



(10) 授权公告号 CN 117138024 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 21

(21) 申请号 202311047826.9
(22) 申请日 2023.08.18
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117138024 A

(43) 申请公布日 2023.12.01
(73) 专利权人 苏州大学
地址 215000 江苏省苏州市吴江区久泳西路1号

(72) 发明人 王义鹏 王慷 石文状 薛贝茹
(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理
事务所(普通合伙) 32257
专利代理师 杨慧林

(51) Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

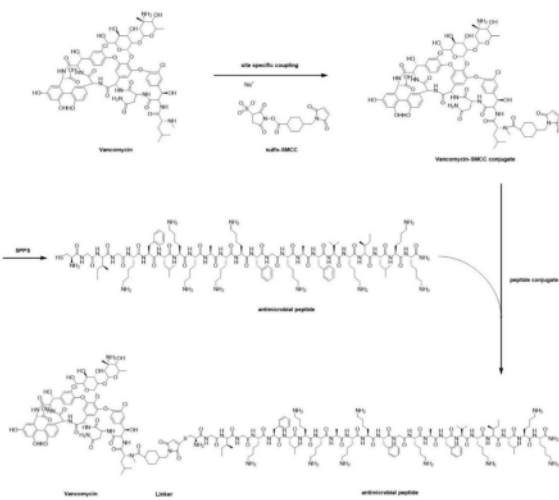
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2022236009 A2, 2022.11.10
US 2022193244 A1, 2022.06.23
审查员 印丽娟

权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称
一种万古霉素-抗菌肽偶合物及其应用

(57) 摘要
本发明涉及一种万古霉素-抗菌肽偶合物及其应用,在对抗菌肽M2的N端添加一个半胱氨酸进行修饰后,通过双功能蛋白质交联剂sulfo-SMCC,将万古霉素和抗菌肽改造体通过两步反应进行偶联。万古霉素-抗菌肽偶合物与万古霉素,抗菌肽M2,以及万古霉素和抗菌肽M2混合物相比抗菌活性显著提高,克服了革兰氏阳性菌对万古霉素的耐药性,对部分革兰氏阴性菌也产生抗菌活性,增大了万古霉素的抗菌谱,同时还具有更强的抗生物被膜能力,能够杀灭滞留菌,抑制细菌群集运动,还能与抗生素形成协同作用共同杀菌。



1. 一种万古霉素-抗菌肽偶合物, 其特征在于: 所述万古霉素-抗菌肽偶合物由万古霉素和氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的抗菌肽共价交联得到, 所述抗菌肽的N末端修饰有半胱氨酸, 所述共价交联由双功能蛋白质交联剂Sulfo-SMCC实现。

2. 权利要求1所述的万古霉素-抗菌肽偶合物在制备抗菌剂中的应用, 所述抗菌剂用于抑制革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌;

所述革兰氏阳性细菌为金黄色葡萄球菌ATCC29213、粪肠球菌ATCC29212、产气荚膜梭菌ATCC13124、蜡样芽孢杆菌CMCC63301;

所述革兰氏阴性细菌为大肠杆菌ATCC25922、大肠杆菌CMCC44102、鲍曼不动杆菌ATCC19606、和福氏志贺氏菌ATCC12022。

3. 一种权利要求1所述的万古霉素-抗菌肽偶合物在抑制细菌生物被膜形成中的应用。

4. 一种抗菌药物组合物, 其特征在于: 所述抗菌药物组合物包括权利要求1所述的万古霉素-抗菌肽偶合物和抗生素, 所述抗生素选自多粘菌素B、环丙沙星和庆大霉素中的一种。

一种万古霉素-抗菌肽偶合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种万古霉素-抗菌肽偶合物及其应用。

背景技术

[0002] 自抗生素被发现以来,其在抗菌抗感染领域一直发挥着最重要的作用,但近年来,随着传统抗生素在医疗和畜牧业中的滥用,越来越多的耐药细菌不断出现,世界已进入后抗生素时代,微生物耐药性已经成为严重威胁人类生命健康的一大挑战,

[0003] 据报道,目前细菌感染已经成为全球人类因病致死的第二大病因,其中以耐药金葡,大肠杆菌,铜绿假单胞菌,肺炎克雷伯菌等耐药菌引起的感染更是威胁人类生命健康的重中之重。目前,全球每年有超过100万人死于耐药菌感染,据世界卫生组织预测,到2050年,这个数字将攀升到1000万人。所以,在后抗生素时代,寻求新的更加有效的针对耐药菌的药物已经迫在眉睫。

[0004] 万古霉素自1952年被发现以来,广泛应用于严重的耐药金葡萄菌等革兰氏阳性菌的感染,万古霉素主要通过与其细胞壁肽聚糖前体脂肽的2个D-丙氨酸序列结合,抑制细胞壁合成导致细菌死亡,但连续的滥用导致了众多万古霉素耐药菌的产生,主要的耐药机制是万古霉素的结合靶点D-丙氨酸被D-乳酸和D-丝氨酸取代,增加了万古霉素与靶点结合的空间位阻,降低了万古霉素与靶点的结合亲和力,细菌细胞膜通透性降低也导致了细菌对万古霉素的耐药性。

[0005] 抗菌肽是一种主要来源于自然界的动物、植物和微生物的天然活性多肽,由10-50个氨基酸通过酰胺键连接形成的短肽,主要通过破坏细菌细胞膜结构和与部分胞内靶点结合,抑制DNA,蛋白质的合成而起到杀菌作用。总结起来,抗菌肽具有:来源广泛,易于获取,抗菌活性强且广谱,机制独特,不易引起耐药性,结构简单,易于改造这几个优势。此外,抗菌肽还具有一定的免疫调节活性。目前,已有30多种抗菌肽处于临床研究阶段,其中,M2是一种来源于蛙类抗菌肽的衍生肽,应用于牛皮癣、糖尿病足等皮肤感染性疾病治疗。此外,它对病毒和肿瘤细胞也显示出较好的杀伤作用。综上所述,在后抗生素时代,抗菌肽已经成为最有希望替代传统抗生素的抗菌抗感染类药物。

[0006] 目前已经有研究者关注到抗菌肽可能成为解决细菌耐药性问题的突破口,而其中最常采用的是抗生素和抗菌肽联用的方法。这种联用方式只能使抗生素和抗菌肽的作用效果实现简单的叠加,而不能真正细菌对抗生素产生耐药性的问题。因此亟待出现一种方法,能最大程度上使抗菌肽和抗生素在杀菌过程中共同发挥作用。

发明内容

[0007] 为了解决抗生素和抗菌肽的联用效果不理想这一问题,以及为了使抗生素和抗菌肽最大程度上共同发挥作用,本发明提供了一种万古霉素-抗菌肽偶合物。

[0008] 本发明的第一个目的是提供一种万古霉素-抗菌肽偶合物,所述万古霉素-抗菌肽偶合物由万古霉素和氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的抗菌肽通过交联剂共价交联得

到。

[0009] 进一步地,所述抗菌肽的末端修饰有半胱氨酸。

[0010] 进一步地,所述抗菌肽的末端赖氨酸经过酰基化修饰。

[0011] 进一步地,所述抗菌肽改造体中所有氨基酸都是L型氨基酸。

[0012] 进一步地,所述共价交联由双功能蛋白质交联剂Sulfo-SMCC实现。

[0013] 进一步地,所述抗菌肽改造体的制备方法包括以下步骤:根据上述抗菌肽改造体的氨基酸序列,采用固相合成技术进行化学合成,使用制备型反向高效液相色谱进行纯化,使用高分辨率质谱进行分子量鉴定。

[0014] 进一步地,将万古霉素与双功能蛋白质交联剂sulfo-SMCC通过酰胺键偶联,得到万古霉素改造体Vm-SMCC,分子量为1667.55Da。

[0015] 进一步地,所述万古霉素改造体Vm-SMCC的制备方法包括以下步骤:使用制备型反向高效液相色谱进行纯化,使用高分辨率质谱进行分子量鉴定。

[0016] 进一步地,将所述抗菌肽和所述万古霉素改造体Vm-SMCC偶联,得到所述万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2。

[0017] 进一步地,所述万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的制备方法包括以下步骤:使用制备型反向高效液相色谱进行纯化,使用高分辨率质谱进行分子量鉴定。

[0018] 本发明的第二个目的是提供万古霉素-抗菌肽偶合物在制备抗菌剂中的应用。

[0019] 进一步地,所述抗菌剂用于抑制革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌。

[0020] 进一步地,所述革兰氏阳性细菌包括但不限于金黄色葡萄球菌(如金黄色葡萄球菌CMCC26003、金黄色葡萄球菌ATCC29213、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌ATCC43300、金黄色葡萄球菌15772、金黄色葡萄球菌15192、耐万古霉素金黄色葡萄球菌52和耐万古霉素金黄色葡萄球菌11)、粪肠球菌(如耐万古霉素粪肠球菌ATCC29212和粪肠球菌2)、产气荚膜梭菌和蜡样芽孢杆菌。

[0021] 进一步地,所述革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌(如大肠杆菌ATCC25922和大肠杆菌CMCC44102)、鲍曼不动杆菌(如鲍曼不动杆菌ATCC19606和泛耐药鲍曼不动杆菌1)、肺炎克雷伯菌(肺炎克雷伯菌9883,泛耐药肺炎克雷伯菌2,泛耐药肺炎克雷伯菌3,泛耐药肺炎克雷伯菌4)、铜绿假单胞菌(如铜绿假单胞菌ATCC27853、铜绿假单胞菌CMCC10104、铜绿假单胞菌60357,铜绿假单胞菌52097和泛耐药铜绿假单胞菌5)、福氏志贺氏菌(如福氏志贺氏菌ATCC12022和福氏志贺氏菌CMCC51571)、鼠伤寒沙门氏菌(如鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028和鼠伤寒沙门氏菌CICC21483)和副溶血弧菌(如副溶血弧菌ATCC17802)。

[0022] 本发明的第三个目的是提供万古霉素-抗菌肽偶合物在抗细菌生物被膜中的应用。

[0023] 本发明的第四个目的是提供一种抗菌药物组合物,包括所述的万古霉素-抗菌肽偶合物和抗生素。

[0024] 进一步地,所述抗生素选自多粘菌素B、环丙沙星和庆大霉素中的一种。

[0025] 本发明的有益效果:

[0026] (1) 本发明通过双功能蛋白交联剂sulfo-SMCC将万古霉素和抗菌肽M2偶联,得到的万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2极大地提高了万古霉素的抗菌活性,有效克服了部分革兰氏阳性菌对万古霉素的耐药性问题。偶合物Vm-M2显著扩大了万古霉素固有的抗菌谱,对主

要的革兰氏阴性致病菌(包括耐药和泛耐药临床分离株)都具有很强的抗菌活性。除此之外,在同等摩尔浓度下,偶合物展现出比万古霉素、抗菌肽M2及万古霉素和抗菌肽M2混合物更为高效的杀菌活性。

[0027] (2) 本发明提供的万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2经过2步偶联反应得到,合成方便,原料易获取,合成成本低。除此之外,该偶合物还具有溶血活性低、稳定性高、具有强抗生物被膜活性等优点,可应用于医药、化妆品和养殖业等领域,极大地拓展了下游应用价值。

附图说明

- [0028] 图1是万古霉素改造体Vm-SMCC质谱和HPLC分析结果;
[0029] 图2是万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的质谱和HPLC分析结果;
[0030] 图3是万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的合成路线图;
[0031] 图4是万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的滞留杀菌效果;
[0032] 图5是万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的盐离子稳定性;
[0033] 图6是万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2对细菌群集运动的影响。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0035] 实验菌株:临床分离菌株均收集自苏州大学附属医院。

[0036] 实施例1:万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的化学合成

[0037] 抗菌肽M2是一种源自于蛙类抗菌肽的改造体,由22个氨基酸组成,序列为:Gly¹ Ile² Gly³ Lys⁴ Phe⁵ Leu⁶ Lys⁷ Lys⁸ Ala⁹ Lys¹⁰ Lys¹¹ Phe¹² Gly¹³ Lys¹⁴ Ala¹⁵ Phe¹⁶ Val¹⁷ Lys¹⁸ Ile¹⁹ Leu²⁰ Lys²¹ Lys²² (SEQ ID NO.1),其中C端赖氨酸经酰胺化修饰。

[0038] 为了便于偶联,根据蛙类抗菌肽M2的氨基酸序列,利用分子改造方法设计获得了改造体C-M2,氨基酸序列为Cys¹ Gly² Ile³ Gly⁴ Lys⁵ Phe⁶ Leu⁷ Lys⁸ Lys⁹ Ala¹⁰ Lys¹¹ Lys¹² Phe¹³ Gly¹⁴ Lys¹⁵ Ala¹⁶ Phe¹⁷ Val¹⁸ Lys¹⁹ Ile²⁰ Leu²¹ Lys²² Lys²³ (SEQ ID NO.2),其中C端赖氨酸经酰胺化修饰,具体制备方法如下:

[0039] I. 根据上述C-M2的氨基酸序列,用自动多肽合成仪(433A, Applied Biosystems)合成其全序列,利用HPLC反相柱层析脱盐;

[0040] II. 分子量测定采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)进行鉴定;

[0041] III. 纯化的C-M2用高效液相色谱HPLC方法鉴定其纯度。

[0042] 万古霉素的仲胺与双功能蛋白质交联剂sulfo-SMCC上的琥珀酰亚胺酯在弱碱性环境下发生酰胺缩合反应,形成稳定的酰胺键,万古霉素与sulfo-SMCC等当量进行反应。万古霉素用PBS缓冲液(pH=8.16)溶解,待万古霉素完全溶解后,用pH计测量溶液pH值,若pH值低于8.16,需要用NaOH(0.1mol/L)调节pH值至8.16,sulfo-SMCC用适量DMSO溶解,随后将二者混合,室温下搅拌反应3小时,用反向高效液相色谱监测反应,待反应完全后,用制备型HPLC纯化产物,用高分辨质谱进行分子量鉴定,液相和质谱分析结果如图1所示,这一步得到的反应产物我们将其命名为:Vm-SMCC。

[0043] 双功能蛋白质交联剂sulfo-SMCC另一端的马来酰亚胺基在弱酸性环境 (pH=5.5) 下可以与抗菌肽N端半胱氨酸上的巯基加成反应形成稳定的硫醚键。Vm-SMCC与抗菌肽C-M2为等当量进行反应。二者用PBS缓冲液 (pH=5.5) 溶解,待完全溶解后,用pH计测量溶液pH值,若pH低于5.5,需要用NaOH(0.1mol/L) 溶液调节pH至5.5。室温下搅拌反应3小时,用反向高效液相色谱监测反应,待反应完全后,用制备型HPLC纯化产物,用高分辨质谱进行分子量鉴定,液相和质谱分析结果如图2所示,将终产物命名为:Vm-M2。

[0044] 合成路线图如图3所示。

[0045] 实例2:万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的药理实验

[0046] 1.Vm-M2抗菌活性测定:

[0047] (1)Vm-M2最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration) 测定 (2倍稀释法)。

[0048] 选取11株革兰氏阳性菌和18株革兰氏阴性菌进行MIC测定试验,试验菌株接种到MH液体培养基 (美仑生物) 中,37℃振荡培养到对数生长期,而后用新鲜MH液体培养基将培养至对数生长期的培养液稀释到 2×10^5 cfu/mL待用。

[0049] 无菌96孔板各孔中预先加入90μL MH液体培养基,然后在第一孔中加入10μL用MH液体培养基稀释到一定浓度的经0.22μm孔滤膜过滤的万古霉素、M2和Vm-M2样品溶液,此外,还设置了万古霉素与抗菌肽M2的物理混合组,体系是80μL MH+10μL万古霉素+10μL M2,混匀后取50μL加入第2孔,依次倍比稀释 (表1),自第8孔吸出50μL弃去。

[0050] 表1稀释方法

[0051]

样品孔	1	2	3	4	5	6	7	8	
培养基 (μL)	90	50	50	50	50	50	50	50	
样品 (μL)	10	50	50	50	50	50	50	50	弃去

[0052] 将上述各管混匀后放置37℃,110rpm缓慢振荡培养16小时,于600nm波长处测定光吸收。最小抑菌浓度为看不见细菌生长的最低样品浓度。

[0053] 表2万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的抗菌活性

试验菌株		MIC (μg/mL)				
		万古霉素	M2	万古霉素+M2	Vm-M2	
[0054]	革兰氏阴性菌	大肠杆菌 ATCC25922	>100	4.68	4.68	2.34
		大肠杆菌 CMCC44102	>100	37.5	37.5	4.68
		铜绿假单胞菌 CMCC10104	>100	18.75	18.75	18.75
		铜绿假单胞菌 ATCC27853	>100	18.75	18.75	18.75
		鲍曼不动杆菌 ATCC19606	>100	9.38	9.38	1.17
		泛耐药鲍曼不动杆菌 1	>100	9.38	9.38	9.38
		铜绿假单胞菌 60357	>100	9.38	9.38	9.38
		铜绿假单胞菌 52097	>100	9.38	9.38	9.38
		泛耐药铜绿假单胞菌 5	>100	4.68	4.68	9.38
		鼠伤寒沙门氏菌 CICC21483	>100	18.75	18.75	18.75
		鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	>100	18.75	18.75	18.75
		肺炎克雷伯菌 9883	>100	37.5	37.5	18.75
		泛耐药肺炎克雷伯菌 2	>100	18.75	18.75	18.75
		泛耐药肺炎克雷伯菌 3	>100	9.38	9.38	9.38
		泛耐药肺炎克雷伯菌 4	>100	18.75	18.75	18.75
		副溶血弧菌 ATCC17802	75	18.75	18.75	18.75
		福氏志贺氏菌 ATCC12022	75	9.38	9.38	4.68
		福氏志贺氏菌 CMCC51571	>100	9.38	9.38	9.38
	革	金黄色葡萄球菌 CMCC26003	0.78	2.34	0.78	1.17

[0055]	兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌 ATCC29213	4.68	37.5	4.68	2.34
		金黄色葡萄球菌 ATCC43300	4.68	4.68	4.68	4.68
		金黄色葡萄球菌 15772	>100	18.75	18.75	1.17
		金黄色葡萄球菌 15192	2.34	18.75	2.34	2.34
		耐万古霉素金黄色葡萄球菌 52	>100	9.38	9.38	4.68
		耐万古霉素金黄色葡萄球菌 11	>100	37.5	37.5	9.38
		粪肠球菌 ATCC29212	75	75	75	18.75
		粪肠球菌 2	>100	>100	75	18.75
		产气荚膜梭菌 ATCC13124	37.5	18.75	18.75	9.38
		蜡样芽孢杆菌 CMCC63301	>100	18.75	18.75	9.38
		GM (μM)		56.51	8.66	4.40

[0056] MIC:最小抑菌浓度,以上结果为三次独立重复实验平均值。

[0057] 由表2可知,偶合物Vm-M2具有比单独万古霉素和单独抗菌肽更强、更广谱的抗菌活性。对于革兰氏阳性菌,Vm-M2克服了金黄色葡萄球菌,粪肠球菌对万古霉素的耐药性,对于万古霉素不敏感的众多革兰氏阴性菌,尤其是对一些泛耐药临床分离菌株,偶合物Vm-M2也展现出极强的抗菌活性,其抗菌活性高于单独添加抗菌肽M2。同时,用万古霉素和抗菌肽

的物理混合组做对照,结果表明,单纯物理混合并不能产生更强的抗菌活性,这进一步说明化学偶联产生了更好的抗菌效果。GM值是抗菌药物对受试菌MIC值的算术平均值,GM值越低,抗菌活性越强,如表2所示,万古霉素的GM值是56.48 μ M,抗菌肽M2的GM值为8.66 μ M,物理混合组的GM值为4.40 μ M,偶合物Vm-M2的GM值为2.60 μ M,因此可以认为,偶合物的总体抗菌活性相对于万古霉素提高了21.72倍,相对于单独抗菌肽M2也提高了3.33倍,相对于物理混合组提高了1.69倍。这说明偶合物Vm-M2具有出色的抗菌活性和临床应用价值。

[0058] (2) 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的杀菌动力学

[0059] 选用大肠杆菌ATCC25922和金黄色葡萄球菌CMCC26003用MH液体培养基在37 $^{\circ}$ C培养6小时,然后用新鲜的MH液体培养基稀释成 10^6 cfu/mL的菌悬液。将溶解于灭菌的去离子水中的万古霉素,M2和Vm-M2样品加入到菌悬液中,使终浓度为4 μ M。将给药后的菌液置于培养箱中37 $^{\circ}$ C培养箱中震荡培养,分别在0、15、30、60、120和180分钟取10 μ L菌液稀释1000倍,然后取50 μ L稀释的菌液涂布到MH固体培养基上,37 $^{\circ}$ C培养箱培养过夜后菌落计数。因为万古霉素对革兰氏阴性菌无效,所以对于大肠杆菌ATCC25922,选用多粘菌素B作为阳性对照,灭菌的PBS作为阴性对照。

[0060] 表3万古霉素、M2和Vm-M2的杀菌速度(大肠杆菌ATCC25922)

时间	菌落数($\times 10^3$, CFU/mL)					
	0min	15min	30min	60min	120min	180min
万古霉素	175	167	298	431	832	1275
M2	159	8	0	0	0	0
Vm-M2	167	6	0	0	0	0
多粘菌素 B	171	5	0	0	0	0
PBS	163	190	287	394	953	1415

[0062] 表4万古霉素、M2和Vm-M2的杀菌速度(金黄色葡萄球菌CMCC26003)

时间	菌落数($\times 10^3$, CFU/mL)					
	0min	15min	30min	60min	120min	180min
万古霉素	432	370	560	588	569	570
M2	410	175	71	31	7	0
Vm-M2	395	52	0	0	0	0
PBS	398	495	621	840	963	1566

[0064] 如表3、4所示,对于金黄色葡萄球菌CMCC26003,偶合物Vm-M2展现出极快的杀菌速度,在30分钟内,就能将活菌全部杀死,抗菌肽M2在120分钟时依然存在少量活菌,万古霉素的杀菌速度很慢,在180分钟内不能有效地杀死细菌,只能起到抑制细菌生长的作用。对于大肠杆菌ATCC25922,偶合物Vm-M2展现出与阳性对照多粘菌素B相当的杀菌速度,能在30分钟内杀死所有细菌。而万古霉素则没有任何杀菌或抑菌活性。

[0065] (3) 滞留菌实验

[0066] 细菌在受到抗菌药物冲击后,绝大多数会很快死亡,但仍有小部分的亚群并不能被彻底杀死,与传统意义上的耐药菌不同,它们并没有发生基因序列上的变化,这种细菌亚

群叫做滞留菌,这是一种处于休眠状态的表型变异细菌,药物尽管可以与其靶点结合,但无法发挥对细菌的杀伤作用,故而滞留菌对几乎所有抗菌药都有耐受性,但其耐药性特征无法遗传给子代,收集再培养后,其耐药特征消失,MIC值无明显变化。近年来,越来越多的临床案例表明滞留菌是慢性感染性疾病迁延不愈,症状反复的重要原因,针对滞留菌产生机制,预防,清除滞留菌的研究也越来越受到关注。为了检测偶合物Vm-M2对滞留菌的杀灭效果,选取金黄色葡萄球菌CMCC26003,置于37℃摇床中200rpm培养6小时,至生长对数期,用MH液体培养基稀释至 10^8 CFU/mL,取900μL加入离心管中,向菌液中加入终浓度为20倍MIC的环丙沙星(CIP),37℃摇床培养8小时,分别在0h,2h,4h,6h,8h,取10μL菌液稀释1000倍,取50μL稀释后菌液涂板。在8h时间点,取出300μL菌液,离心弃去培养基,无菌PBS洗3次,除去环丙沙星,用300μL MH液体培养基重悬,分成3等份,每管100μL,分别加入终浓度为4μM的万古霉素,M2和Vm-M2样品,随后在24h和48h时间点取样稀释1000倍,涂板,置于37℃培养箱中16h,取出平板做菌落计数。本实验还设置了万古霉素和抗菌肽M2各自4μM共孵育的物理混合组。

[0067] 由图4的实验结果可知,在环丙沙星孵育8小时后,形成了稳定且具有耐药特征的滞留菌,继续给予环丙沙星孵育至48小时,活菌数量几乎不变,万古霉素对滞留菌的杀菌效果并不显著,孵育至48小时后滞留菌菌落数仅仅下降了1个数量级,抗菌肽M2对滞留菌的杀菌效果强于万古霉素,孵育至48小时后的滞留菌菌落数下降了3个数量级,物理混合组的滞留菌杀菌效果与单独抗菌肽M2相近,偶合物Vm-M2显示出极强的滞留菌杀菌效果,孵育至48小时后的滞留菌菌落数下降了超过4个数量级,统计学分析表明,给药孵育至48小时时,偶合物组滞留菌菌落数与单独万古霉素组,单独抗菌肽组及物理混合组之间均存在显著性差异。因此,偶合物滞留菌杀菌效果显著强于万古霉素和单独抗菌肽M2,万古霉素抗菌肽二者物理混合组的滞留菌杀菌效果也不及偶合物组。

[0068] 2. 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的溶血活性测定

[0069] 将采集的人血与阿氏液混合抗凝,生理盐水洗涤2次并重悬成 10^7 - 10^8 cell/mL的悬浮液。上述稀释好的红细胞悬液与溶解于生理盐水的M2和Vm-M2样品混合,37℃保温30min,再于1000rpm离心5min,上清液于540nm测吸收值。阴性对照使用生理盐水,阳性对照使用Triton X-100,溶血百分比按以下公式计算:溶血百分比 $H\% = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照}}}{A_{\text{阳性对照}}} \times 100\%$ 。结果见表5。

[0070] 表5M2和Vm-M2的溶血活性

浓度 (μM)	溶血活性 (%)	
	M2	Vm-M2
4	3.89	2.31
8	6.11	4.23
16	13.45	8.16
32	18.34	13.43
64	22.13	18.15

[0072] 结果表明样品浓度接近8倍GM (MIC的算术平均数) 值时,Vm-M2的溶血百分比为

8.16%,同等浓度下,M2的溶血百分比为13.45%,说明偶合物Vm-M2比单独抗菌肽M2具有更低的溶血活性,不易引起哺乳动物红细胞破裂溶解。尤其抗菌活性范围内,安全性高。

[0073] 3. 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的盐离子稳定性实验研究

[0074] 人体内有多种常见的盐离子,这些盐离子对于维持人体正常生命活动是不可缺少的,这些盐离子大多带正电荷,偶合物Vm-M2因偶联了抗菌肽而带正电,而细菌细胞膜的脂质成分带负电,有研究表明,正电盐离子会和抗菌肽竞争性地与细菌细胞膜结合,导致抗菌肽的抗菌活性减弱或消失,因此,检测偶合物Vm-M2的盐离子稳定性是必要的,选用大肠杆菌ATCC25922,耐万古霉素金黄色葡萄球菌VRSA52,分别用MH液体培养基(苏州阿尔法生物技术有限公司),于37℃培养12小时。然后分别用含生理盐离子浓度的MH液体培养基(NaCl 150mM,KCl 4.5mM,CaCl₂ 2mM,MgCl₂ 1mM,ZnCl₂ 8μM,FeCl₃ 4μM,NH₄Cl 6μM)稀释到10⁵CFU/ml。用含相应盐离子浓度的MH液体培养基制备不同浓度梯度的Vm-M2样品。利用2倍稀释法测定Vm-M2对大肠杆菌ATCC25922和耐万古霉素金黄色葡萄球菌VRSA52的MIC值,以此确定不同盐离子对万古霉素-抗菌肽偶合物抗菌活性的影响。

[0075] 如图5所示,偶合物Vm-M2具有很强的盐离子耐受性。在参考人体生理盐离子浓度下(NaCl 150mM,KCl 4.5mM,CaCl₂ 2mM,MgCl₂ 1mM,ZnCl₂ 8μM,FeCl₃ 4μM,NH₄Cl 6μM),偶合物Vm-M2的抗菌活性基本保持不变(MIC值升高不超过一倍)。

[0076] 实例3: 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2对细菌群集效应的影响

[0077] 细菌群集运动是细菌以群体方式在培养基表面由接种点向周围进行依赖鞭毛的迁移运动,是细菌对所处环境自我适应的反应行为,这对细菌耐药性和生物被膜形成过程具有重要意义。为了研究偶合物Vm-M2对细菌群集效应的影响,我们进行了下述试验,配培养基:胰蛋白胨(10g/L),NaCl(10g/L),酵母膏(5g/L),琼脂(0.3%),各成分用去离子水溶解,高温灭菌后,趁热加入终浓度为0.5μM,1μM,2μM的万古霉素、M2和Vm-M2,以及终浓度相同的万古霉素和抗菌肽物理混合组,加入等体积PBS缓冲液作空白对照,置于六孔板中冷却备用,取大肠杆菌ATCC25922,金黄色葡萄球菌CMCC26003,分别用MH液体培养基(苏州阿尔法生物技术有限公司),于37℃培养6小时至生长对数期,用MH液体培养基稀释至10⁶CFU/mL,吸取5μL,滴在冷却的固体培养基上,随后置于37℃培养箱中培养24小时,取出拍照,用imageJ软件测量菌落面积。

[0078] 如图6所示,对于大肠杆菌ATCC25922,万古霉素组的菌落面积与PBS空白对照组无明显差异,其对受试细菌的群集运动无抑制作用,对于金黄色葡萄球菌CMCC26003,万古霉素对群集运动的抑制作用呈剂量依赖性,但其抑制作用弱于单独抗菌肽M2和偶合物Vm-M2,此外,对于上述2株受试菌,在相同给药浓度(2μM)时,偶合物Vm-M2组的菌落面积均显著小于单独抗菌肽M2给药组和物理混合组,值得注意的是,当Vm-M2给药浓度为2μM时,培养基上并未观察到有大肠杆菌ATCC25922的菌落,所以菌落面积为0,这可能是因为在该浓度下大肠杆菌已被全部杀死,综上所述,偶合物Vm-M2能有效阻断细菌胞体之间的信号传导,有效抑制细菌的群集运动行为,这将有助于抑制生物被膜和耐药性的产生,进一步说明了偶合物Vm-M2拥有巨大的应用价值。

[0079] 实施例4: 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2的抗生物被膜活性研究

[0080] 1. 生物膜清除活性测定

[0081] 从-80℃冰箱中取出保存的菌株,37℃水浴快速融化,用接种环蘸取少许液体,在

LB固体培养基上呈Z字形分四个区域划线,每次划线从上次末端开始,37℃恒温培养至长出单菌落;挑取单菌落于无菌液体MHB培养基中,37℃、200rpm振荡培养至对数生长期;检测菌液浓度,稀释成 1×10^7 CFU/mL。向无菌96孔板中加入上述菌液100μL,37℃培养48h使生物膜形成。吸出每孔的菌液,并用PBS洗涤三次。每孔加入100μL稀释后的万古霉素、M2和偶合物Vm-M2样品,物理混合组为50μL万古霉素+50μL M2,样品终浓度为1μM、2μM、4μM和8μM,加样后置于37℃恒温培养24h。每孔加入结晶紫染液(0.1%),染色30min后吸出染液,无菌PBS洗涤三次,超净台中风干。每孔加入100μL无水乙醇,静置20min,溶解结晶紫。在紫外波长560nm下检测OD值,实验设置三个平行。用以下公式计算生物膜形成的百分比(Biofilm Retention%, BR%): $BR(\%) = 100\% - [100\% \times (F_0 - F_{drug}) / F_0]$,该实验中选择PBS作为阴性对照,其测定值视为最大生物膜残留量。Biofilm Retention%, BR%为生物膜残存百分比, F_0 为PBS处理组的吸光值, F_{drug} 为给药处理组吸光值。

[0082] 表6万古霉素、M2和Vm-M2的生物膜清除活性(大肠杆菌ATCC25922)

浓度(μM)	生物膜形成率(%)			
	万古霉素	M2	万古霉素+M2	Vm-M2
1	96.81	93.76	94.56	78.63
2	94.16	85.70	87.61	69.64
4	92.78	74.94	76.41	59.83
8	94.36	66.16	65.78	46.19

[0084] 表7万古霉素、M2和Vm-M2的生物膜清除活性(金黄色葡萄球菌VRSA52)

浓度(μM)	生物膜形成率(%)			
	万古霉素	M2	万古霉素+M2	Vm-M2
1	97.03	89.88	91.25	81.05
2	94.02	74.21	77.56	66.20
4	96.76	59.84	61.35	50.37
8	92.70	49.84	53.46	38.72

[0086] 2. 生物膜抑制活性测定

[0087] 从-80℃冰箱中取出保存的菌株,37℃水浴快速融化,蘸取少许液体在LB固体培养基上呈Z字形划线,在37℃恒温培养至长出单菌落;挑取单菌落于无菌液体MHB培养基中,37℃、200rpm振荡培养至对数生长期;检测菌液浓度,稀释成 2×10^7 CFU/mL。向无菌96孔板中加入上述菌液50μL,每孔加入50μL稀释后的万古霉素、M2和偶合物Vm-M2样品,物理混合组为25μL万古霉素+25μL M2,样品终浓度为1μM、2μM、4μM和8μM,37℃恒温培养48h。吸出每孔的菌液,并用PBS洗涤三次,把板置于超净台通风吹干。每孔加入结晶紫染液(0.1%),染色30min后吸出染液,无菌PBS洗涤三次,超净台中风干。每孔加入100μL无水乙醇,静置20min,溶解结晶紫。在紫外波长560nm下检测OD值。用以下公式计算生物膜形成的百分比(Biofilm Formation%, BF%): $BF(\%) = 100\% - [100\% \times (F_0 - F_{drug}) / F_0]$,其中PBS(F_0)为阴性对照,其测定值视为最大生物膜形成量。Biofilm Formation%, BF%为生物膜形成百分比, F_{drug} 为

给药处理组吸光值。

[0088] 表8万古霉素, M2, Vm-M2的生物膜抑制活性(大肠杆菌ATCC25922)

浓度(μM)	生物膜形成率(%)			
	万古霉素	M2	万古霉素+M2	Vm-M2
1	98.71	95.13	94.31	79.29
2	98.76	86.67	87.69	67.17
4	94.73	73.46	75.62	56.83
8	95.01	61.32	65.73	43.24

[0090] 表9万古霉素、M2和Vm-M2的生物膜抑制活性(金黄色葡萄球菌VRSA52)

浓度(μM)	生物膜形成率(%)			
	万古霉素	M2	万古霉素+M2	Vm-M2
1	97.65	96.30	94.56	92.13
2	98.22	91.54	89.54	85.54
4	95.18	78.44	76.34	69.81
8	89.04	63.90	66.76	51.67

[0092] 如表6, 7, 8, 9所示, 对于大肠杆菌ATCC25922, 耐万古霉素金黄色葡萄球菌VRSA52, 万古霉素没有生物膜清除和抑制活性, 抗菌肽M2和偶合物Vm-M2均显示出浓度依赖的抗生物膜活性, 有意思的是, 在同等给药浓度下, 偶合物Vm-M2展现出比单独抗菌肽M2更强的生物膜清除和抑制活性, 物理混合组的抗生物被膜活性亦不及偶合物组。因此, 可以认为, 偶合物Vm-M2在细菌感染引起的慢性难治性疾病方面具有不错的应用潜力。

[0093] 实施例5: 万古霉素-抗菌肽偶合物Vm-M2与传统抗生素协同抗菌作用测定

[0094] 称取抗生素(美罗培南、多粘菌素B、环丙沙星和庆大霉素)药品, 用无菌水溶成2mg/mL的溶液, 依次倍比稀释得到8-1/64MIC的浓度, 加上溶剂共11个浓度备用, 将偶合物Vm-M2用无菌水配成4×MIC的浓度, 依次再倍比稀释直到4-1/16MIC, 加上溶剂共8个浓度备用。稀释菌液至 5×10^5 CFU/mL备用。在96孔板中加入90 μL 稀释好的菌液; 将抗生素加到菌中, 每孔5 μL , 每一列一个浓度, 共11列; 将偶合物Vm-M2加到菌液中, 每孔5 μL , 每一行一个浓度, 共8行; 找到MICA, MICB, A, B计算FIC, $\text{FIC} = \text{FMICA} + \text{FMICB} = \text{A}/\text{MICA} + \text{B}/\text{MICB}$ (A, B代表两药联用的最佳集合点处的浓度, MICA, MICB代表两药单用时的MIC), $\text{FIC} < 0.5$ 时有协同作用, $\text{FIC} > 4$ (包含4)时有拮抗作用, $0.5 < \text{FIC} < 2$ (包含0.5)时两药有相加作用, $2 < \text{FIC} < 4$ (包含2)时两药为无关作用, 加药方式如下表所示。

[0095]

	Antibiotic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Vm-M2		8×	4×	2×	MIC	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0
A	4×											
B	2×											
C	MIC											
D	1/2											
E	1/4											
F	1/8											
G	1/16											
H	0											
FICI= FMICA+FMICB=A/MICA+B/MICB												

[0096] 表10Vm-M2与传统抗生素的协同抗菌效果

[0097]

	Polymyxin B	Gentamicin	Meropenem	Ciprofloxacin
FICI (VRSA52)	0.09375	0.375	1	1
FICI (<i>E. coli</i> ATCC25922)	0.375	0.3125	2	0.25

[0098] 选用大肠杆菌ATCC25922,耐万古霉素金黄色葡萄球菌VRSA52作为受试菌,检测了上述4种临床一线抗生素与偶合物Vm-M2的协同抗菌作用。根据实验结果,偶合物除了与美罗培南无协同作用之外,与其他抗生素均具有协同作用,这可能与不同抗生素的固有作用机制有关。总体而言,偶合物与大多数临床一线使用的抗生素有协同抗菌的效果,显示了其在临床联合用药方面的巨大潜力。

[0099] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

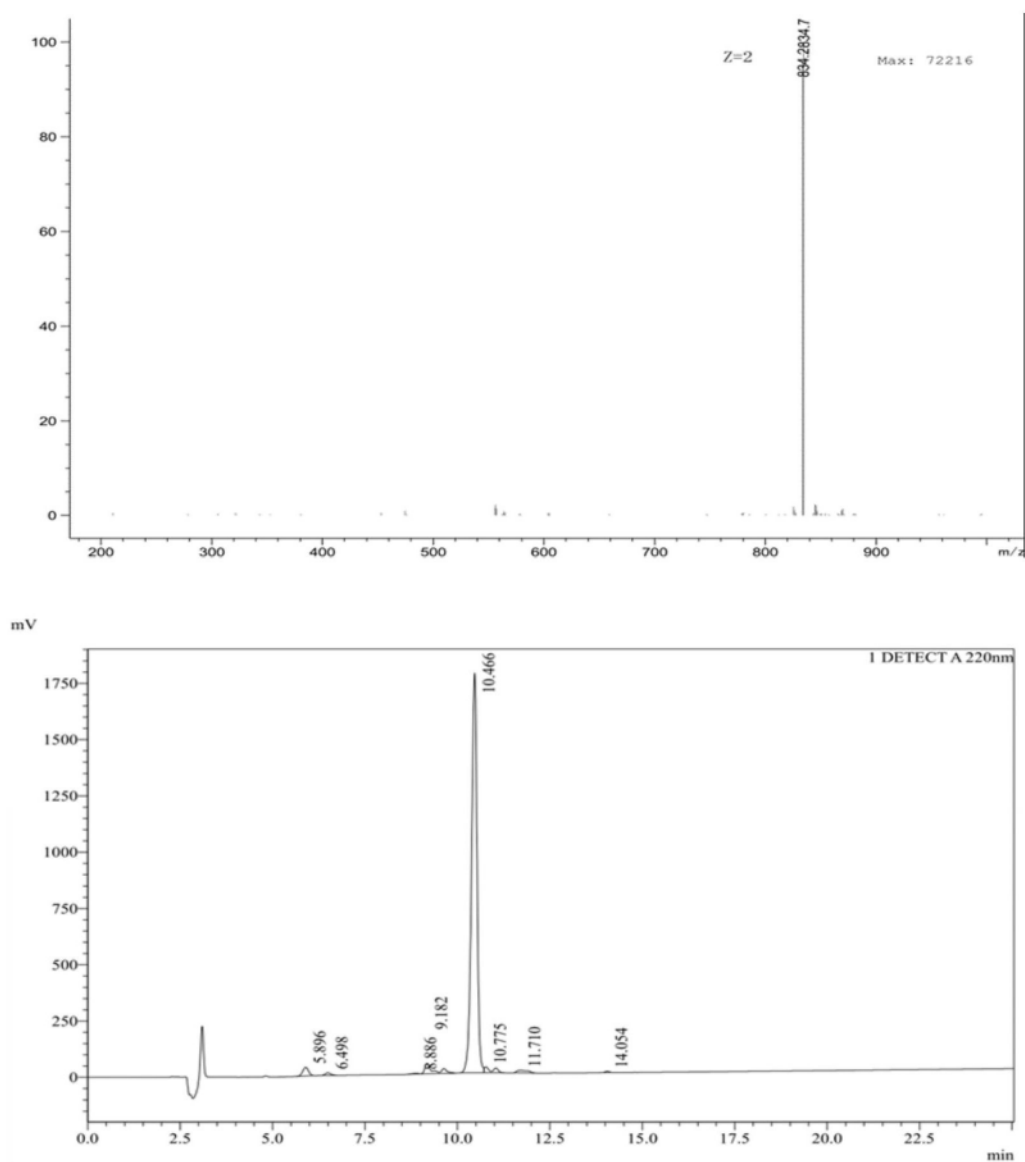


图1

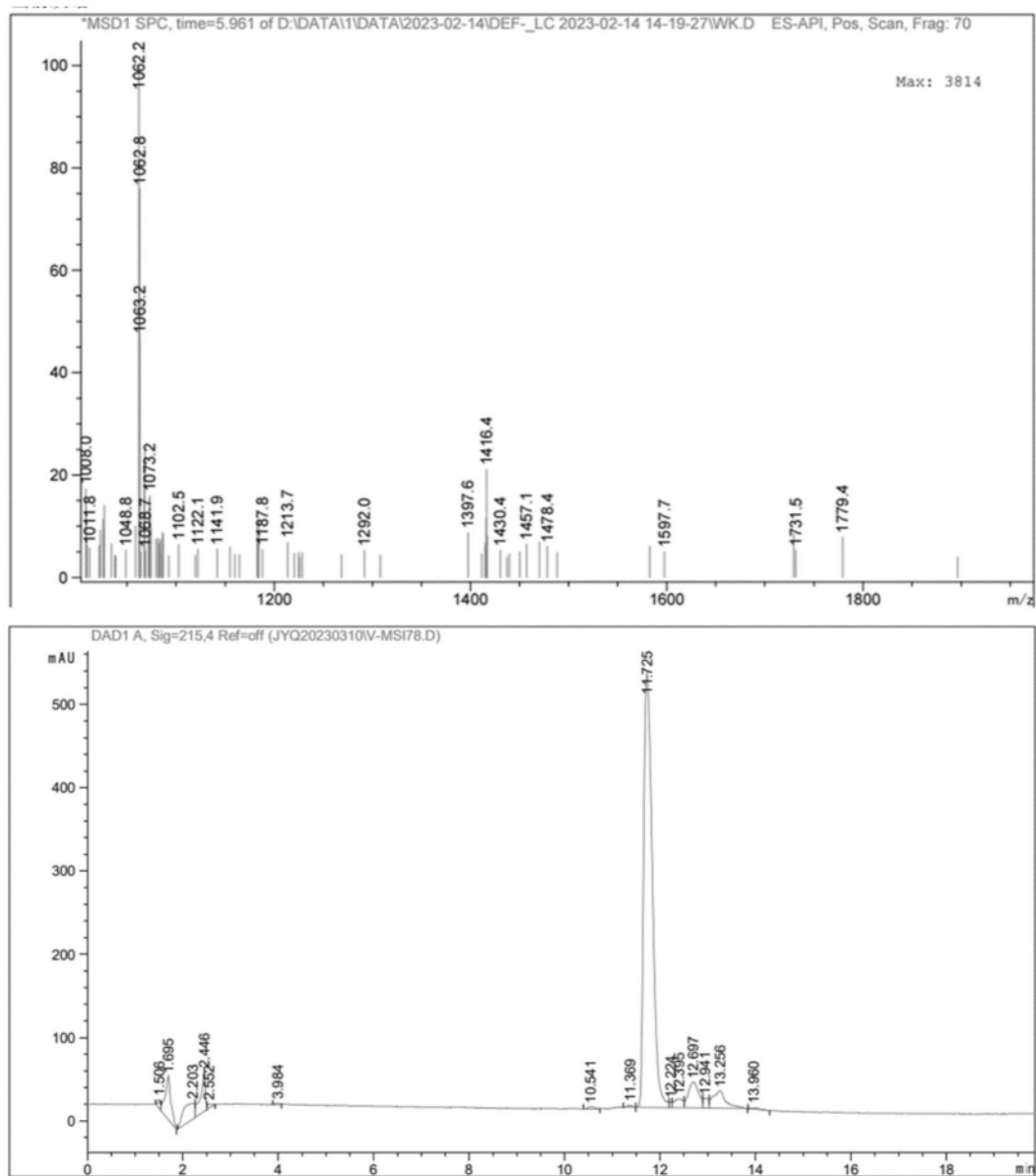


图2

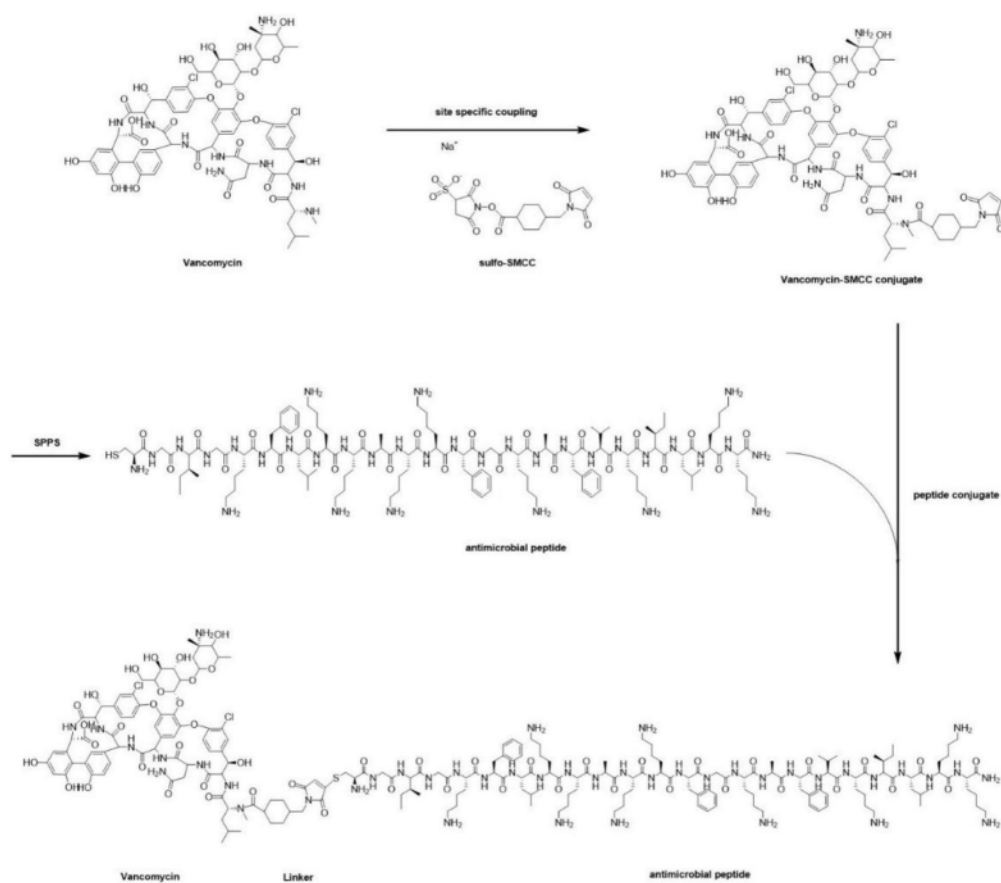


图3

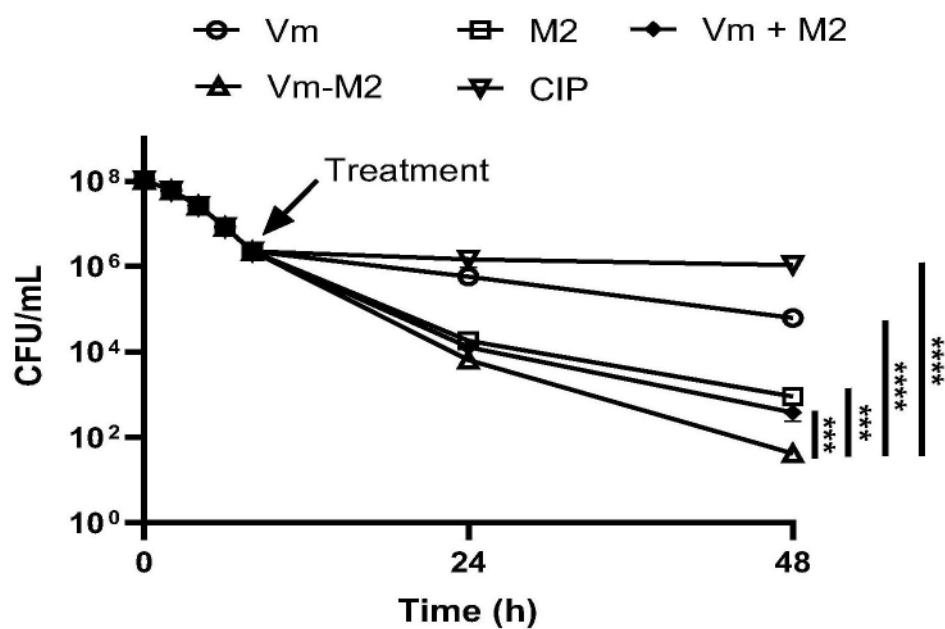


图4

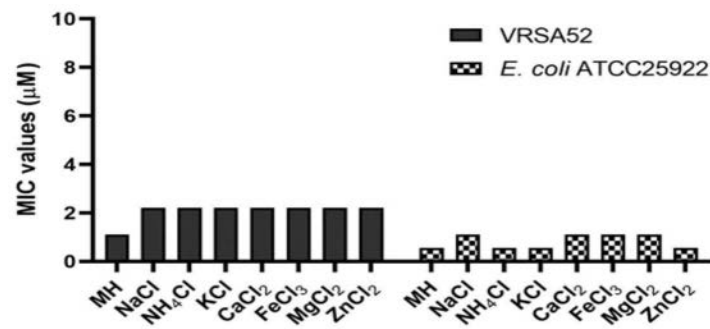


图5

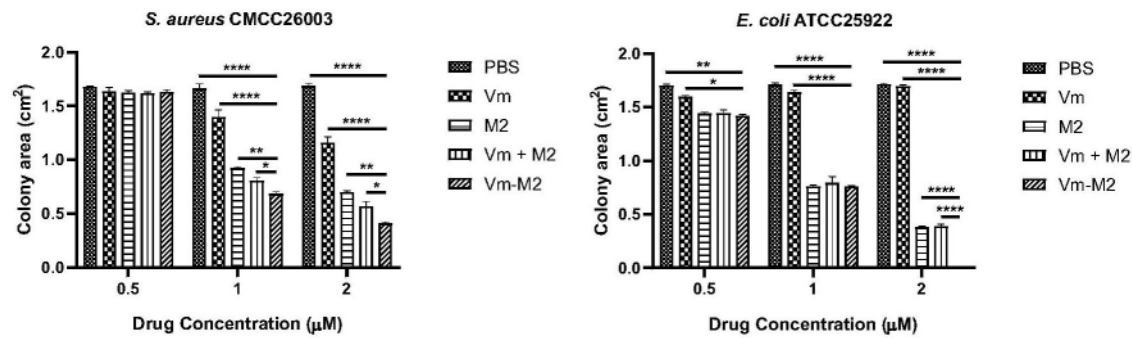


图6