoffer, såsom stabilisator, puffer, konserveringsmiddel, isotoniseringsmiddel etc. og kan leveres i form af enkeltdosisampuller eller flerdosisbeholdere. Ovennævnte sammensætninger kan også leveres i form af en vandig opløsning, suspension, opløsning eller emulsion i et oliebæremedium eller et vandigt bæremedium, mens den aktive bestanddel kan gives form af et pulver, som genopløses med et egnet bærestof, f.eks. steriliseret ikke-pyrogent vand umiddelbart inden brug. Såfremt midlet benyttes i form af en salve eller olie, kan det indeholde en oliebasis eller fedtbasis, en emulgerende basis, en vandopløselig basis, konserveringsstoffer eller lignende.

Opfindelsen vil nu blive beskrevet i form af udførelsesformer, der yderligere belyser den fremragende virkning af midlet ifølge den foreliggende opfindelse.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af nitrogenholdigt polysaccharid.

Der fremstilledes et væskeformigt medium med følgende sammensætning:

Pepton	5 g
Gærekstrakt	3 g
KH_2PO_4	0,3 g
K_2HPO_4	0,3 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
Glucose	50 g
Vand	1 liter
pH 6.0	

I hver af 100 koniske kolber med rumfanget 1 l anbragtes 150 ml af ovennævnte medium, og efter forsegling af hver kolbe med en vatprop underkastedes det væskeformige medium sterilisation i 30 minutter ved 120°C og inokuleredes derefter på sædvanlig vis med separat skråkultiverede mycelia af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. CM-105 stamme (Ferm. Res. Inst. Deponeringsnr. FERM-P-2416) efterfulgt af 20 dages stationær dyrkning ved 25-27°C. Den derved fremkomne kulturvæske tørredes ved hjælp af et tromletørreapparat af dobbelttromletypen under tilvejebringelse af 451 g tørt produkt. 150 g Af dette tørre produkt blev knust og ekstraheret med 0,1N natriumhydroxidopløsning ved en temperatur på 95-98°C og under normalt tryk i 3 timer under anvendelse af et rustfrit ekstraktionsapparat. Den derved fremkomne alkaliske ekstraktopløsning neutraliseredes og filtreredes, og filtratet koncentreredes derefter til 500 ml. Denne koncentrerede opløsning indesluttedes derpå i cellofanfolie og underkastedes dialyse i strømmende vand i 90 timer. Det fremkomne dialysat koncentreredes yderligere under reduceret tryk og sprøjtetørredes til opnåelse af 19,5 g pulveragtigt produkt.

For at undersøge egenskaberne af dette pulveragtige produkt blev en prøve heraf underkastet grundstofanalyse under anvendelse af et CHN-CORDER MT-2 analyseapparat (Yanagimoto Seisakujo Co., Ltd.), og resultatet viste 42,1% carbon, 6,9% hydrogen og 5,8% nitrogen. Bestemmelse af specifik drejningsevne gennemførtes på en 0,25% vandig opløsning af prøven under anvendelse af en YANACO-OR-50 model (Yanagimoto Seisakujo Co., Ltd.). Resultatet viste, at den specifikke drejningsevne af dette produkt er +12°.

Til fastlæggelse af saccharidsammensætningen af produktet sattes 19 mg prøve til 3% methanolisk saltsyre til gennemførelse af methanolyse over en periode på 16 timer ved 100°C. Reaktanten filtreredes efter neutralisation af saltsyren med sølvcarbonat ved stuetemperatur, og det fremkomne filtrat koncentreredes og inddampedes til tørhed. Det faste produkt opløstes derefter i 0,5 ml pyridin og

tilsattes yderligere 0,2 ml hexamethyldisilazan og 0,3 ml trimethylchlorsilan, og blandingen fik lov at henstå ved stuetemperatur i 30 minutter til opnåelse af trimethylsilylering. Produktet opløstes derefter i chloroform, og efter udvaskning af overskydende reagens og dehydrering inddampedes filtratet til tørhed. Dette produkt opløstes derefter i carbontetrachlorid og gaschromatograferedes. Resultatet viste 70,5% glucose, 3,8% galactose, 10,3% mannose, 5,4% xylose og 10,0% fucose.

Til bestemmelse af proteinsammensætningen i det pulveragtige produkt underkastedes en prøve aminosyreanalyse ifølge en almindeligt anvendt metode. Resultatet viste følgende sammensætning: 15% asparaginsyre, 8% threonin, 6% serin, 14% glutaminsyre, 4% prolin, 8% glycin, 10% alanin, 4% isoleucin, 6% leucin, 1% tyrosin, 4% phenylalanin, 2% tryptophan, 2% lysin, 3% alginin, 4% ammoniak og 1% N-glucosamin samt spor af histidin.

Ved NMR-absorption benyttedes tungt vand som opløsningsmiddel under anvendelse af DSS (2,2-dimethyl-2-silanopentan-5-sulfonat) som intern standard, og til eliminering af en eventuel indflydelse af rester af let vand i det tunge vand benyttedes værdier, som var blevet korrigeret på basis af den formodede Lorenz's kurve. Under disse omstændigheder bestemtes forholdet mellem saccharidelen og proteindelen ved at antage, at absorptionen ved 0,5-2,5 ppm skyldes protoner i proteindelen, og absorptionen ved 2,5-6,0 ppm skyldes protoner i saccharidelen. Det fremkomne forhold mellem saccharid og protein var 89/11. Endvidere bestemtes forholdet mellem β-bindinger/α-bindinger ud fra antagelsen af, at et absorptionsbånd ved 4,4-4,9 ppm er forbundet med β-bindinger i saccharidelen, og et absorptionsbånd ved 4,9-6,0 ppm er forbundet med α-bindinger. Dette forhold var 65/35.

Molekylvægten bestemtes ved ultracentrifugering, og bestemmelsen gennemførtes ud fra sedimentationsligevægten og det frembragte grænseflademønster under anvendelse af et optisk interferenssystem og følgende betingelser: koncentration af prøve 0,3%, opløsningsmiddel M/10 KCl, temperatur 25°C, væskesøjle 1,7 mm og omdrejningshastighed 22.000 opm med en måletid på 5 timer.

Den fremkomne middelmolekylvægt var 100.000.

Afprøvning af virkningen med hensyn til fremme af antibiotikafølsomheden hos antibiotikaresistente bakterier, som er blevet resistente over for antibiotika

(1) Frembringelse af antibiotikaresistente bakterier.

Prøver af antibiotikaresistente bakterier frembragtes ifølge ovennævnte koncentrationsgradientpladedyrkning under anvendelse af Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Salmonella enteritidis, Klebsiella pneumoniae og Pseudomonas aeruginosa. MIC-Værdierne for de oprindelige bakterier og for bakterier, som har udviklet resistens over for antibiotika, er opsummeret i nedenstående tabel 2.

Tabel 2

Bakterie	Antibiotikum	Mindste vækstinhiberende koncentration MIC(µg/ml)	
		Oprindelig stamme	Resistent stamme
Staphylococcus aureus	PC	0,025	12,5
	CP	3,1	25
	TC	0,8	25
	EM	0,4	12,5
	SM	1,6	100<
Streptococcus faecalis	TC	0,4	25
Escherichia coli	PC	12,5	100<
	SM	3,1	100
	KM	6,3	200
	CP	1,6	50
	TC	3,1	25

	CER	3,1	25
	EM	100<	-
Enterobacter aerogenes	KM	3,1	100
Salmonella enteritidis	PC	6,3	100<
	CP	0,8	12,5
	SM	25	100<
	TC	1,6	12,5
	EM	100<	-
Shigella sonnei	KM	3,1	50
Klebsiella pneumoniae	PC	6,3	100<
	SM	1,6	100
	CP	0,8	25
	TC	1,6	25
	EM	12,5	100<
Proteus mirabilis	ABPC	0,8	25
Pseudomonas aeruginosa	CL	12,5	200

MIC-værdierne for PC blev beregnet under antagelse af, at 1.667 enheder = 1 mg,

MIC-værdierne for CL blev beregnet under antagelse af, at 30.000 enheder = 1 mg.

(2) Virkning med hensyn til fremme af antibiotikafølsomheden hos antibiotikaresistente bakterier.

Til undersøgelse af ændringer i MIC-værdien for de respektive antibiotikaresistente stammer ved samtidig brug af midlet ifølge den

foreliggende opfindelse og forskellige antibiotika (de antibiotika, som benyttedes til at tilvejebringe bakterier med resistens) sattes midlet ifølge den foreliggende opfindelse til dyrkningsmediet i mængder på 10 - 1.000 µg/ml, og MIC-værdierne opnåedes ved agarpladefortynding. Resultaterne er vist samlet i nedenstående tabel 3.

Tabel 3

Resistent bakteriestamme	Antibiotikum	Koncentration af middel ifølge opfindelsen (µg/ml)	Mindste vækstinhiberende koncentration (µg/ml) ikke tilsat**	tilsat*
Staphylococcus aureus				
PC-resistent	PC	1000	12,5	1,6
CP "	CP	100	25	6,3
TC "	TC	100	25	3,2
EM "	EM	1000	12,5	3,2
Streptococcus faecalis				
TC-resistent	TC	100	25	6,3
Escherichia coli				
SM-resistent	SM	1000	100	25
KM "	KM	1000	200	50
CP "	CP	100	50	12,5
TC "	TC	100	25	6,3
CER "	CER	10	25	12,5
Enterobacter aerogenes				
KM-resistent	KM	1000	100	12,5
Salmonella enteritidis				
CP-resistent	CP	100	12,5	3,2
TC "	TC	100	12,5	6,3
Klebsiella pneumoniae				
SM-resistent	SM	1000	100	25
CP "	CP	100	25	6,3
TC "	TC	100	25	12,5

Tabel 3 fortsat -

Resistent bakterie-stamme	Antibiotika (antibiotikum)	Koncentration af middel ifølge opfindelsen (µg/ml)	Mindste vækstinhiberende koncentration (µg/ml) ikke tilsat**	tilsat*
Shigella sonnei KM-resistent	KM	1000	50	12,5
Proteus mirabilis ABPC-resistent	ABPC	10	25	12,5
Pseudomonas aeruginosa CL-resistent	CL	1000	200	100

* Midlet ifølge den foreliggende opfindelse var tilsat dyrkningsmediet.

** Midlet ifølge den foreliggende opfindelse var ikke tilsat dyrkningsmediet

EKSEMPEL 2

En prøve vedrørende behandling af infektionssygdomme gennemførtes på 5 grupper hanmus tilhørende stammen ICR-JCL (hver mus vejede 22±1 g), idet hver gruppe bestod af 10 mus, under anvendelse af den i eksempel 1 tilvejebragte penicillin G-resistente stamme af Staphylococcus aureus. Den penicillin G-resistente stamme af Staphylococcus aureus, som var blevet dyrket i et Trypto-sojaagarmedium (Nippon Eiyo Kagaku Co. Ltd.) ved 37°C i 18 timer, suspenderedes i en Trypto-sojabouillon (Nippon Eiyo Kagaku Co. Ltd.) indeholdende 5% mucin, og 0,25 ml af denne suspension inokuleredes intraperitonealt i hver mus. Inokulatet reguleredes til 5 x 10^8 celler pr. mus. To timer efter inokuleringen indgaves penicillin G intraperitonealt i doser på henholdsvis 2,5 x 10^4 enheder/kg (legemsvægt af mus) og 5 x 10^4 enheder/kg, mens midlet ifølge den foreliggende opfindelse frembragt ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 også blev indgivet intraperitonealt i en dosis på 100 mg/kg (legemsvægt af mus). De således behandlede mus observeredes hver dag over en periode på 7 dage efter indgivelsen, og overlevelsestallet for de inokulerede mus bestemtes. Resultaterne er vist i figur 3. Disse resultater viser, at den forenede anvendelse af midlet ifølge den foreliggende opfindelse, det nitrogenholdige polysaccharid (NP), kan forbedre den helbredende virkning af penicillin G, idet de resistente bakteriers følsomhed in vivo over for penicillin G øges. - Kontrolgruppen blev hverken givet penicillin G eller middel ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 3

En tilsvarende prøve vedrørende behandling af infektionssygdomme gennemførtes på 5 grupper ICR-JCL hanmus (som hver vejede 22±1 g, og hver gruppe bestod af 10 mus) under anvendelse af tetracyclinresistent Escherichia coli og midlet ifølge den foreliggende opfindelse fremstillet ifølge eksempel 1. 1/4 ml Af en Trypto-sojabouillon suspension (se eksempel 2) indeholdende 5% mucin og den tetracyclinresistente bakterie frembragt som i eksempel 1 inokuleredes intraperitonealt i hver mus. Inokulatet indeholdt 5 x 10^8 celler pr. mus. To timer efter inokuleringen blev der oralt indgivet tetracyclin i doser på 80 mg/kg (muselegemsvægt) henholdsvis 160 mg/kg under samtidig oral indgivelse af midlet ifølge den foreliggende

opfindelse i en dosis på 100 mg/kg. Resultaterne er vist i figur 4 i form af overlevelsestallet i løbet af 7-dages perioden efter indgivelsen. Det fremgår, at den forenede brug af midlet ifølge den foreliggende opfindelse og tetracyclin giver en langt højere helbredelsesvirkning, end når tetracyclin anvendes alene. Eftersom der opnås meget nær samme effekt ved oral indgivelse af midlet ifølge den foreliggende opfindelse som ved intraperitoneal indgivelse, kan midlet ifølge den foreliggende opfindelse også karakteriseres ved en udvidet anvendelsesmåde ud over ved sin høje effektivitet. - Kontrolgruppen blev hverken givet tetracyclin eller midlet ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 4

Penicillin G-resistent Staphylococcus aureus inokuleredes i forholdet 5 x 10^8 celler/mus i 6 grupper (hver gruppe omfattende 10 mus) af ICR-JCL hanmus (22 ± 1) under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 2, efterfulgt af intraperitoneal indgivelse af 2,5 x 10^4 enheder/kg penicillin G og 1, 10, 100 henholdsvis 1.000 mg/kg af midlet ifølge den foreliggende opfindelse til 4 grupper (samme som blev anvendt i eksempel 1). Daglig observation af disse mus over en periode på 7 dage efter indgivelsen, gav de i figur 5 viste resultater. - Kontrolgruppen blev hverken givet penicillin G eller midlet ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 5

En tilsvarende prøve vedrørende behandling af infektionssygdomme gennemførtes under anvendelse af 6 grupper ICR-JCL hanmus, hvor hver gruppe bestod af 10 mus, der blev inokuleret med 5 x 10^8 celler tetracyclinresistent Escherichia coli pr. mus under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 3.

To timer efter inokuleringen blev der indgivet tetracyclin i en dosis på 80 mg/kg (muselegemsvægt) under samtidig oral indgivelse af det i eksempel 1 anvendte middel ifølge den foreliggende opfindelse i respektive doser på 0, 10, 100, 1.000 og 10.000 mg/kg, idet den 6. gruppe var en kontrolgruppe. Musene observeredes dagligt indtil 7. dagen, og de ved observationen opnåede resultater er vist i figur 6.

- Kontrolgruppen blev hverken givet tetracyclin eller midlet ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 6

CM-151-Stammen af Coriolus hirsutus (Fr.) Quel (Ferm. Res. Inst. Deponeringsnr. FERM-P 2711) dyrkedes som i eksempel 1 og ekstraheredes derefter og rensedes til opnåelse af 17,5 g pulveragtigt stof. Egenskaberne af dette stof bestemt ved metoderne i eksempel 1 var som følger:

(1) Grundstofanalyse: 43,7% carbon, 6,4% hydrogen og 5,5% nitrogen.

(2) Specifik drejningsevne: $[\alpha]_D^{25} = +30^o$

(3) Sukkersammensætning: 79% glucose, 15% mannose, 2% xylose, 4% galactose og spor af fucose.

(4) Proteinindhold: 33%

(5) Forhold mellem sukkerbindinger: (β/α) : 71/29

(6) Middelmolekylvægt: 95.000

(7) Sammensætning af proteindel: 15% asparaginsyre, 9% threonin, 5% serin, 14% glutaminsyre, 6% prolin, 9% glycin, 9% alanin, 7% valin, 1% methionin, 5% isoleucin, 6% leucin, 2% tryptophan, 4% phenylalanin, 2g lysin, 3% alginin, 2% ammoniak, 1% N-glucosamin og spor af cystin, tyrosin og histidin.

(8) Saccharid/protein-forhold:

Forholdet mellem sacchariddelen/proteindelen i stoffet var 67:33 bestemt ved NMR-spektroskopi.

Nedenstående forsøg gennemførtes derefter på midlet ifølge den foreliggende opfindelse med ovennævnte egenskaber.

Chloramphenicolresistent Salmonella enteritidis blev tilvejebragt som i eksempel 1.

1/4 ml Suspension af førnævnte chloramphenicolresistente bakterie i Trypto-soyabouillon (se eksempel 2) indeholdende 5% mucin inokuleredes intraperitonealt i hver mus i 5 grupper mus, hvor hver gruppe bestod af 10 mus. Inokulatet var på 1 x 10^8 celler/mus. 25 Timer efter inokuleringen blev der indgivet 50 mg/kg chloramphenicol intraperitonealt. 500 mg/kg Af midlet ifølge den foreliggende opfindelse blev endvidere indgivet oralt i en anden gruppe. Overlevelsestallet 5 dage efter indgivelsen var 40% i den gruppe, hvor chloramphenicol alene blev indgivet, mens det var 80% i den gruppe, hvor antibiotikumet blev givet i kombination med midlet ifølge den foreliggende opfindelse.

EKSEMPEL 7

Streptomycinresistente Klebsiella pneumoniae blev tilvejebragt ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1, og 0,25 ml af en Trypto-soyabouillon (se eksempel 2) indeholdende 5% mucin og disse bakterier inokuleredes intraperitonealt i hver mus i 2 grupper mus, hvor hver gruppe bestod af 10 mus, i et forhold på 1 x 10^8 celler pr. mus. Tre timer efter denne inokulering blev 100 mg/kg streptomycin indgivet intraperitonealt. En anden gruppe fik yderligere 120 mg/kg af midlet ifølge den foreliggende opfindelse, frembragt som beskrevet i eksempel 6, via intraperitoneal indgivelse. Overlevelsestallet 6 dage efter indgivelsen var 50% i den gruppe, hvor streptomycin benyttedes alene, men så højt som 80% i den gruppe, hvor midlet ifølge den foreliggende opfindelse benyttedes sammen med streptomycin.

EKSEMPEL 8

1/4 ml Af en suspension af colistinresistent Pseudomonas aeruginosa dyrket ved samme fremgangsmåde som i eksempel 1 i Trypto-soya-bouillon (se eksempel 2) indeholdende 5% mucin inokuleredes intraperitonealt i hver mus i 2 grupper ICR-JCL hanmus (legemsvægt: 22±1 g, 10 mus pr. gruppe) i forholdet 1 x 10^8 celler/mus. To timer efter inokuleringen indgaves 190 mg/kg (1µg = 30 enheder) colistin intraperitonealt. Midlet ifølge den foreliggende opfindelse frembragt ved samme fremgangsmåde som i eksempel 6 blev også indgivet oralt i en dosis på 1.500 mg/ kg. Overlevelsestallet 6 dage efter indgivelsen var 40% i gruppen, hvor colistin benyttedes alene, og 70% i den gruppe, hvor colistin benyttedes sammen med midlet ifølge den foreliggende opfindelse.

Patentkrav.

1. Middel til fremme af følsomheden over for antibiotika hos bakterier, der er blevet resistente herimod, kendetegnet ved, at det som aktiv bestanddel indeholder et nitrogenholdigt polysaccharid med en molekylvægt - bestemt ved ultracentrifugering - på fra 5.000 til 300.000, at polysaccharidet indeholder 42,0-46,0% carbon, 5,3-7,0% hydrogen og 0,5-8,0% nitrogen, at det har en specifik drejningsevne på fra 0 til $+50^{0}$, at det er letopløseligt i vand, men uopløseligt i acetone, pyridin, chloroform og hexan, at det i sit IR-absorptionsspektrum har karakterisktiske absorptioner ved 840 cm^{-1} og 890 cm^{-1}, og at forholdet mellem sacchariddelen og proteindelen ligger på fra 62:38 til 97:3 ifølge NMR-spektroskopi, samt at det fremstilles ved at ekstrahere mycelium af basidiomyceter hørende til slægten Coriolus af Polyporaceae med et vandigt opløsningsmiddel efterfulgt af i og for sig kendte oprensningsprocesser.

FIG. 1

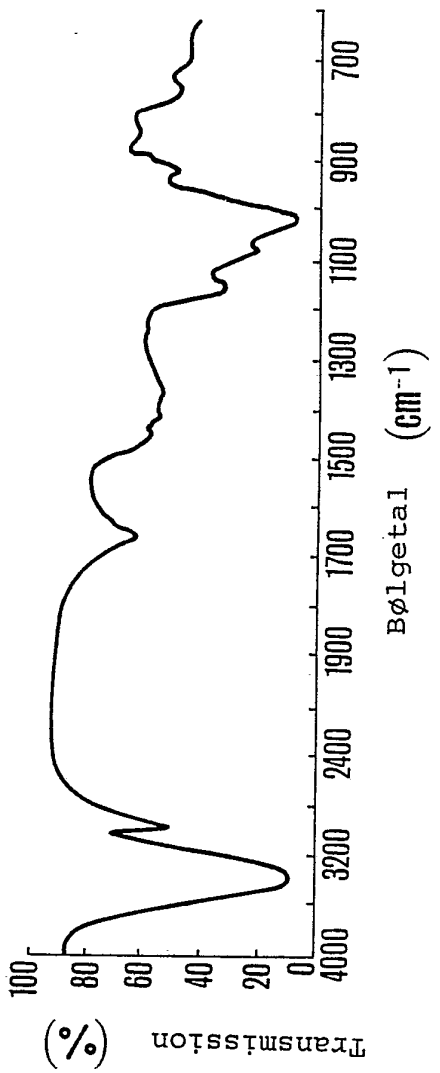

Transmission (%)
100
80
60
40
20
0
4000
3200
2400
1900
1700
1500
1300
1100
900
700
Bølgetal (cm⁻¹)

FIG.2

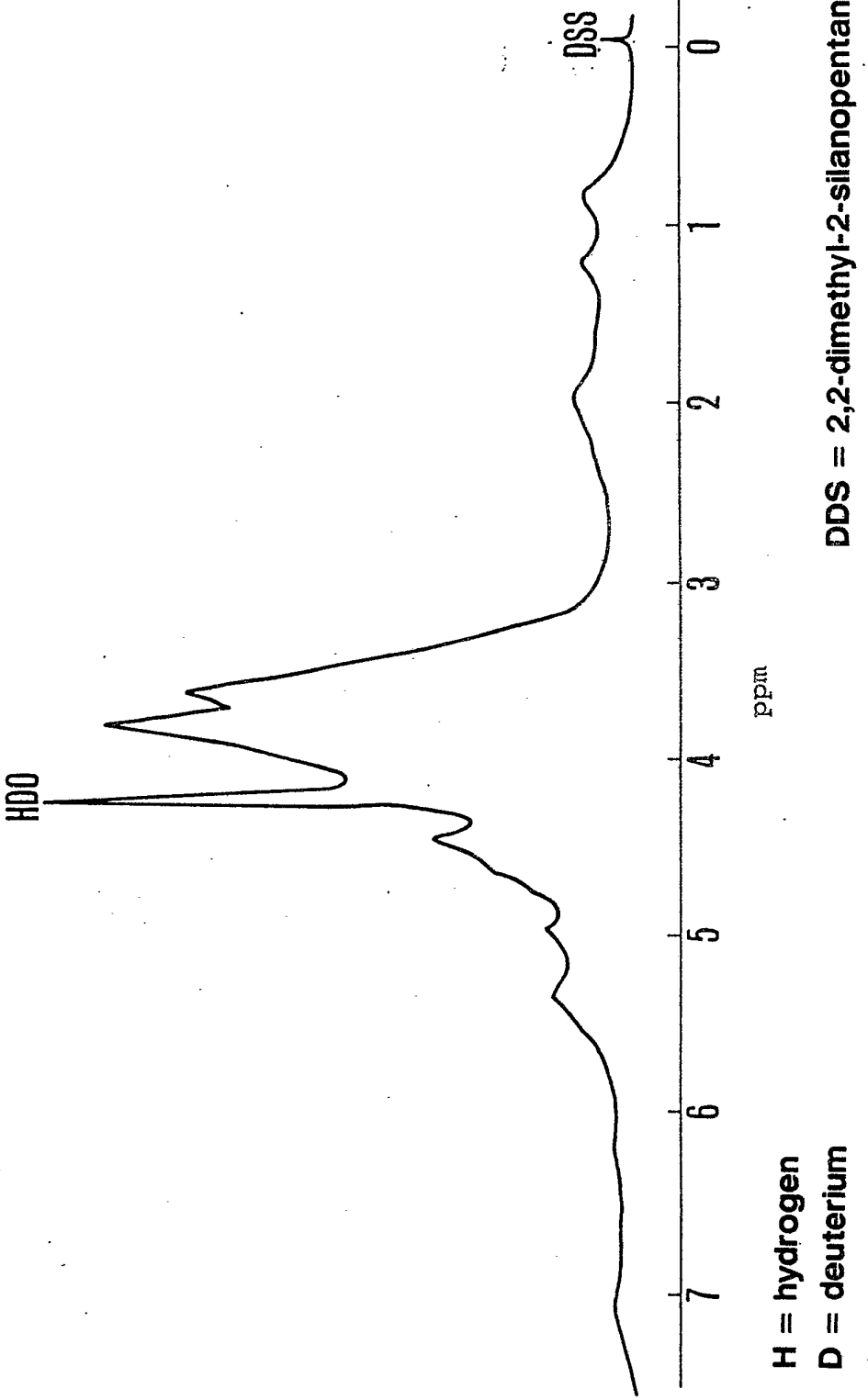

HDO
DSS
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
H = hydrogen
D = deuterium
O = oxygen
DDS = 2,2-dimethyl-2-silanopentan-5-sulfonat

FIG.3

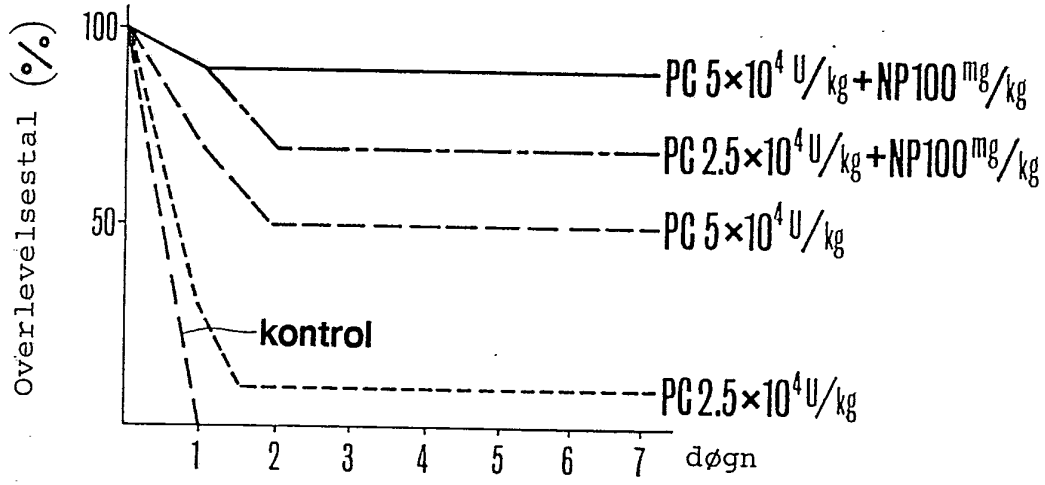

Overlevelsestal (%)
100
50
PC 5×10⁴ U/kg+NP100 mg/kg
PC 2.5×10⁴ U/kg+NP100 mg/kg
PC 5×10⁴ U/kg
kontrol
PC 2.5×10⁴ U/kg
1 2 3 4 5 6 7
døgn

FIG.4

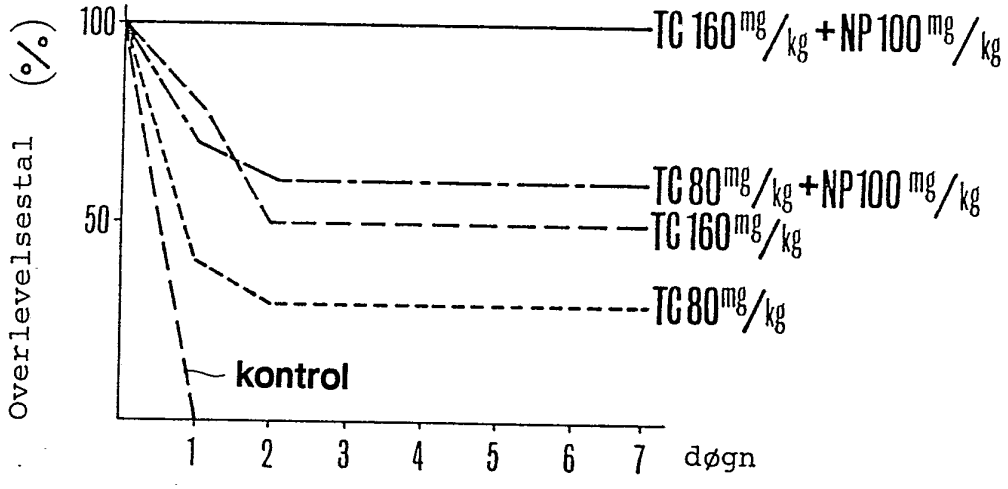

Overlevelsestal (%)
100
50
TC 160 mg/kg + NP 100 mg/kg
TC 80 mg/kg + NP 100 mg/kg
TC 160 mg/kg
TC 80 mg/kg
kontrol
1 2 3 4 5 6 7
døgn

FIG.5

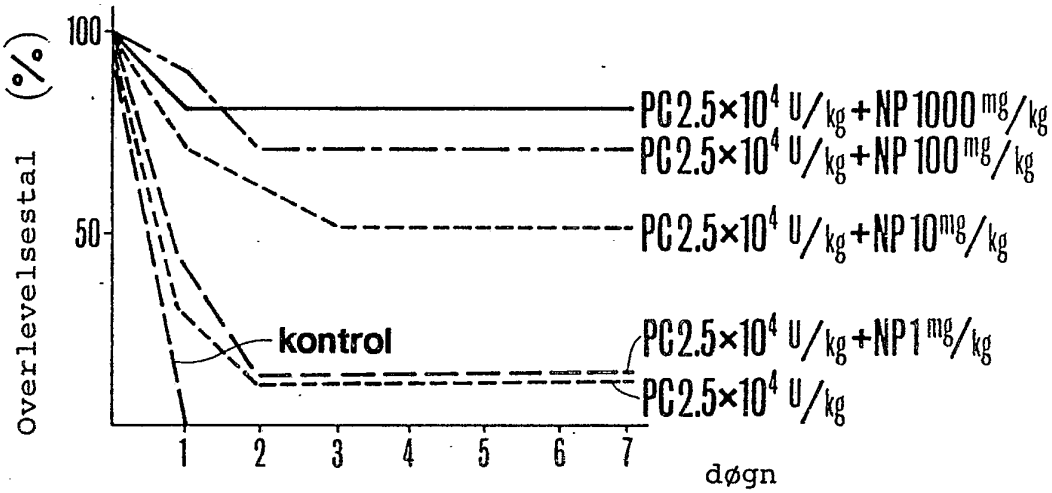
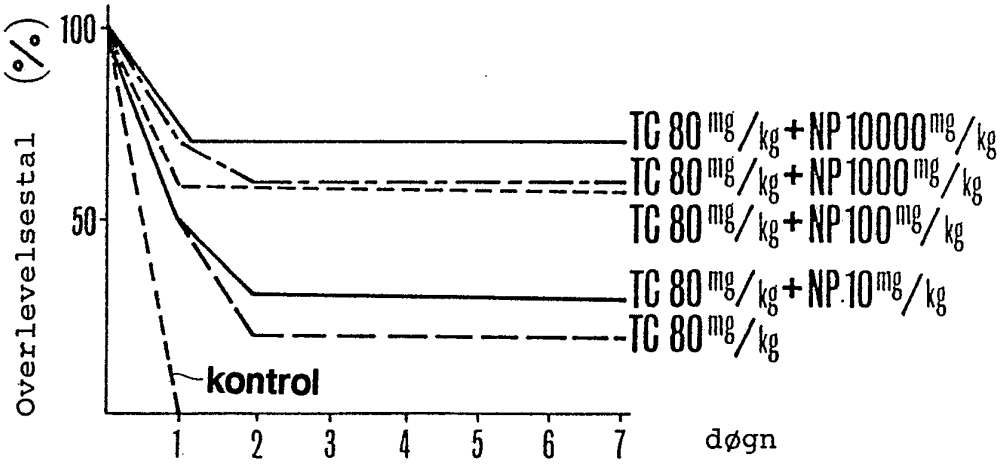

Overlevelsestal (%)
100
50
1
2
3
4
5
6
7
døgn
PC 2.5×10⁴ U/kg + NP 1000 mg/kg
PC 2.5×10⁴ U/kg + NP 100 mg/kg
PC 2.5×10⁴ U/kg + NP 10 mg/kg
PC 2.5×10⁴ U/kg + NP 1 mg/kg
PC 2.5×10⁴ U/kg
kontrol

FIG.6


Overlevelsestal (%)
100
50
1
2
3
4
5
6
7
døgn
TC 80 mg/kg + NP 10000 mg/kg
TC 80 mg/kg + NP 1000 mg/kg
TC 80 mg/kg + NP 100 mg/kg
TC 80 mg/kg + NP 10 mg/kg
TC 80 mg/kg
kontrol