

(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
2014 年 7 月 3 日 (03.07.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/101322 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/198 (2006.01) *A61K 35/14* (2006.01)
A61K 35/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/070429
- (22) 国际申请日: 2013 年 1 月 14 日 (14.01.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210589250.4 2012 年 12 月 31 日 (31.12.2012) 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: 彭宜宪 (PENG, Xuanxian); 中国广东省广州市海珠新港西路 135 号中山大学生命科学学院, Guangdong 510275 (CN)。 李惠 (LI, Hui); 中国广东省广州市海珠新港西路 135 号中山大学生命科学学院, Guangdong 510275 (CN)。 程志学 (CHENG, Zhixue); 中国广东省广州市海珠新港西路 135 号中山大学生命科学学院, Guangdong 510275 (CN)。 郭昌 (GUO, Chang); 中国广东省广州市海珠新港西路 135 号中山大学生命科学学院, 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体育西路 191

号中石化大厦 B 塔 3912 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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。

(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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: AMINO ACID IMPROVING SENSITIVITY OF BACTERIA TO SERUM

(54) 发明名称: 提高细菌对血清敏感性的氨基酸

(57) Abstract: Glycine, threonine, and serine can improve the sensitivity of bacteria to serum, plasma, or whole blood, and can be used as medicine to enhance the bactericidal effect of the serum, the plasma, or the whole blood.

(57) 摘要: 甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸能够提高细菌对血清、血浆或全血的敏感性, 可作为药物提高血清、血浆或全血的杀菌作用。



WO 2014/101322 A1

说明书

发明名称：提高细菌对血清敏感性的氨基酸

- [1] 技术领域
- [2] 本发明属于医药技术领域，具体涉及一种能提高细菌对血清敏感性的小分子物质。
- [3] 背景技术
- [4] 细菌进入机体后，机体通过特异性免疫和非特异性免疫来清除。特异性免疫主要是通过血液中抗体来清除，非特异性免疫主要是通过补体系统和吞噬细胞来清除。
- [5] 补体系统溶菌是目前已知的清除进入机体血液和粘膜中细菌的主要方式之一，此作用依赖或不依赖抗体的辅助。补体是存在于人或脊椎动物血清与组织液中的一组经活化后具有酶活性的蛋白质，包括 30 多种可溶性蛋白和膜结合蛋白。其广泛参与机体微生物防御反应以及免疫调节，也可介导免疫病理的损伤性反应，是体内具有重要生物学作用的效应系统和效应放大系统。
- [6] 然而，许多病原菌具有明显的血清抗性，即能够抵抗补体的溶菌作用，是病原菌的重要病原特征之一。近一个世纪的研究表明，细菌抵抗血清补体溶菌主要归因于脂多糖（LPS）和膜（外膜）蛋白。细菌通过减少膜（外膜）蛋白与补体的结合以及灭活已经与膜（外膜）蛋白结合了的补体而表现血清抗性。由此，消除病原菌血清抗性是防治病原菌感染的重要手段，但迄今为止尚未见有关通过抑制病原菌血清抗性以提高血清杀菌目的的研究报道。因此，发现新的能增加补体对细菌溶解的物质，对防治病原菌的危害，保障人们身体健康具有十分重要的意义。
- [7] 发明内容
- [8] 本发明的目的在于提供一种小分子物质在提高细菌对血清敏感性方面的应用。作为一种提高细菌对血清敏感性的小分子代谢物，本发明通过这些小分子物质可达到抑制病原菌的目的。
- [9] 本发明所述的小分子物质，属于氨基酸或其衍生物。

- [10] 更具体的说,所述的氨基酸可以是甘氨酸,苏氨酸,丝氨酸。
- [11] 优选地,所述的氨基酸为甘氨酸(Glycine, Gly/ 甘氨酸)。
- [12] 由此,发明公开并保护了氨基酸或氨基酸衍生物在制备提高血清或血浆或全血杀菌作用药物方面的应用,所述的氨基酸为甘氨酸,苏氨酸或丝氨酸。
- [13] 同时,发明公开并保护了氨基酸或氨基酸衍生物在制备注射用杀菌剂方面的应用,氨基酸。
- [14] 同时,发明公开并保护了氨基酸与血清联用在制备杀菌药物方面的应用,或氨基酸衍生物,与血清或血浆或全血联用在制备杀菌药物方面的应用;所述的氨基酸为甘氨酸,苏氨酸或丝氨酸。
- [15] 优选地,所述的氨基酸为甘氨酸。
- [16] 所述的甘氨酸的代谢产物和甘氨酸衍生物,如谷胱甘肽、5,10-亚甲基四氢叶酸、H-蛋白-氨甲基二氢脂赖氨酸、N1-(5-磷酸-D-核糖基)甘氨酸酰胺、L-2-氨基-3-氧代丁酸、L-半胱氨。
- [17] 发明同时保护了一种杀菌药物组合物,其特征在于含有氨基酸和血清/血浆/全血,所述的氨基酸为甘氨酸,苏氨酸或丝氨酸。
- [18] 优选地,所述的血清和甘氨酸的比例以重量计为1:3000。
- [19] 所述的细菌包括革兰氏阴性菌和阳性菌。优选的,所述的细菌为革兰氏阴性和阳性病原菌。更优选地,所述的细菌为金黄色葡萄球菌、迟钝爱德华菌、B链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌或弧菌。
- [20] 优选地,所述的血清或血浆或全血来源于哺乳动物、鱼类或禽类。
- [21] 本发明同时公开并保护了一种杀菌方法,该方法包括:将氨基酸和血清/血浆/全血联用,或氨基酸衍生物和血清/血浆/全血联用;所述的氨基酸为甘氨酸,苏氨酸或丝氨酸。
- [22] 优选地,所述的方法包括:将甘氨酸和血清以重量计为1:3000的比例混合,用于杀灭革兰氏阴性菌或阳性菌;杀菌所用时间为0.1~24小时。
- [23] 更优选地,本发明所采用的氨基酸为甘氨酸。
- [24] 本发明通过代谢组学的方法,对用人血清处理的大肠埃希菌的所有小分子代谢物进行分析,发现甘氨酸在耐人血清的大肠埃希菌中含量明显下降,提示其可

以作为提高对血清敏感性的小分子代谢物质。

- [25] 本发明通过 固定人血清量添加不同浓度的甘氨酸、固定甘氨酸浓添加不同体积的人血清，以及固定人血清和甘氨酸在不同作用时间的三种情况下，研究甘氨酸添加对血清杀菌作用的影响。结果发现，仅添加甘氨酸的对照组对大肠杆菌生长没有影响，而在人血清中加入甘氨酸后，血清的杀菌能力增加，且其能力随甘氨酸和血清浓度的增加而增强。同时，在一定范围内，随作用时间延长而作用增加。此外，以血浆代替血清也获得同样效果，但采用灭活补体的血清或血浆则无任何效果。
- [26] 本发明通过对革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌以及革兰氏阴性菌的大肠杆菌、迟钝爱德华菌、绿脓杆菌、弧菌等多种细菌的杀菌实验，结果证明添加甘氨酸能提高所有细菌对人血清的敏感性。
- [27] 本发明通过采用 小鼠、兔、猪、鸡、家鸽、对 虾和鱼等 不同进化层次物种动物血清/血浆与甘氨酸合用对其主要病原菌的杀菌作用，发现甘氨酸能提高不同动物血清对其主要病原菌的杀菌能力。
- [28] 本发明进一步进行了小鼠体内实验，发现添加甘氨酸后，小鼠不仅对模式大肠杆菌而且对具有完全血清抗性的临床分离病原性菌株也表现明显提高的清除能力，说明甘氨酸可以在体内和全血状态下起作用。
- [29] 综上所述，在血清中添加甘氨酸能够明显提高细菌对血清的敏感性，为血清抗性病原菌感染的治疗提供了一种崭新的技术方法。
- [30] 由此，发明公开并保护了甘氨酸在提高细菌对 血清敏感性方面的应用。其可用于制备药物或杀菌剂，进一步增强细菌对血清的敏感性。
- [31] 同时，发明公开并保护了一种提高细菌对血清敏感性的方法，其特征在于采用甘氨酸作为一种提高血清杀菌作用的药物。
- [32] 所述的细菌包括但不限于为金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、迟钝爱德华菌、绿脓杆菌、大肠杆菌或弧菌。因为这些细菌是常见人类和养殖动物致病菌，其中金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌为革兰氏阳性菌，大肠埃希氏菌、绿脓杆菌、迟钝爱德华菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌为革兰氏阴性菌。这些细菌为常见的病原菌，且常见其血清抗性菌株，同时大肠埃希氏菌是研究细菌血清

抗性的模式菌，故这些细菌为血清抗性的较好代表菌。

[33] 应用上述方法来提高细菌对血清的敏感性时，甘氨酸的使用浓度为 0.05-1g/ 公斤体重 / 天。

[34] 通过本发明所公开的内容，还可制备出一种新的杀菌剂，该杀菌剂含有甘氨酸；或者一种提高血清对细菌杀菌作用的制剂，其主要成分为甘氨酸。

[35] 附图说明

[36] 图 1 为耐血清大肠埃希氏菌 GC-MS 的独立成分分析（A）、数据聚类分析（B）及代谢物含量分析（C）。

[37] 图 2 为甘氨酸对提高细菌对血清敏感性的结果。A 为不同浓度甘氨酸、B 为不同体积血清，C 为不同时间。

[38] 图 3 为甘氨酸可提高多种细菌对血清敏感性的结果。A 为生存率，B 为提高倍数。

[39] 图 4 为甘氨酸提高不同动物血清 / 血浆对其主要病原菌杀菌能力的结果。A 为虾和鱼血清对溶藻弧菌杀菌的结果，B 为鸡和家鸽血浆对大肠杆菌杀菌的结果，C 为小鼠、兔和猪血浆对大肠杆菌杀菌的结果。

[40] 图 5 为甘氨酸提高小鼠对体内细菌清除的结果。A 和 B 依次为小鼠注射或不注射甘氨酸血液中细菌数量和生存率。

[41] 图 6 为甘氨酸提高小鼠对大肠埃希菌的清除的结果。

[42] 具体实施方式

[43] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[44] 实施例 1

[45] 甘氨酸是大肠埃希菌抵抗血清杀菌作用的生物标记物

[46] 1. 试验样本的准备：从 LB 平板上挑取大肠埃希菌起始株 (*Escherichia coli* K12 BW25113) 单菌落接种于 5 毫升 LB 培养基中，37°C 200rpm 振荡培养 16 小时。按 1：100（v/v）的比例接种于 200 毫升培养基中，37°C 振荡培养至 OD600 值为 1.0，4°C 8000rpm 离心 10 分钟收集菌体，并用 0.85% 生理盐水洗涤菌体 1 次。

[47] 2. GC-MS 样品的制备和数据处理

[48] GC-MS 样品制备：向准备好的样本中分别加入 100 微升人血清（抽取健康人血液，自然凝固，离心上清即为血清），重悬菌体后置于 37 °C 200rpm 振荡培养 1 小时，对照组为生理盐水。4°C8000rpm 离心 5 分钟收菌，去除残余血清或生理盐水。用生理盐水重悬菌体，使 OD600 都为 1.0，各取 1 毫升加入冷甲醇 (Sigma)(包含 5 微升 0.1 毫克 / 毫升核糖纯 (Sigma) 作为分析的内标)。在 10W 强度设置下超声 3 分钟使细胞破碎，4°C12000rpm 离心 10 分钟，取 500 微升上清转移至新的 1.5 毫升离心管并进行真空干燥 (LABCONCO)。干燥后的样品用于 GC/MS 分析。每个样本生物学重复 3 次。

[49] GC-MS 分析：样本首先通过甲基化保护羧基，即通过与 40 微升包含 20 毫克 / 毫升甲氧胺盐酸盐的吡啶在 37°C 反应 90 分钟，然后加入 80 微升 N- 甲基 -N- 三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA, Sigma-Aldrich) 在 37°C 反应 30 分钟使酸性质子衍生化。1 微升衍生化过的样本注入 30 米 $\times$ 250 微米内径 $\times$ 0.25 微米 DBS-MS 柱，采用不分流进样和 DSQ II (Thermo Scientific) 进行分析。GC 烘箱的初始温度在 85°C 维持 5 分钟，接着以 15°C /min 的速率提高到 330°C，再维持 5 分钟。1 毫升 / 分钟氮气作为载气流量。MS 操作在 m/z 50-600 范围内进行。

[50] 数据处理：谱卷积和校准使用 AMDIS 的和内标进行。所有样本执行保留时间 (RT) 校正，然后 RT 作为参考，对剩余谱进行查询，组装生成一个包含所有样品中每个代谢物丰度信息的文件。使用 NIST MS search 2.0 软件，将 GC-MS 谱中代谢物与 National Institute of Standards and Technology (NIST) 数据库进行比对，从而获得鉴定。导出的数据矩阵使用总峰面积进行校正。使用保留时间和 m/z 区配结果赋予每个样本中每个物质标准化过的峰强度，生产的文件用于进一步的统计学分析。

[51] 3. 数据分析。

[52] 通过 GC-MS 进行鉴定生理盐水对照组与用 100 微升人血清和 1 毫升人血清处理后的大肠埃希菌代谢产物，通过代谢物的热图和等级聚类分析，发现 3 个重复样品各自聚在一起且血清处理组聚在一起（图 1A）。进一步独立成分分析，发现 IC01 可很好的解释人血清的效应（图 1B），通过对所有代谢产物分析，

发现甘氨酸（Glycine）在人血清处理样品中明显下降（图 1C），提示甘氨酸可能是大肠埃希菌抵抗血清杀菌作用的生物靶标物质。

[53] 实施例 2

[54] 甘氨酸可提高大肠埃希菌对血清的敏感性

[55] 为了解甘氨酸是否有助于血清的杀菌作用，分别进行了在同样含量人血清中添加不同浓度的甘氨酸、在不同体积的人血清中添加相同浓度的甘氨酸，以及在不同作用时间等三种情况下的试验研究。

[56] 1. 甘氨酸促进血清杀菌作用具有浓度梯度效应

[57] 按照实例 1.1 制备实验用细菌样本，添加甘氨酸使其终浓度分别 0、5、10、30、50 和 100mM，37°C 200rpm 振荡培养 1 小时后，再添加 100 微升人血清处理，同时以生理盐水为对照。2 小时离心收菌，用 1 毫升生理盐水重悬菌体，用 LB 固体平板进行活菌计数。存活率计算公式为：加入不同浓度甘氨酸处理后活菌数 / 生理盐水对照处理后活菌数 × 100%。图 2A 为在人血清中加入不同浓度甘氨酸后，大肠埃希菌的生存率。从这个结果可以看出，加入 5mM 甘氨酸后，血清对大肠埃希菌的杀菌作用提高了 1.36 倍，随着加入甘氨酸浓度的提高，杀菌作用逐渐增强，100mM 提高幅度最大，可达约 86 倍。

[58] 2. 甘氨酸促进血清杀菌作用随血清体积增大而效果加强

[59] 取制备好的细菌样本，先添加 100mM 甘氨酸，37 °C 200rpm 振荡培养 1 小时，然后分别添加 0、20、40、60、80 和 100 微升人血清，同时以不添加甘氨酸只添加不同体积人血清为对照。37°C 200rpm 振荡培养 2 小时后离心收菌，用 1 毫升生理盐水将菌体重悬后，用平板进行活菌计数。存活率计算公式为：加入不同体积人血清和甘氨酸处理后活菌数 / 只加人血清处理活菌数 × 100%。计数结果（图 2B）说明，当添加了甘氨酸后，血清对大肠埃希菌的杀菌作用都比不添加甘氨酸有提高，随着添加血清量的增加，杀菌作用显著增加，当添加 100 微升人血清时，可增加 86 倍。

[60] 3. 甘氨酸促进血清杀菌作用具有时间效应

[61] 将制备好的细菌样本分成 4 组：添加 100mM 甘氨酸组、100 微升人血清组、100 微升人血清和 100mM 甘氨酸组、生理盐水对照组，37°C 200rpm 振荡培养

，分别在 0.5、1、2、3 和 4 小时离心收菌，用 1 毫升生理盐水将菌体重悬，用 LB 固体平板进行活菌计数。存活率计算公式为：加入血清和 / 或甘氨酸处理后不同时间活菌数 / 加生理盐水对照组不同时间活菌数 $\times 100\%$ 。图 2C 为 3 个实验组在不同时间的生存率，从图可见，只加入甘氨酸没有杀菌效果，当只加入血清时会有一定的杀菌效果，而当在血清中加入甘氨酸后，杀菌效果明显增强，在 0.5 小时后增加了 2 倍，1 小时猛增到 77 倍，4 小时高达 120 倍。

[62] 综上所述，甘氨酸本身对于大肠杆菌生长没有影响；血清本身对细菌有一定的杀菌作用，而在人血清中加入甘氨酸后，血清的杀菌能力显著增加，且其杀菌能力随甘氨酸浓度的增强而增强；在添加甘氨酸后，随人血清量的增加而杀菌率增加。

[63] **实施例 3**

[64] 甘氨酸提高细菌包括革兰氏阴性菌和阳性菌对血清的敏感性

[65] 按照实例 1.1 方法培养多种细菌（大肠杆菌 K12 BW25113，大肠杆菌 Y17 临床菌，乙型溶血性链球菌，溶藻弧菌，副溶血弧菌，绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌），分别收集 3 毫升 OD600 为 1.0 的每种细菌。然后分别分为 4 组：添加 100 微升生理盐水对照组、100-150mM 甘氨酸组、125-175 微升人血清组和 125-175 微升人血清加 100-150mM 甘氨酸组。不同种类细菌最佳杀菌作用加入的血清量和甘氨酸略有不同。37°C 200rpm 振荡培养 4 小时后离心收菌，用 1 毫升生理盐水将菌体重悬，测定 OD 值（OD600nm）。图 3A 为每种菌在三种处理后的 OD 值，图 3B 为每种细菌在血清处理和血清中加入甘氨酸处理后的杀菌倍数比较。从图可以看出，血清对不同细菌的杀菌效果是不一样的，对大肠杆菌 K12 BW25113、乙型溶血性链球菌和绿脓杆菌具有一定的杀菌作用，而对其他几种细菌反而有促进生长作用；但是在添加甘氨酸后，血清对所有细菌均具有显著杀菌作用，其增强杀菌作用都在 1 倍以上，最高可达 4.13 倍。

[66] **实施例 4**

[67] 甘氨酸提高不同进化层次物种血清 / 血浆对其主要病原菌的杀菌效果

[68] 按照实例 1.1 方法培养多种细菌（大肠杆菌 K12 BW25113，大肠杆菌 Y17 临床菌，溶藻弧菌，副溶血弧菌，绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌），分别收集 3 毫

升 OD600 为 1.0 的每种细菌,然后分别分为 2 组:添加 100 微升不同动物血清 / 血浆组和 100 微升不同动物血清 / 血浆加 100mM 甘氨酸组。同时以添加 100mM 甘氨酸为对照。37°C 200rpm 振荡培养,4 小时后离心收菌,用 1 毫升生理盐水将菌体重悬,测定 OD 值 (OD600nm)。图 4 为不同进化层次动物的主要病原菌在血清 / 血浆处理和血清 / 血浆中加入甘氨酸处理后的 OD 值。从图可以看出,虽然不同进化层次动物的血清 / 血浆对其主要病原菌有一定的杀菌作用,但在添加甘氨酸后,血清 / 血浆对细菌的杀菌作用显著增强,其杀菌作用增加最低的为 1.5 倍,最高的可高达近 10 倍,这些结果表明甘氨酸可以明显提高不同进化动物的血清 / 血浆对其主要病原菌的杀菌作用。

[69] **实施例 5**

[70] 甘氨酸可以提高小鼠对大肠埃希菌的清除作用

[71] 将 6 周龄小鼠共 15 只 (购买于中山大学东校区实验动物中心) 随机分为 3 组,生理盐水对照组和 2 种浓度 (3.25 和 6.5 毫克 / 只) 的甘氨酸给药处理组。采用静脉注射给药的方式,按照 3.25 和 6.5 毫克甘氨酸 / 次 / 只,两次给药时间间隔 12 小时,连续给药 6 次;停药 12 小时后静脉分别注射大肠埃希菌 K12 BW25113 和大肠埃希菌 Y17 (临床分离菌株),剂量为 1×10^6 个细菌 / 只的细菌,48 小时后小鼠尾静脉取血,梯度稀释后平板计数,检测细菌被清除情况。图 5A 和 B 是小鼠血清中注射 2 种甘氨酸浓度后细菌数量和体内细菌生存率。从此结果可以看出,当给小鼠注射甘氨酸后,小鼠体内细菌数量明显减少。对于大肠杆菌 K12 BW25113 来说,注射 3.25 毫克时清除率为 89.32%,6.5 毫克时清除率达到 96.85%。对于大肠杆菌 Y17 临床菌来说,注射 3.25 毫克时清除率为 32.95%,6.5 毫克时清除率达到 52.53%。这些结果表明甘氨酸提高了血清对细菌的清除作用,而且随着加入量的增加,清除作用加强。

[72] **实施例 6**

[73] 苏氨酸可提高大肠埃希菌对血清的敏感性

[74] 将制备好的细菌样本分成 4 组:添加 100mM 苏氨酸组、100 微升人血清组、100 微升人血清和 100mM 苏氨酸组、生理盐水对照组,37°C 200rpm 振荡培养,在 2 小时离心收菌,用 1 毫升生理盐水将菌体重悬,测定 OD 值 (OD600

)。存活率计算公式为：加入血清和 / 或苏氨酸处理后 OD 值 / 加生理盐水对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。图 6 为 3 个实验组在不同时间的存活率，从图可见，只加入苏氨酸没有杀菌效果，当只加入血清时会有一定的杀菌效果，而当在血清中加入苏氨酸时，杀菌效果明显增增加了 1.5 倍。

权利要求书

- [权利要求 1] 氨基酸或其衍生物在制备提高血清或血浆或全血杀菌作用药物方面的应用，所述的氨基酸为 甘氨酸，苏氨酸或丝氨酸。
- [权利要求 2] 氨基酸或其衍生物在制备注射用杀菌剂方面的应用，所述的氨基酸为 甘氨酸，苏氨酸或丝氨酸。
- [权利要求 3] 氨基酸或其衍生物，与血清或血浆或全血联用在制备杀菌药物方面的应用，所述的氨基酸为 甘氨酸，苏氨酸或丝氨酸。
- [权利要求 4] 一种杀菌药物组合物，其特征在于含有氨基酸和血清 / 血浆 / 全血，所述的氨基酸为 甘氨酸，苏氨酸或丝氨酸。
- [权利要求 5] 如权利要求 4 所述的组合物，其特征在于所述的血清和甘氨酸的比例以重量计为 1:1-3000。
- [权利要求 6] 如权利要求 1-4 任一所述的应用或组合物，其特征在于所述的细菌为革兰氏染色阴性或阳性的病原菌；所述的氨基酸为甘氨酸。
- [权利要求 7] 如权利要求 5 任一所述的应用，其特征在于所述的细菌为金黄色葡萄球菌、迟钝爱德华菌、溶血性链球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌或弧菌。
- [权利要求 8] 如权利要求 1、3 或 4 任一所述的应用或组合物，其特征在于所述的血清或血浆或全血来源于哺乳动物、鱼类或禽类。
- [权利要求 9] 一种杀菌方法，其特征在于：将氨基酸和血清 / 血浆 / 全血联用，或氨基酸衍生物和血清 / 血浆 / 全血联用，所述的氨基酸为 甘氨酸，苏氨酸或丝氨酸。
- [权利要求 10] 如权利要求 9 所述的杀菌方法，其特征在于：将血清和氨基酸以重量计 1:1-3000 的比例混合，用于杀灭革兰氏阴性菌或阳性菌；杀菌所用时间为 0.1~24 小时。

说明书附图

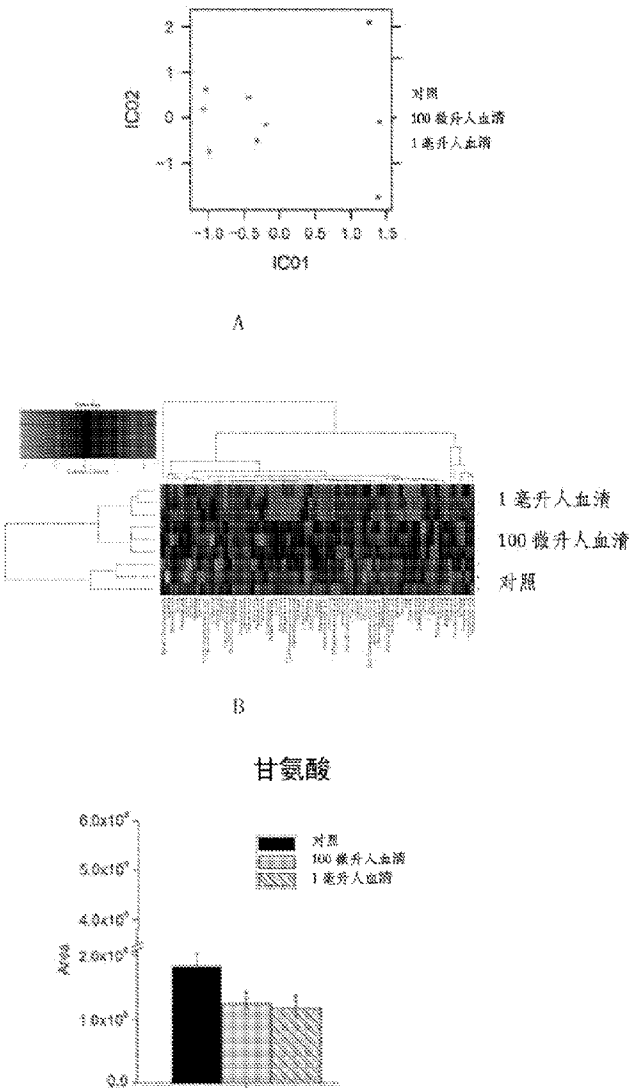


图 1

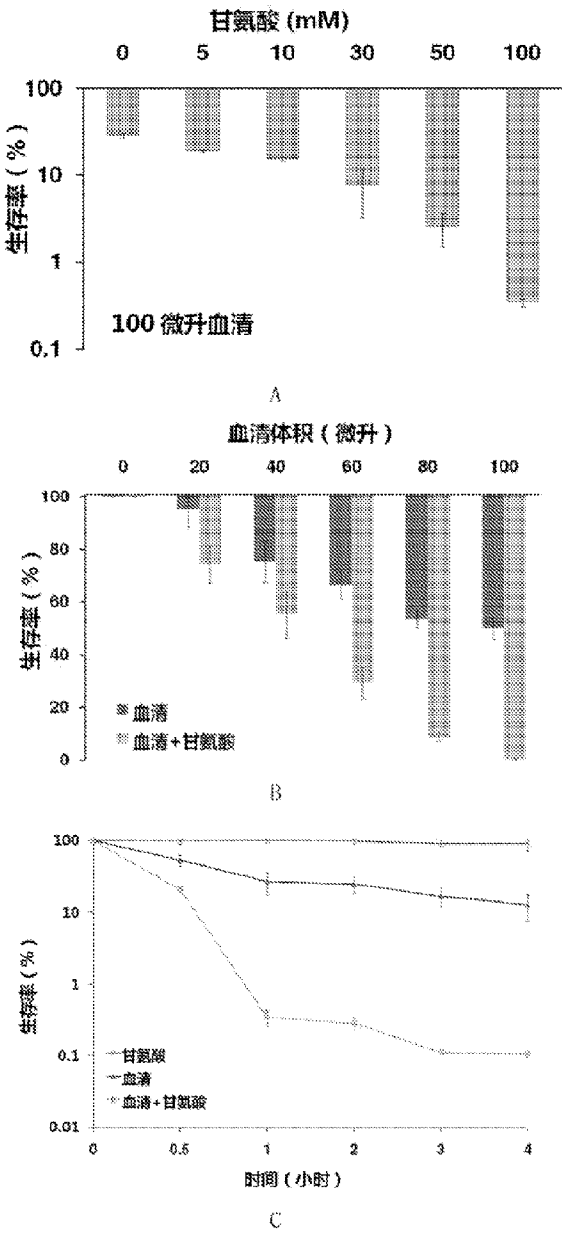


图 2

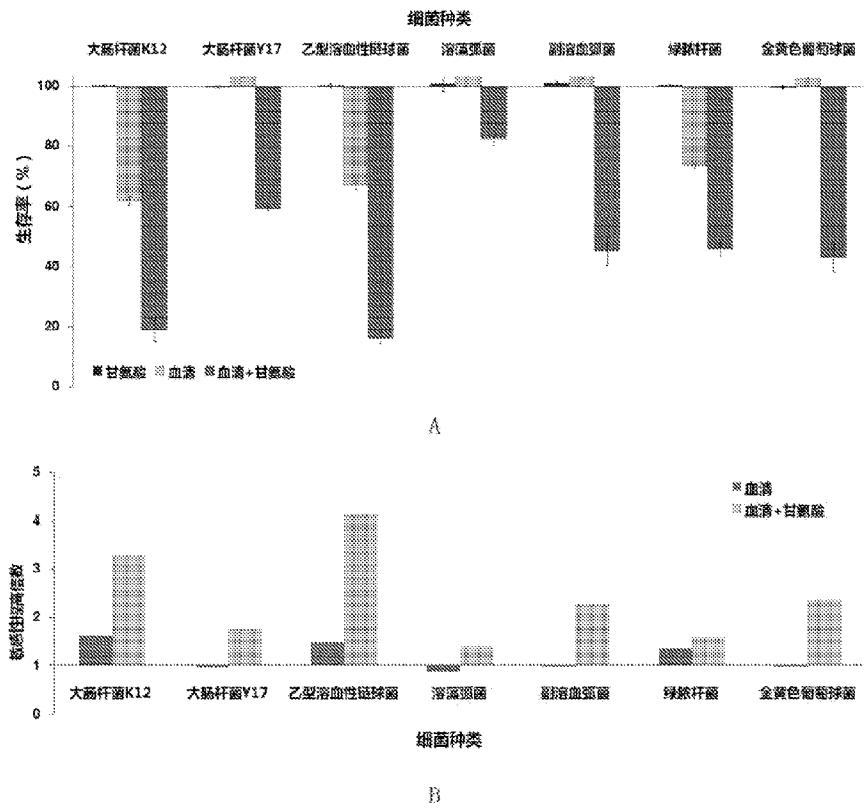


图 3

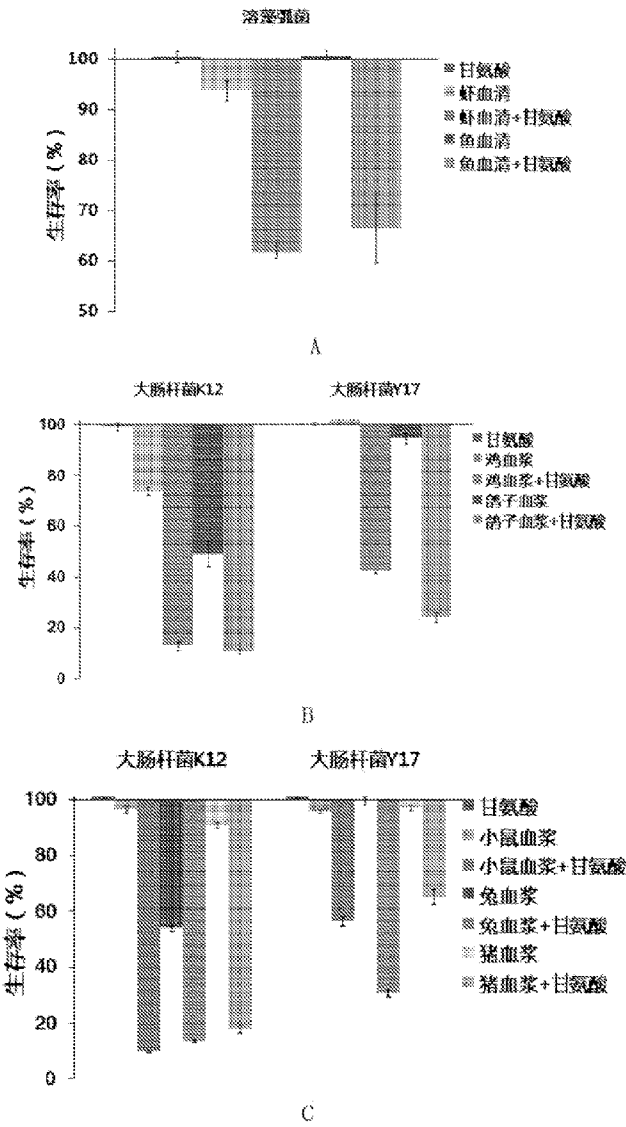


图 4

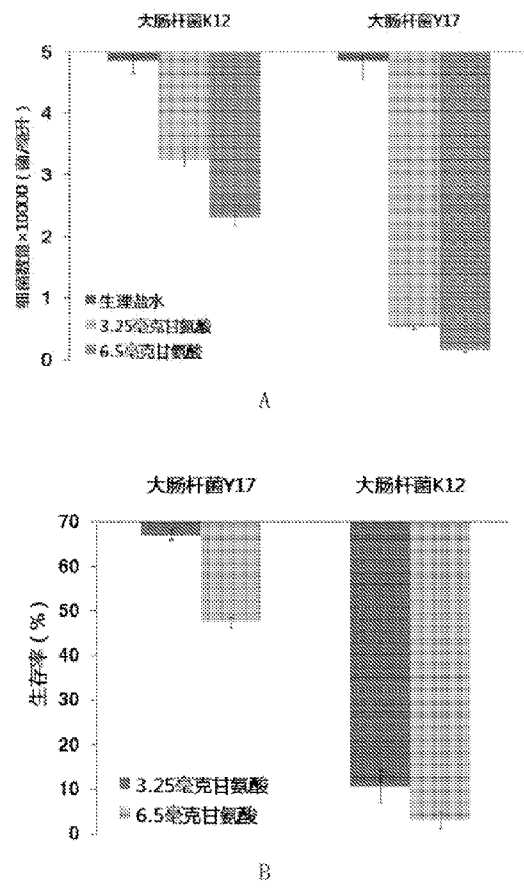


图 5

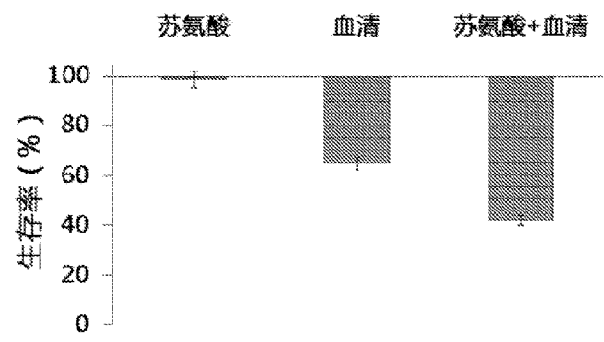


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/070429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: 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, CPRSABS, CNABS, CNTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR: glycine, threonine, serine, amino acid?, blood, serum, plasm?, bacteri??

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101827612 A (UNITED THERAPEUTICS CORPORATION), 08 September 2010 (08.09.2010), see claims, and description, paragraph [0034]	2, 6
Y		1, 3-5, 7-10
X	CN 102791262 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE), 21 November 2012 (21.11.2012), see claims 1, 6 and 20, and description, paragraphs [0010], [0051], [0063] and [0085]	2
Y		1, 3, 4, 8-10
Y	Lack of bactericidal activity against E. coli in serum of hepatic cirrhosis patients, FOREIGN MEDICAL INFORMATION, 1980, no. 4, page 71	1, 3-5, 7-10
Y	LIU, Taotao et al., Changes in Phospholipase A ₂ in Blood of Rat Bacterial Infection Model, CHINESE JOURNAL OF NOSOCOMIOLOGY, 2003, vol. 13, no. 1, pages 10-12	1, 3, 4, 8, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 29 September 2013 (29.09.2013)	Date of mailing of the international search report 17 October 2013 (17.10.2013)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LU, Chun Telephone No.: (86-10) 62411048

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/070429

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101827612 A	08.09.2010	WO 2009033039 A9	25.06.2009
		KR 20100074169 A	01.07.2010
		JP 2010538092 A	09.12.2012
		US 7999007 B2	16.08.2011
		WO 2009033039 A2	12.03.2009
		EP 2200650 A2	30.06.2010
		US 2009081319 A1	26.03.2009
		IN 201001357 P4	03.09.2010
		CA 2698721 A1	12.03.2009
		US 2011144204 A1	16.06.2011
CN 102791262 A	21.11.2012	WO 2011085326 A1	14.07.2011
		KR 20120113259 A	12.10.2012
		AU 2011203862 A1	26.07.2012
		EP 2521542 A1	14.11.2012
		US 2013071439 A1	21.03.2013
		IN 201201944 P2	22.03.2013
		MX 2012008017 A	31.10.2012
		JP 2013516492 W	13.05.2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/070429

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/198 (2006.01) i

A61K 35/16 (2006.01) i

A61K 35/14 (2006.01) i

A61P 31/04 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2013/070429

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: 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, CPRSABS, CNABS, CNTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR:

甘氨酸, 氨基乙酸, 苏氨酸, 丝氨酸, 氨基酸, 血清, 血浆, 血, 细菌, glycine, threonine, serine, amino acid?, blood, serum, plasm?, bacteri??

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X Y	CN 101827612 A (联合治疗公司), 08.9 月 2010 (08.09.2010), 见权利要求书、说明书[0034]段。	2, 6 1, 3-5, 7-10
X Y	CN 102791262 A (哈佛大学校长及研究员协会), 21.11 月 2012 (21.11.2012), 见权利要求 1、6、20, 说明书[0010]、[0051]、[0063]和[0085]段。	2 1, 3, 4, 8-10
Y	肝硬化病人血清缺乏对大肠杆菌的杀菌活性, 国外医学情报, 1980, 第 4 期, 第 71 页。	1, 3-5, 7-10
Y	刘滔滔等, 大鼠细菌感染模型血中磷脂酶 A 2 变化的研究, 中华医院感染学杂志, 2003, 第 13 卷, 第 1 期, 第 10—12 页。	1, 3, 4, 8, 9

☐ 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
29.9 月 2013 (29.09.2013)

国际检索报告邮寄日期
17.10 月 2013 (17.10.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

陆纯
电话号码: (86-10) 62411048

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/070429

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101827612 A	08.09.2010	WO 2009033039 A9	25.06.2009
		KR 20100074169 A	01.07.2010
		JP 2010538092 A	09.12.2012
		US 7999007 B2	16.08.2011
		WO 2009033039 A2	12.03.2009
		EP 2200650 A2	30.06.2010
		US 2009081319 A1	26.03.2009
		IN 201001357 P4	03.09.2010
		CA 2698721 A1	12.03.2009
		US 2011144204 A1	16.06.2011
CN 102791262 A	21.11.2012	WO 2011085326 A1	14.07.2011
		KR 20120113259 A	12.10.2012
		AU 2011203862 A1	26.07.2012
		EP 2521542 A1	14.11.2012
		US 2013071439 A1	21.03.2013
		IN 201201944 P2	22.03.2013
		MX 2012008017 A	31.10.2012
		JP 2013516492 W	13.05.2013

主题的分类

A61K 31/198 (2006.01) i

A61K 35/16 (2006.01) i

A61K 35/14 (2006.01) i

A61P 31/04 (2006.01) i