(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102294019 A
(43)申请公布日 2011.12.28

(21)申请号 201110265011.9

(22)申请日 2011.09.07

(71)申请人 中国科学院昆明动物研究所
地址 650223 云南省昆明市五华区教场东路32号

(72)发明人 赖仞 张治业 李东升 刘蕊

(74)专利代理机构 昆明今威专利代理有限公司 53115
代理人 杨宏珍

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 15/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页
序列表 2 页 附图 2 页

(54)发明名称

金环蛇抗菌肽 cathelicidin － BF 的应用

(57)摘要

本发明属于生物医学技术领域，具体涉及金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 在制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。本发明的金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF，在体外对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有强杀菌作用、杀菌迅速的有益特点；cathelicidin-BF 对大肠杆菌感染的阴道炎的作用与其对金黄色葡萄球菌感染的阴道炎的结果基本相同，其对阴道内的金黄色葡萄球菌或者大肠杆菌明显抑制，cathelicidin-BF 具有明显的减轻炎症的作用；能够作为制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。

CN 102294019 A

1. 金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 的应用，其特征在于金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有明显抑制、快速杀菌以及明显减轻炎症的作用，能作为制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。

金环蛇抗菌肽 cathelicidin － BF 的应用

技术领域：

[0001] 本发明属于生物医学技术领域，具体涉及金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 在制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。

背景技术：

[0002] Cathelicidin 是一个具有多功能的抗菌肽家族，目前仅在哺乳类、鸟类和鱼类中有发现。Cathelicidin 具有广谱的抗菌活性，不仅对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、某些真菌以及病毒具有非常强的杀菌活性，而且对许多临床耐药细菌同样具有作用。除此之外，cathelicidin 还具有许多其他生物学活性，如对多种免疫细胞具有趋化作用、诱导肥大细胞脱粒和组织胺释放、调节巨噬细胞转录、促进伤口愈合、诱导血管发生、诱导变异细胞系细胞凋亡和淋巴细胞活化等。由于具有如此众多的活性，cathelicidin 一直是国际上研究的热点。针对 cathelicidin 的药用开发则蕴含着巨大的临床治疗药物制备价值。

[0003] 随着青霉素等传统抗生素的大规模和不恰当使用，微生物对传统抗生素产生了越来越强的耐受性，在临床上已经出现了大量能够完全耐受青霉素等传统抗生素的微生物，已有的抗生素对这些病原微生物无能为力。抗菌肽是一种新型的抗微生物多肽，大多数抗菌肽分子量小于 10000Da，带正电，富含疏水碱基，能够形成两亲性的结构。抗菌肽的杀菌机制主要是通过静电相互作用吸引并结合到带负电的细菌细胞膜表面，进一步在细菌细胞膜上形成跨膜的孔洞，导致细菌细胞内容物的外泄，从而导致细菌细胞的死亡。而传统抗生素主要是作用于细菌细胞内的一些酶类。正是由于作用方式的不同，抗菌肽介导的杀菌作用远远快于传统抗生素，并且不易使细菌产生耐受性。除此之外，越来越多的文献报道表明抗菌肽还具有其他的杀菌机制，如抑制细菌细胞壁合成、改变细菌细胞质膜抑制隔膜形成、激活自溶素、抑制细胞内酶活性、抑制 DNA、RNA 和蛋白质的合成等。

[0004] 目前，国外有许多公司正在进行抗菌肽的研究开发，已有多种抗菌肽进入临床试验阶段。如来源于人 lactoferrin 的 hLF-1-1 用于治疗骨髓干细胞移植相关的感染，已进入临床 II 期。来源于非洲爪蟾 magainin 的 MSI-78 对糖尿病患者的足部溃疡有显著疗效且副作用小，已进入临床 III 期试验阶段。来源于猪 protegrin 的 IB-367 用于治疗肿瘤患者口腔溃疡，已进入临床 I 期试验。除此之外，一些用于伤口愈合，内毒素感染， 肿瘤，病毒感染的抗菌肽也已进入临床试验阶段。

[0005] 在中国的传统中药和民族医药中，许多蛇类被作为药材而得到广泛的应用，如乌稍蛇，蟒蛇，蝮蛇，金环蛇，银环蛇，眼镜蛇，五步蛇等。蛇全身均可入药，蛇肉具有强壮神经、延年益寿功效，可治疗病后体弱、风痹麻木、关节疼痛等症。蛇胆具有祛风、清热、化痰、明目的功效，主治小儿疳积、痔疮肿痛。蛇胆汁乙醇溶液能有效治疗角膜炎、角膜溃疡、角膜斑翳。以蛇胆汁、川贝母、杏仁为主要原料制成的“蛇胆川贝液”，是目前临床使用方便、疗效显著的止咳祛痰良药，蛇蜕具有祛风定惊、杀虫、退翳消肿、清热解毒的功能，可治目翳、疮疖、痔漏、痄腮、疟疾、小儿惊痫、疥癣、瘰疬等症。蛇毒是目前国际药材市场上十分昂贵的珍奇药材，利用蝮蛇毒制成的注射液，具有明显的抗癌、抗血凝作用。

[0006] 与此同时，传统中药药物成分的复杂性及其炮制方法的局限性造成药物活性成分不能更好的发挥作用，因而从这些传统药物中寻找特定的活性单体化合物是中药现代化的重要内容之一。迄今为止，国内外学者已经从蛇毒中分离出大量生物活性蛋白及多肽，其中的许多活性多肽具有很好的药物开发前景。

[0007] 金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 是由发明者从金环蛇毒液发现的由 30 个氨基酸组成的的抗微生物肽，含有三十个氨基酸残基，分子量为 3637.54Da，等电点 11.79。金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 全序列为 :赖氨酸－苯丙氨酸－苯丙氨酸－精氨酸－赖氨酸－亮氨酸－赖氨酸－赖氨酸－丝氨酸－缬氨酸－赖氨酸－赖氨酸－精氨酸－丙氨酸－赖氨酸－谷氨酸－苯丙氨酸－苯丙氨酸－赖氨酸－赖氨酸－脯氨酸－精氨酸－缬氨酸－异亮氨酸－甘氨酸－缬氨酸－丝氨酸－异亮氨酸－脯氨酸－苯丙氨酸，具有显著的抗菌活性，并且溶血活性和细胞毒性都很低（见文献Wang Y,Hong J,Liu X,Yang H,Liu R,Wu J,Wang A,Lin D,Lai R.Snake cathel icidin from Bungarus fasciatusis a potent peptide antibiotics. PLoS One.2008 ;3(9) :e3217）。

[0008] 发明人将金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 作为制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用，未发现有任何相同应用。

发明内容 :

[0009] 本发明的目的在于提供一种金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 在制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。

[0010] 为了实现本发明的目的，本发明提供了如下技术方案 :

[0011] 考察两种常见细菌性阴道炎病原菌（金黄色葡萄球菌和大肠杆菌）对 cathelicidin -BF 的敏感性

[0012] 采用琼脂平板稀释法测定 cathelicidin-BF 对细菌的最小抑制浓度 (MIC)。取无菌试管 (10ml)12 支，排成一排。每管加入无菌水 1ml，在第 1 管加入药物原液 (1280μg/ml)1ml 混匀，然后吸取 1ml 至第 2 管，混匀后再吸取 1ml 至第 3 管，如此连续倍比稀释至第 12 管，每稀释前充分混匀。此时各管药物浓度依次为 640、320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313μg/ml。然后将各浓度的溶液加至平皿中，1ml/ 皿，再加入 9ml 的 MH 琼脂培养基，边加边摇，使之充分混匀。此时各平皿药物浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313μg/ml。同时，设空白对照和阴性对照。将制备好的接种物，加入 96 孔板，250μl/ 孔，用点样器接种。将接种好的平皿倒置，37℃普通空气孵箱中孵育 16h。检查空白对照的细菌生长情况是否良好，以肉眼观察，药物最低浓度组无细菌生长者，即为受试菌的 MIC。

[0013] 考察体外杀菌速度

[0014] 采用 4 倍于 MIC 的药物浓度，将制备好的 1 ～ 2×10^6CFU/ml 的菌悬液与药物混合，使其浓度为 10^5CFU/ml 左右。在 0、1、2、4、6、8、10、12 和 24h 时，吸取培养物，进行系列稀释，活菌计数，每个稀释度做三个平行实验，求平均值。最后以细菌浓度对数为纵坐标，培养时间为横坐标，绘制杀菌曲线。

[0015] 考察对大鼠细菌性阴道炎的治疗作用

[0016] 细菌性阴道炎模型的建立

[0017] 首先用无菌较硬的棉拭子反复涂擦大鼠阴道内壁 15 次，使阴道粘膜机械性损伤，致使棉拭子粘有少许血性粘液为度，然后向大鼠阴道注入大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的菌液（约 10^9CFU/ml），注射菌液量为 50μl/200g，注入部位距阴道口 5mm，每日接种一次，共接种 7 次，每日观察大鼠阴道粘膜，在接种首日后的第 9 天取阴道分泌物进行镜检和细菌培养，并作菌株鉴定。病原体检查为阳性，且肉眼观察阴道粘膜均发生充血、水肿、出血或浸润者为感染成功。将感染成功的大鼠随机分组治疗。

[0018] 动物的分组与给药

[0019] 将成功感染的 SD 大鼠随机分成 5 组，10 只 / 组。治疗细菌性阴道炎模型的组别分别为高 (0.8mg/kg)、中 (0.4mg/kg)、低 (0.2mg/kg) 剂量组、阳性对照（环丙沙星 0.5mg/kg) 和模型组（给予同样体积的生理盐水）。各组大鼠每日阴道给药一次，将 BF-30 用生理盐水配成不同浓度的溶液，用 200μl 的注射器由外阴道内 5mm 处注入 50μl 不同浓度的 cathelicidin-BF、阳性对照组和模型组分别给予同等体积的环丙沙星和生理盐水。

[0020] 组织菌落计数和组织切片

[0021] 连续给药 7 天，停药后取大鼠阴道分泌物进行检查，观察阴道粘膜病变情况及病原体存活情况。用 2 支无菌棉签棒伸入大鼠阴道 0.5cm 转动，放置 3ml 无菌生理盐水中浸泡，混匀后，进行菌落数计算。于给药 7 天后处死大鼠，解剖，取阴道约 1cm，放置 10％的甲醛中固定。常规固定，HE 染色，然后进行光镜组织学观察。

[0022] 本发明的有益效果在于：

[0023] 化学合成金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF，在体外对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有强杀菌作用、杀菌迅速的有益特点。cathelicidin-BF 对大肠杆菌感染的阴道炎的作用与其对金黄色葡萄球菌感染的阴道炎的结果基本相同，其对阴道内的金黄色葡萄球菌或者大肠杆菌明显抑制，cathelicidin-BF 具有明显的减轻炎症的作用，能够作为制备治疗细菌性阴道炎药物中的应用。

附图说明：

[0024] 图 1 为 cathelicidin-BF 对金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 的杀菌曲线 (MIC ＝ 16μg/ml)。

[0025] 图 2 为 cathelicidin-BF 对大肠杆菌 (ATCC25922) 的杀菌曲线 (MIC ＝ 2μg/ml)。

具体实施方式：

[0026] 下面用实施例来进一步说明本发明的实质性内容，但本发明的内容并不局限于此。

[0027] 一、考察两种常见细菌性阴道炎病原菌（金黄色葡萄球菌和大肠杆菌）对 cathelicidin-BF 的敏感性

[0028] 1. 材料

[0029] 1.1 菌株：临床分离的细菌性阴道炎感染者的金黄色葡萄球菌 (11 株）和大肠杆菌 (10 株）。

[0030] 1.2 培养基营养琼脂、肉汤、Mueller-Hinton(MH) 琼脂培养基（细菌）、沙堡琼脂培养基。

[0031] 1.3 药物：化学合成金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF、杆菌肽、环丙沙星、氨苄青霉素和阿奇霉素等。

[0032] 2 考察耐药菌对 cathelicidin-BF 的敏感性

[0033] 2.1 采用琼脂平板稀释法测定 cathelicidin-BF 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC。取无菌试管 (10ml)12 支，排成一排。每管加入无菌水 1ml，在第 1 管加入药物原液 (1280μg/ml)1ml 混匀，然后吸取 1ml 至第 2 管，混匀后再吸取 1ml 至第 3 管，如此连续倍比稀释至第 12 管，每稀释前充分混匀。此时各管药物浓度依次为 640、320、160、80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313μg/ml。然后将各浓度的溶液加至平皿中，1ml/ 皿，再加入 9ml 的 MH 琼脂培养基，边加边摇，使之充分混匀。此时各平皿药物浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313μg/ml。同时，设空白对照和阴性对照。将制备好的接种物，加入 96 孔板，250μl/ 孔，用点样器接种。将接种好的平皿倒置，37℃普通空气孵箱中孵育 16h。检查空白对照的细菌生长情况是否良好，以肉眼观察，药物最低浓度组无细菌生长者，即为受试菌的 MIC。结果如表 1 所示。

[0034] 表 1 cathelicidin-BF 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性

[0035]

菌株	编号	MIC(μg/ml)			
		cathelicidin—BF	杆菌肽	环丙沙星	氨苄青霉素
大肠杆菌	1	2	>1024	4	>256
	2	8	>1024	2	>256
	3	4	>1024	2	>256
	4	4	>1024	16	>256
	5	2	>1024	16	>256
	6	4	>1024	>256	>256
	7	4	128	>256	>256
	8	16	>1024	>256	>256
	9	2	>1024	>256	>256
	10	4	>1024	2	>256
金黄色葡萄球菌	1	32	>1024	>256	>256
	2	16	>1024	>256	>256
	3	16	>1024	>256	>256
	4	16	>1024	>256	>256
	5	16	>1024	16	64
	6	16	>1024	>256	>256
	7	32	>1024	64	128
	8	16	>1024	128	>256
	9	16	>1024	>256	>256
	10	32	>1024	256	>256
	11	16	>1024	8	128

[0036] 注：ND 表示没有活性

[0037] 由表 1 知，cathelicidin-BF 对多数试验菌株都具有较强的抗菌活性，尤其是对大

肠杆菌都具有强的杀菌作用。

[0038] 二、考察体外杀菌速度

[0039] 采用 4 倍于 MIC 的药物浓度，将制备好的 1 ～ 2×10^6CFU/ml 的菌悬液与药物混合，使其浓度为 10^5CFU/ml 左右。在 0、1、2、4、6、8、10、12 和 24h 时，吸取培养物，进行系列稀释，活菌计数，每个稀释度做三个平行实验，求平均值。最后以细菌浓度对数为纵坐标，培养时间为横坐标，绘制杀菌曲线。

[0040] 结果如图 1 和图 2 所示。由图 1 和图 2 知，cathelicidin-BF 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都具有快速的杀菌活性，尤其是对金黄色葡萄球菌都具有快速的杀菌作用，在 4 个小时内能够全部杀灭金黄色葡萄球菌。

[0041] 三、考察对大鼠细菌性阴道炎的治疗作用

[0042] 1、实验方法

[0043] 1.1 细菌性阴道炎模型的建立

[0044] 首先用无菌较硬的棉拭子反复涂擦大鼠阴道内壁 15 次，使阴道粘膜机械性损伤，致使棉拭子粘有少许血性粘液为度，然后向大鼠阴道注入大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的菌液（约 10^9CFU/ml），注射菌液量为 50μl/200g，注入部位距阴道口 5mm，每日接种一次，共接种 7 次，每日观察大鼠阴道粘膜，在接种首日后的第 9 天取阴道分泌物进行镜检和细菌培养，并作菌株鉴定。病原体检查为阳性，且肉眼观察阴道粘膜均发生充血、水肿、出血或浸润者为感染成功。将感染成功的大鼠随机分组治疗。

[0045] 1.2 动物的分组与给药

[0046] 将成功感染的 SD 大鼠随机分成 5 组，10 只 / 组。治疗细菌性阴道炎模型的组别分别为高 (0.8mg/kg)、中 (0.4mg/kg)、低 (0.2mg/kg) 剂量组、阳性对照（环丙沙星 0.5mg/kg）和模型组（给予同样体积的生理盐水）。各组大鼠每日阴道给药一次，将 cathelicidin-BF 用生理盐水配成不同浓度的溶液，用 200μl 的注射器由外阴道内 5mm 处注入 50μl 不同浓度的 cathelicidin-BF，阳性对照组和模型组分别给予同等体积的环丙沙星和生理盐水。

[0047] 1.3 组织菌落计数和组织切片

[0048] 连续给药 7 天，停药后取大鼠阴道分泌物进行检查，观察阴道粘膜病变情况及病原体存活情况。用 2 支无菌棉签棒伸入大鼠阴道 0.5cm 转动，放置 3ml 无菌生理盐水中浸泡，混匀后，进行菌落数计算。于给药 7 天后处死大鼠，解剖，取阴道约 1cm，放置 10％的甲醛中固定。常规固定，HE 染色，然后进行光镜组织学观察。

[0049] 结果如下：

[0050] 细菌菌落计数

[0051] 与模型组（每天只给生理盐水）相比，每天给药 0.4mg/kg 和 0.8mg/kg 的 cathelicidin-BF 均能够使大鼠阴道内金黄色葡萄球菌的浓度显著降低，能够从 10^7 降低到 10^3CFU/ml，并且呈现出很好的剂量依赖性。低剂量组 (0.2mg/kg) 几乎对金黄色葡萄球菌没有抑制作用，中剂量和高剂量的 cathelicidin-BF 的抑菌活性相当，并且其作用效果明显比环丙沙星好。

[0052] 金环蛇抗菌肽 cathelicidin-BF 对大肠杆菌感染的阴道炎的作用与其对金黄色葡萄球菌感染的阴道炎的结果基本相同，其对阴道内的大肠杆菌的抑制作用也有明显的剂量依赖性，剂量为 0.8mg/kg 时，抑菌效果最好，能够使阴道内的细菌浓度从 10^6 降低到

10^4CFU/ml，中剂量的抑菌作用仅次于高剂量，低剂量作用较弱。

[0053] 金黄色葡萄球菌感染的阴道组织切片观察

[0054] 正常组：

[0055] 阴道黏膜表被复层鳞状上皮，上皮细胞无变性、坏死，表皮无糜烂、溃疡，上皮下组织无充血、水肿，无炎细胞浸润。

[0056] 模型组：

[0057] 阴道黏膜组织学结构与正常组相同，表被复层鳞状上皮，上皮细胞无变性、坏死，无糜烂、溃疡。黏膜上皮下组织无明显充血、水肿，但有浅层有轻度或中度炎细胞浸润，炎细胞类型主要为单核巨噬细胞，少数为中性粒细胞。黏膜下组织无明显病变。

[0058] cathelicidin-BF 高剂量组：

[0059] 阴道黏膜组织学结构与正常组相同，表被复层鳞状上皮，表面轻度角化（正常周期性改变），上皮细胞无变性、坏死，无糜烂、溃疡。1 只黏膜上皮下浅层组织有轻度炎细胞浸润，类型同模型组。黏膜下组织无明显病变。

[0060] cathelicidin-BF 中剂量组：

[0061] 阴道黏膜组织学结构与正常组相同，黏膜上皮及黏膜下组织无明显病变。

[0062] cathelicidin-BF 低剂量组：

[0063] 阴道黏膜组织学结构与正常组相同，2 只黏膜上皮下浅层组织有少量炎细胞浸润，类型与上相同，其中 1 只黏膜下组织伴有轻度充血。

[0064] 以上结果表明：本实验中大鼠细菌性阴道炎的病变，主要表现为黏膜上皮下浅层组织内有以单核巨噬细胞为主的炎细胞浸润，粘膜上皮细胞无变性、坏死。

[0065] cathelicidin-BF 对大肠杆菌感染的阴道炎的作用与其对金黄色葡萄球菌感染的阴道炎的结果基本相同，其对阴道内的金黄色葡萄球菌或者大肠杆菌明显抑制，cathelicidin-BF 具有明显的减轻炎症的作用。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院昆明动物研究所

<120> 金环蛇抗菌肽 cathelicidin — BF 的应用

<130> 1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 750
<212> DNA
<213> Bungarus fasciatus

<400> 1
atggaagggt tcttctggaa gaccttgctg gtggttggag ctcttgccat tgctgggacc 60

tcctcacttc cacacaaacc cctgatctat gaagaggctg tggaccttgc agtgagcatc 120

tacaacagca aatctgggga agactctctc taccgtctcc tggaggctgt ttctccaccc 180

aagtgggatc ctctttctga aagcaaccaa gagctgaact tcaccatgaa ggagacggtg 240

tgcctggtgg ccgaagaacg atccttggag gaatgcgact tccaggaaga cggggtcgtc 300

atgggatgca caggctacta tttcttcggg gagtcgcccc cggtggtcgt tctcacctgc 360

aagcctgtgg gtgaagaagg ggagcagaag caggaggagg ggaacgagga ggagaaggaa 420

gtggaggagg aggaacagga ggaagacgag aaggatcagc ccaggagggt caagagattc 480

aagaaatttt tcaggaagct gaagaagagc gtgaagaaac gtgccaagga attcttcaag 540

aagccgaggg tcatcggggt ctccatcccc ttctaagaga ggggctcaga aggacctgcg 600

gcctccgctc tccgatccca ggaaaaccgg cagagaagac gatgcgggat gctccagtcc 660

gtcaaatcat ttcccaatag gatgctccgc cattcaatcc atgaataaat aaatatatac 720

ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 750

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Bungarus fasciatus

<400> 2

Lys Phe Phe Arg Lys Leu Lys Lys Ser Val Lys Lys Arg Ala Lys Glu
1 5 10 15

Phe Phe Lys Lys Pro Arg Val Ile Gly Val Ser Ile Pro Phe
20 25 30

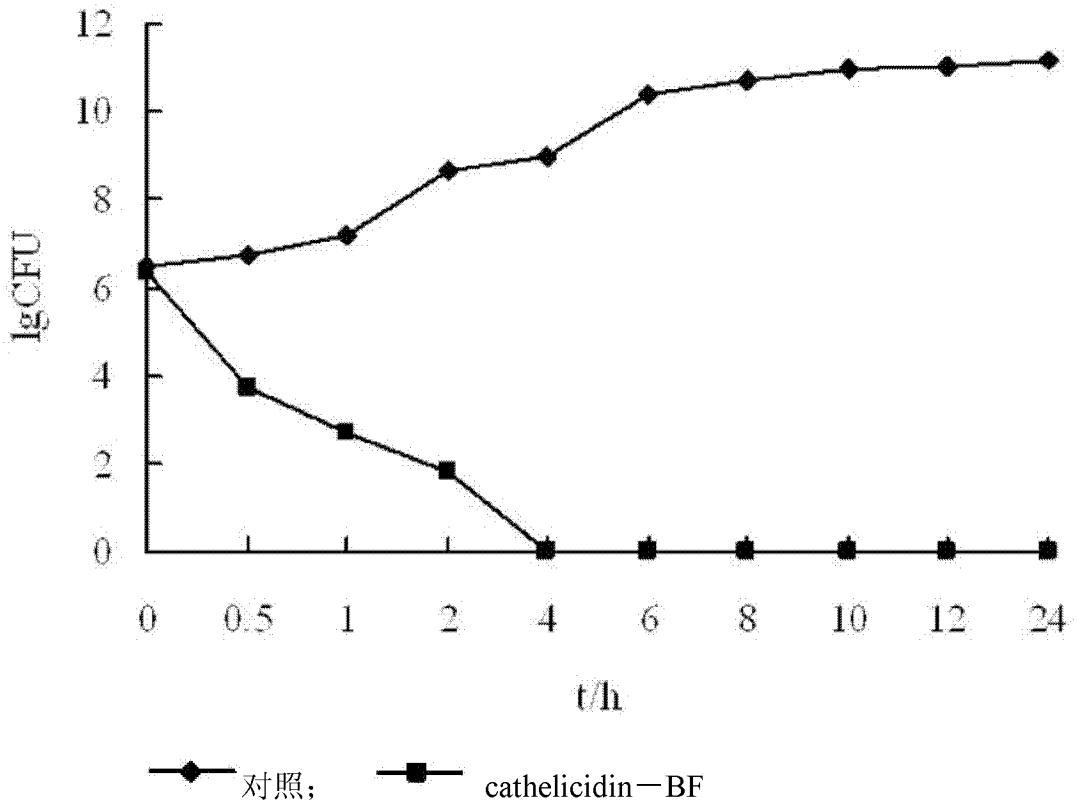


图 1

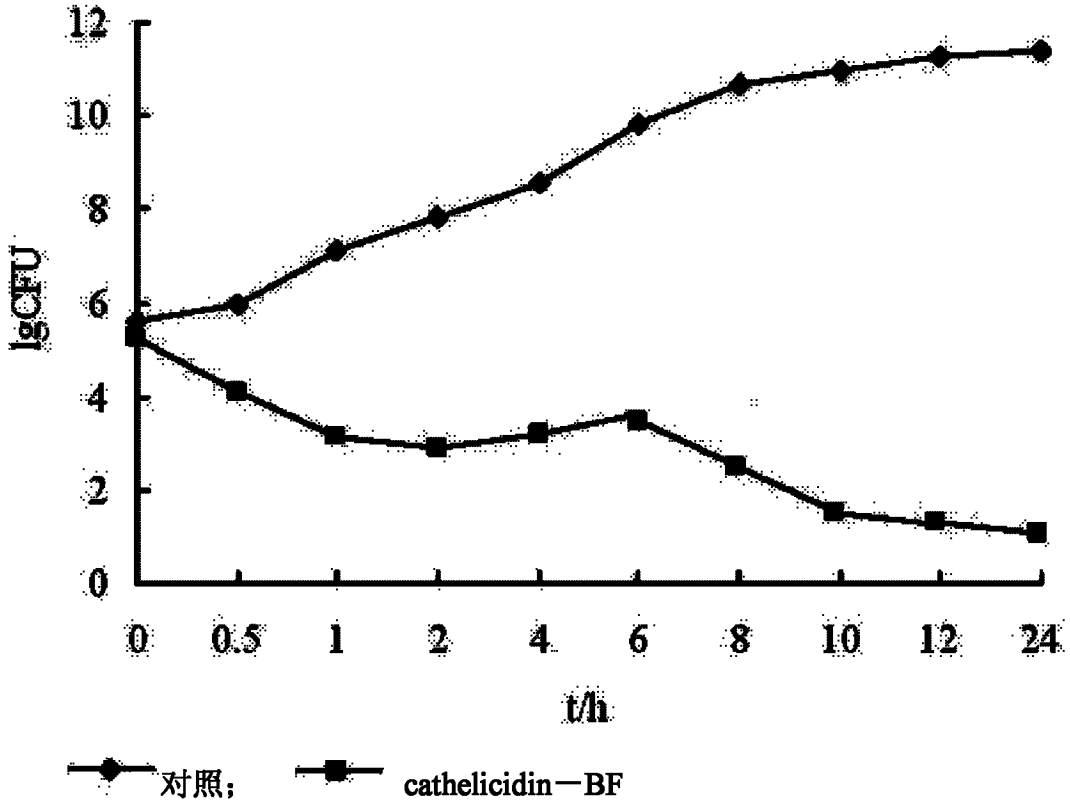


图 2