



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91102223.6

[51] Int.Cl⁵

A61K 37/02

[43] 公开日 1991 年 10 月 2 日

[22] 申请日 91.2.23

[30] 优先权

[32] 90.2.23 [33] US [31] 07 / 484,020

[32] 91.2.19 [33] US [31] 07 / 655,321

[71] 申请人 布里斯托尔-米尔斯·斯奎布公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 理查德·P·达维尤

詹姆斯·J·布雷克

韦斯科·L·克塞德

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 唐伟杰

说明书页数: 57

附图页数: 8

[54] 发明名称 由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物
引起的感染的治疗方法及其组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种治疗由对含有两种或多种活性剂的 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的组合物和方法。在一个实施方案中,本组合物含有(1)一种 β -内酰胺抗生素和(2)一种阳离子寡肽。在另一个实施方案中,本发明也涉及一种含有(1)能抑制肠杆菌科细菌生长的 β -内酰胺抗生素和(2)至少一种膜活性物质的组合物。另外,本发明还涉及一种体外筛选可能的杀菌组合物的改良方法,其中包含活性补体级联组份。

权 利 要 求 书

1. 一种制备治疗对 β -内酰胺抗菌素敏感的微生物引起感染的组合物的方法,其特征为将(a)一种能抑制微生物生长的 β -内酰胺抗生素与(b)阳离子寡肽和药物载体混合。

2. 权利要求1所述方法,其中 β -内酰胺抗生素选自青霉素、头孢菌素、carbapenem、单菌霉素、头霉素、pyrazidon和penem。

3. 权利要求2所述方法,其中 β -内酰胺抗生素是头孢菌素。

4. 权利要求3所述方法,其中头孢菌素选自cefepime、头孢氨噻(cefotaxime)和头孢噻甲羧肟(ceftazidime)。

5. 权利要求2所述方法,其中 β -内酰胺抗生素是carbapenem。

6. 权利要求5所述方法,其中carbapenem是imipenem。

7. 权利要求2所述方法,其中 β -内酰胺抗生素是指单菌霉素。

8. 权利要求7所述方法,其中单菌霉素是aztreonam。

9. 权利要求1所述方法,其中阳离子寡肽选自magainin、cecropin、肌毒素(sarcotoxin)、线粒体前体蛋白和其片段,类似物及衍生物。

10. 权利要求9所述方法,其中阳离子寡肽是magainin。

11. 权利要求10所述方法,其中magainin选自magainin 1和magainin 2。

12. 权利要求1所述方法,其中阳离子寡肽是人血小板因子-4或其片段,类似物或衍生物。

13. 权利要求12所述方法,其中人血小板因子-4的片段是

具有下列序列的0—13肽:

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1)

14。权利要求1所述方法,其中阳离子寡肽在脂/水的界面存在下,形成一个双亲的 α 螺旋。

15。权利要求14所述方法,其中阳离子寡肽至少有11个氨基酸长。

16。权利要求14所述方法,其中阳离子寡肽实质上是相当于一个氨基酸残基序列,其含有:

aa₁-Leu-Tyr-Lys-Lys-aa₂-aa₂-Lys-Lys-Leu-Leu-aa₃-aa₄-X;

其中aa₁是Pro、Ala或Lys, aa₂是Ile或Leu, aa₃是Glu或Lys, aa₄是Ser、Leu或Lys,而X是在自然状态呈 α 螺旋的五氨基酸序列,并且具有aa₅-Lys-Lys-aa₆-Gly的一般序列,其中aa₅是Ala或Leu,而aa₆是Leu或Phe。

17。权利要求16所述方法,其中阳离子寡肽含有一个选自下列的氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #8);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly (Seq. I.D. #10);
Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和
Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. # 12).

18. 权利要求14所述方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;

其中氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

19. 权利要求15所述方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸序列:

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly.

20. 一种治疗由肠杆菌科细菌引起之感染的方法, 其包括 (a) 能抑制肠杆菌科细菌生长的 β -内酰胺抗生素, (b) 膜活性物质。

21. 权利要求20所述方法, 其中 β -内酰胺抗生素选自青霉素、头孢菌素、carbapenem、单菌霉素、头霉素、Pyrazidon 和Penem。

22. 权利要求21所述方法, 其中 β -内酰胺抗生素是头孢菌

素。

23. 权利要求22所述方法, 其中头孢菌素选自 cefepime、头孢氨噻、头孢塞甲羧肟。

24. 权利要求21所述方法, 其中 β -内酰胺抗生素是 carbapenem。

25. 权利要求24所述方法, 其中 Carbapenem 是 imipenem。

26. 权利要求21所述方法, 其中 β -内酰胺抗生素是单菌霉素。

27. 权利要求26所述方法, 其中单菌霉素是 aztreonam。

28. 权利要求20所述方法, 其中膜活性物质是阳离子寡肽。

29. 权利要求28所述方法, 其中阳离子寡肽是 magainin。

30. 权利要求29所述方法, 其中 magainin 选自 magainin 1 和 magainin 2。

31. 权利要求26所述方法, 其中阳离子寡肽是人血小板因子-4 或其片段, 类似物或衍生物。

32. 权利要求31所述方法, 其中人血小板因子-4 的片段是
具有下列序列的0—13肽:

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1).

33. 权利要求28所述方法, 其中阳离子寡肽在脂/水的界面存在下形成一个双亲的 α 螺旋。

34. 权利要求33所述方法, 其中阳离子寡肽至少有11个氨基酸残基长。

3 5. 权利要求3 3所述方法, 其中阳离子寡肽实质上相应于一个氨基酸残基序列, 其包含:

aa₁-Leu-Tyr-Lys-Lys-aa₂-aa₂-Lys-Lys- Leu-Leu-aa₃-aa₄-X

其中aa₁是Pro、Ala或Lys, aa₂是Ile或Leu, aa₃是Glu或Lys, aa₄是Ser、Leu或Lys, 而X是在自然状态下呈 α 螺旋的五氨基酸序列, 且含有一般序列: aa₅—Lys—Lys—aa₆—Gly, 其中aa₅是Ala或Leu, 且aa₆是Leu或Phe。

3 6. 权利要求3 5所述方法, 其中阳离子寡肽含有选自下列的氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #8);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly (Seq. I.D. #10);

Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和

Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. # 12).

3 7. 权利要求 3 3 所述方法, 其中阳离子寡肽包含氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;

其中氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

3 8. 权利要求 3 4 所述方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly.

3 9. 一种用于治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的组合物, 其含有 (a) cefepime 和 (b) magainin 2。

4 0. 一种用于治疗由大肠杆菌引起之感染的组合物, 其含有 (a) cefepime 和 (b) 含下列氨基酸残基序列的人血小板因子-4 的 C-13 肽:

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1).

4 1. 一种用于治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的组合物, 其含有 (a) cefepime 和 (b) 阳离子双亲性 α -螺旋寡肽。

4 2. 权利要求 4 1 所述组合物, 其中寡肽至少有 11 个氨基酸残基长。

4 3. 权利要求 4 2 所述组合物, 其中寡肽实际上相当于一个氨基酸残基序列, 其含有:

aa₁-Leu-Tyr-Lys-Lys-aa₂-aa₂-Lys-Lys-Leu-Leu-aa₃-aa₄-X

其中 aa_1 是 Pro、Ala 或 Lys, aa_2 是 Ile 或 Leu, aa_3 是 Glu 或 Lys, aa_4 是 Ser、Leu 或 Lys, 而 X 是在自然状态下呈 α 螺旋的五氨基酸序列, 且含有一般序列: aa_5 —Lys—Lys— aa_6 —Gly, 其中 aa_5 是 Ala 或 Leu, 而 aa_6 是 Leu 或 Phe。

44. 权利要求 43 所述组合物, 其中阳离子寡肽含有选自下列的氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #8);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly (Seq. I.D. #10);

Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和

Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #12).

45. 权利要求 44 所述组合物, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly

其中氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

46. 权利要求42所述组合物，其中阳离子寡肽含有下列氨基酸残基序列：

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly.

47. 一种用于治疗由大肠杆菌引起之感染的组合物，其含有 (a) aztreonam 和 (b) magainin 2。

48. 一种治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的方法，其包括给患者使用在用药一段时间后能有效抑制微生物生长的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有 (a) 能抑制微生物生长的 β -内酰胺抗生素和 (b) 阳离子寡肽。

49. 权利要求48的方法，其中 β -内酰胺的量是亚抑制剂量。

50. 权利要求48的方法，其中 β -内酰胺选自青霉素、头孢菌素、carbapenem、单菌霉素、头霉素、pyrazidon 和 penem。

51. 权利要求48的方法，其中阳离子寡肽选自 magainin、cecropin、肌毒素 (sarcotoxin)、线粒体前体蛋白及其片段、类似物和衍生物。

52. 权利要求48的方法，其中阳离子寡肽是人血小板因子-4 片段，类似物或衍生物。

53. 权利要求52的方法，其中人血小板因子-4 的片段是一个具有下列氨基酸残基序列的 C-13 肽：

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1).

54. 权利要求48的方法，其中阳离子寡肽在脂/水界面存在下形成一个双亲性 α 螺旋。

55. 权利要求54的方法，其中阳离子寡肽至少有11个氨基酸残基长。

56. 权利要求55的方法，其中阳离子寡肽实际上相应于一个含有下列序列的氨基酸残基序列：

aa1-Leu-Tyr-Lys-Lys-aa2-aa2-Lys-Lys-Leu-Leu-aa3-aa4-X

其中aa1是Pro、Ala或Lys，aa2是Ile或Leu，aa3是Glu或Lys，aa4是Ser、Leu或Lys，而X是在自然状态下呈 α 螺旋的五氨基酸序列，且含有一般序列：aa5—Lys—Lys—aa6—Gly，其中aa5是Ala或Leu，且aa6是Leu或Phe。

57. 权利要求56的方法，其中阳离子寡肽含有一个选自下列的氨基酸残基序列：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #8);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-

Phe-Gly (Seq. I.D. #10);

Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和

Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #12).

58. 权利要求57的方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;

其中氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

59. 权利要求55的方法, 其中阳离子寡肽含有下列序列:

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly.

60. 一种治疗肠杆菌科细菌感染的方法, 包括给患者使用在用药一段时间后足以有效地抑制细菌生长的, 治疗上有效量的组合物, 该组合物含有 (a) 能抑制肠杆菌科细菌生长的 β -内酰胺抗生素, 和 (b) 至少一种膜活性物质。

61. 权利要求60的方法, 其中 β -内酰胺抗生素的剂量是亚抑制剂量。

62. 权利要求60的方法, 其中 β -内酰胺抗菌素选自青霉素、头孢菌素、carbapenem、单菌霉素、头霉素、pyrazidon和penem。

63. 权利要求60的方法, 其中膜活性物质是阳离子寡肽。

64. 权利要求63的方法, 其中阳离子寡肽选自magainin、

cecropin、肌毒素(sarcotoxin)，线粒体前体蛋白、其片段、类似物，和衍生物。

65。权利要求63的方法，其中阳离子寡肽是人血小板因子—4，其片段、类似物或衍生物。

66。权利要求65的方法，其中人血小板因子—4的片段是一个含有下列氨基酸残基序列的C—13肽，

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1).

67。权利要求63的方法，其中阳离子寡肽是一个在脂/水界面存在下的双亲性 α —螺旋。

68。权利要求67的方法，其中阳离子寡肽至少有11个氨基酸残基长。

69。权利要求68的方法，其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列：

aa1-Leu-Tyr-Lys-Lys-aa2-aa2-Lys-Lys-Leu-Leu-aa3-aa4-X

其中aa1是Pro、Ala或Lys，aa2是Ile或Leu，aa3是Glu或Lys，aa4是Ser、Leu或Lys，而X是在自然状态下呈 α —螺旋的五氨基酸序列且含有一般序列：aa5—Lys—Lys—aa6—Gly，其中aa5是Ala或Leu，aa6是Leu或Phe。

70。权利要求69的方法，其中阳离子寡肽含有一个选自下列的氨基酸残基序列：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #8);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly (Seq. I.D. #10);

Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和

Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #12).

7 1. 权利要求 6 9 的方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly,

其中氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

7 2. 权利要求 6 8 的方法, 其中阳离子寡肽含有氨基酸残基序列:

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly.

7 3. 一种治疗由大肠杆菌引起细菌感染的方法, 包括给患者使

用足以有效地抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有：(a) cefepime 和 (b) magainin 2。

74。一种治疗由大肠杆菌引起之细菌感染方法，包括给患者使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的治疗上有效量的组合物，该组合物含有：(a) cefepime 和 (b) 包含下列氨基酸残基序列的人血小板因子—4 的 C—13 肽：

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser; (Seq. I.D. #1)

75。一种治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的方法，包括给患者使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有 (a) cefepime 和 (b) 包含下列氨基酸残基序列的阳离子寡肽：

Ala—Leu—Tyr—Lys—Lys—Leu—Leu—
Lys—Lys—Leu—Leu—Lys—Ser—Ala—Lys
—Lys—Leu—Gly (序列标号 #7)

76。一种用于治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的方法，包括给患者使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有 (a) cefepime 和 (b) 包含下列氨基酸残基序列的阳离子寡肽：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;

其中所有的氨基酸残基是 α—氨基酸。

77。一种治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的方法，包括给患者

使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有 (a) cefepime 和 (b) 包含下列氨基酸残基序列的阳离子寡肽：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

78. 一种治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的方法，包括给患者使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物有 (a) cefepime 和 (b) 包含下列氨基酸残基序列的阳离子寡肽：

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly

79. 一种治疗由大肠杆菌引起之细菌感染的方法，包括给患者使用足以有效抑制细菌生长之一段时间的、治疗上有效量的组合物，该组合物含有 (a) aztreonam 和 (b) MGN 2。

80. 一种体外用活性补体筛选具有抗菌活性组合物的方法，其包括：(a) 把被筛选的组合物与靶细菌和活性补体级联组份合并；(b) 检测组合物对靶细菌的抗菌活性。

81. 权利要求80的方法，其中在合并步骤前用亚最小抑菌浓度的 β -内酰胺抗生素预处理靶细菌。

82. 权利要求80的方法，其中活性补体级联组份是血清提供的。

由对 β -内酰胺抗生素
敏感的微生物引起的感
染的治疗方法及其组合物

本发明涉及含有至少两个组分的组合物，这两个组分在体内以协同的形式作用，并且在治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起的感染中是有效的。本发明进一步包含了通过使用有效剂量的这种组合物来治疗被感染的病人的方法，以及在体外活性补体存在下根据抗菌活性筛选组合物的方法。

在危重病人中，细菌感染仍是病人死亡的主要原因，基本上是死于革兰氏阴性菌感染 (Klatersky et al., 1988, Eur J. Cancer Clinical Oncology, 2451: 535—545)。这些病人身上发生感染后，进展迅速，并且常常是致命的。

接受化学治疗的病人常常有一个低水平的粒性白细胞数，即出现粒性白细胞减少症，并特别容易遭受细菌感染 (Klatersky, 1986, Am. J. Med, 80: 2—12)。感染这些病人的最常见的微生物是革兰氏阴性杆状菌如大肠杆菌，铜绿色假单孢菌，

肺炎克氏杆菌和革兰氏阳性球菌如金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。

其它的对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都敏感的病人多是那些经受胃肠道的外科手术 (Bergamini and Polk, 1989, J. Antimicrobial Chemotherapy 23: 301—303) 的，可是其它外科手术的病人也有这种感染的危险，当前，抗生素对这些病人是唯一有效的疗法。

2. 1 β -内酰胺抗生素

在这些病人的治疗中已证明有效其它抗菌素是 β -内酰胺抗生素,它能够抑制细菌细胞壁的合成。 β -内酰胺抗生素的一般性质是它们能杀死多种不同的细菌。这是一个重要的特征,因为经常实际上不能确定是哪种细菌引起的疾病。另外,抗生素治疗大多数常常在对传染微生物作出诊断之前就开始了,因为在这些病人发生的细菌感染常常能很快使病人致死。 β -内酰胺抗生素的例子包含青霉素类,头孢菌素类,头霉素类,单菌霉素类, *pirazidons*, *penems*, *carbapenems*。已经观察到低浓度的青霉素类可诱导大肠杆菌鞭毛生成。而膨胀和细胞溶解则发生在有较高的抗生素浓度的情况下(参见 *Waxman and Strominger*, 1983, *Annual Rev. Biochem.* 52: 825~869)。也已经表明 β -内酰胺抗生素的靶目标是肽葡聚糖转肽酶,并证明了细菌细胞膜上的许多与青霉素及相关 β -内酰胺抗生素共价结合之蛋白质的多重性。

青霉素 G 可有效地抑制革兰氏阳性球菌如肺炎球菌和链球菌,以及革兰氏阴性球菌如脑膜炎奈氏球菌 (*New*, 1987, *Medical Clinics of North America* 71: 1051—1064)。起初,氨基青霉素类如氨苄青霉素和羟氨苄青霉素被广泛地用于治疗由流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*), 大肠杆菌 (*E. coli*), 沙门氏菌和志贺氏菌引起的感染。然而已经观察到,在这些微生物中质粒介导的 β -内酰胺酶越来越普遍存在。已表明头孢菌素有抗铜绿假单胞菌,由常见病原体引起的脑膜炎和由多抗性微生物引起的感染的活性,尽管对这些药剂的抗性也在增加。另一类 β -内酰胺抗生素包括羧苄青霉素类,例如 *imipenem*,

它能抑制好氧的和厌氧的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌。已注意到 carbapenems 对与青霉素结合的蛋白质有高度的亲合力。

鉴于对 β -内酰胺抗生素抗性的不断增加,故也已给这些病人联合使用多种抗生素。已将氨基青霉素类与 Clavulanate 联合使用,后者是一种 β -内酰胺酶抑制剂,用以抑制存在于流感嗜血杆菌,大肠杆菌,沙门氏菌和志贺氏菌中的质粒介导的 β -内酰胺酶 (Neu, 1987, Medical Clinics of North America 71: 1051—1064)。 β -内酰胺类也可与氨基糖苷类结合使用 (Klastersky, 1986, Am. J. Med. 80: 2—13) 已发现这样的一个结合物是颇为有效的,其效果随这种联合用药所对抗细菌类型而异。已经发现 β -内酰胺与其它抗生素合用可导致两个化合物之间的拮抗作用。

有越来越多的报导表明,抗生素能够以除所期望的杀菌作用之外的方式影响细菌 (Darveau et al., 1990, J. Infect. Dis. 162: 914—921, Essig et al., 1982, Arch. Microbiol. 132: 245—250; Kadurugamuwa et al., 1988, Antimicrob. Agents and Chemother. 32: 364—368; Leying et al., 1986, Antimicrob. Agents and Chemother. 30: 475—480; Raponi et al., 1989, Antimicrob. Chemother. 23: 565—576; Sauerbaum et al., 1987, Antimicrob. Agents and Chemother. 31: 1106—1110; Taylor et al., 1981, Antimicrob. Agents and Chemother.

19 : 786—788; Taylor et al., 1982, Drugs Exptl. Clin. Res. 8 : 625—631 and Veringa et al., 1988, Drugs Exptl. Clin. Res. 14 : 1—8).

这些效果的某些例子包含抑制外源酶产生

(Grimwood et al., 1989, Antimicrob. Agents and Chemother. 33 : 41—47),

改变肽葡聚糖结构

(Garcia—Bustos and Dougherty, 1987, Antimicrob. Agents and Chemother. 31 : 178—182), 及失去侵染性粘附特征 (Schifferli and Beachey, 1988, Antimicrob. Agents and Chemother. 32 : 1603—1608 and Vosbeck et al., 1979, Rev. Inf. Dis. 1 : 845—851). 通常当细菌与低于最小抑制浓度 (MIC) 的抗生素一起培养时, 即可观察到这些效果。抗生素的亚抑制浓度的效果可以帮助宿主消灭细菌。这特别与 β —内酰胺抗生素相关, 已知抗生素的杀菌作用需花费相当长时间才能显示出来。

通常在整个治疗中, 抗生素的给药剂量要超过 MIC 水平。然而, 由于宿主和细菌两个因素, 如 β —内酰胺酶能够影响感染部位的活性抗菌素的量, 因此, 超最小抑制浓度 (MIC) 剂量对每种微生物达到足够的抗菌浓度不能保证。

2. 2 阳离子寡肽

已从人和动物来源中分离出来多种有抗菌能力的阳离子寡肽。这

些包含: magainin (Zasloff et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 5449—5453; Zasloff et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 910—913; and Zasloff, 1989, U. S. Patent No. 4, 810, 777); Cecropins (Christensen et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 5072—5076 and Stein et al., 1981, Nature (London) 292: 246—248); 肌毒素(sarcotoxins) (Nakajima et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 1665—1669 and Okada and Natori, 1985, Biochem. J. 229: 453—458); 和 defensins (Selsted et al., 1985, J. Clin. Investig. 76: 1436—1439 and Lehrer et al., U. S. Patent Nos. 4, 543, 252; 4, 659, 692 and 4, 705, 777)。

Magainins 是从爪蟾(Xenopus laevis, 一种南非有爪蟾)皮肤的分泌物中发现的。已分离了两种类型的 magainins, 即 magainin 1 和 magainin 2 (Zasloff et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 5449—5453)。Magainin 1 和 magainin 2 两者很相近, 每个都是23个氨基酸长, 所不同的只是两个氨基酸的取代。这些肽是水溶性的, 在其有效杀菌浓度是非溶血性的, 并且可能是两亲性的。已经发明在无血清培养基和缓

冲液中 magainin 活性所需的有效杀菌浓度与 magainin 和被处理的微生物呈函数关系。

也已研究各种合成的 magainin 类似物的杀菌活性 (Cuervo et al . , 1988, Peptide Research 1 : 81—86; Zasloff et al . , 1988, Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 85 : 910—913; and Chen et al . , 1988, Antimicrobial Peptides and Processes for Making the Same , PAT—APPL—7—280, 363 National Technical Information Service)。发现除去 magainin 2 之 N—末端的三个氨基并不影响杀菌活性 (Zasloff et al . , 1988, Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 85 : 910—913)。但除去第四个氨基酸却明显地降低杀菌活性。已发现 magainin 1 中的整个 N—末端区是必不可少的 (Cuervo et al . , 1988, Peptide Research 1 : 81—86)。然而, 删除 C 末端区, 特别是残基丙氨酸—15, 甘氨酸—18 或谷氨酸—19 而又具有与原始 magainin 1 或 magainin 2 相关之等同的或提高之杀菌活性的类似物, 即具有可变的溶血作用 (Cuervo et . al . , 1988, Peptide Research 1 : 81—86)。已发现其中有低螺旋结构形式倾向的氨基酸残基被有高螺旋结构形式倾向的氨基酸残基取代了的 magainin 肽类似物, 降低了对肽链端解酶的敏感性, 并增强两亲性结构特征及抗菌性质 (Chen et al . , 1988, Antimicrobial Peptides and Processes for Making the Same , PAT—APPL—7—

280, 363 National Technical Information Service)。

已经从昆虫中分离出来两类阳离子寡肽，即 Cecropins 和肌毒素类。已经从不同种昆虫中分离出 Cecropins (Christensen et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 5072—5076 and Stein et al., 1981, Nature (London) 292: 246—248)。已经分离出三个主要的 Cecropins，即分别有 37、36 和 36 个残基，各有一个两亲性特性的 Cecropin A、B 和 D。已经发现 N—末端区对于导致这种肽的膜破裂能力是必须的。已发现三种肌毒素是在戟形麻蝇 (Sarcophaga Peregrina) 的血淋巴中被诱导的。

也已从人来源分离出被称为防御素的自杀菌活性的阳离子寡肽 (Selsted et al., 1985, Clin. Invest. 76: 1436—1439 and Lehrer et al., U. S. Patent Nos. 4,543,252; 4,659,692 and 4,705,777)。发现这类肽在巨噬细胞和粒性白细胞中，并具有高半胱氨酸和精氨酸的含量。已鉴定了六种这样的蛋白质。

也已显示线粒体蛋白质前体的肽片段有抗革兰氏阳性菌的活性 (Lee et al., 1986, Biochem. Biophys. Acta 862: 211~219)。在磷脂脂质体存在下，这些肽的 CD 谱表明，杀菌活性通常与 α 螺旋的两亲性含量有平行关系。

迄今所检验的抗微生物阳离子寡肽均展示某些共同的特征。基本上，通过常规体外分析确定他们是能杀死各种不同细菌的阳离子肽。一些明显的证据表明，其作用机制是通过插入到细菌内膜形成一个小

孔, 以允许小离子通过 (Christensen et al ., 1988, Proc Natl . Acad . Sci . U . S . A . 85 : 5072—5076; Nakajima et al ., 1987, J . Biol . Chem . 262 : 1665—1669; Okada and Natori , 1985, Biochem . J . 229 : 453—458; and Westerhoff et al ., 1989, Biochem . Biophys . Acta . 975 : 361—369).

这种离子载体活性通过抑制对氧化磷酸化作用必不可少的质子梯度形成来阻断ATP的产生 (Okada and Natori , 1985, Biochem , J . 229 : 453—458; and Westerhoff et al ., 1989, Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 86 : 6597—6601).

按照这一作用机制, 已显示有几种这样的肽在有机溶剂中具有 α 螺旋结构 (Lehrer et al , U . S . Patent Nos . 4, 543, 252; 4, 659, 692 and 4, 705, 777; Westerhoff et al ., 1989, Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 86 : 6597—6601; and Marion et al ., 1988, FEBS Letters 227 : 21—26), 并在人工膜系统中形成小孔 (Christensen et al , 1988, Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 85 : 5072—5076 and Cruciani et al ., 1988, Biophysical J . 53 : 9a).

为了使 magainin 或相似的化合物能有效地用于治疗可能导致菌血症的细菌感染, 它们必须能在人血清存在下发挥其杀菌作用。

这就提出了一个棘手的问题，因为已证明至少有一种人防御素 (defensin) 能被人血清完全失活 (Paher et al . , 1986, J. Virol 60 : 1068—1074)。

2. 3 血清对细菌生长的影响

许多细菌，特别是革兰氏阴性细菌会被新鲜血清杀死 (Feingold , 1969, J. Infections Dis 120 : 437~444)。已认识了补体激活的两个主要途径 (reviewed in Joiner et . al . , 1984, Ann Rev. Immunol , 2 : 461~491)。传统途径一般是通过抗体与抗原表面的相互作用被激活的。激活的第一步是补体蛋白质 C 1 与抗原结合之抗体的 F C 区结合，随后是激活 C 1 分子，紧接着传统的途径涉及使用所有补体蛋白，即 C 1—C 9，第二个途径，即另一个途径是通过其它血清蛋白与细菌结合和继之激活补体蛋白 C 3 这一途径然后以类似于传统途径的方式激活 C 9 补体蛋白。

已经观察到在没有早期成分的情况下可通过补体 C 5 b—9 的终末成分杀死细菌。使用纯化的补体成分 C 5，C 6，C 7，C 8 和 C 9 观察到差不多杀死 3 Log 深粗糙型明尼苏达沙门氏菌 (Salmonella minnesota) Re 595 并杀死 1 Log 粗糙型大肠杆菌 J 5 菌株 (参见 Joiner et . al . , 1984, Ann Rev. Immunol . 2 : 461~491)。已经证明补体介导的膜损伤和细胞溶解作用受到两亲的和管状的 C 5 b—9 复合物的在靶膜上自身组装的影响 (Podack and Tschopp , 1984, Mol. Immunol . 21 : 589—603)。似乎 C 5 b—9 可产生跨越细菌外和内膜的功能性孔 (Born and Bhadani ,

1986, Immunology, 59:139—145)。形成的透壁孔或通道允许快速 K^+ 流出,通过膜势能的破坏导致细胞死亡。

2.4 对有杀菌活性之组合物的体外选择方法

通常是使用体外方法筛选可能的杀菌组合物。这些方法与 Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition, Lennette, E. H. Ed in Chief, American Society for Microbiology, 1985 Pp. 959—989中所述者相似。某些参考文献中只是对培养基、缓冲液制备等稍作改动。对治疗感染之适当抗菌剂的选择要考虑许多方面,其中包括:(1)其它靶微生物的体外敏感性和(2)靶菌株与同种的其它成员之体外敏感性的相互关系。在体外抑制或杀死微生物所需的可能的抗生素的浓度和在体内治疗期间从体液中获得的浓度需在实验室中直接测得。

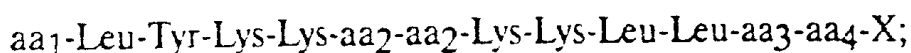
标准的敏感性测试方法包括园盘扩散、液体稀释和琼脂稀释。上述方法中的每一个都不包括构成活性补体级联的成分,因此,杀菌活性只与杀菌剂杀死靶微生物本身的能力有关。已经发现,某些具有体外杀菌活性的肽,当作包括人血清的体内试验时均失去效力,在体内也是无效的。Magainins 就是这一现象的一个例子。进一步地说,任何单独使用没有杀菌活性或有有限杀菌活性而只有提高血清补体的能力杀死细菌的组合物均应避免使用。

发明的总结

本发明涉及用于治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的组合物和方法。微生物可以是革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌。本发明的组合物包含在体内以协调的方式起作用的至少两个组分。本

发明组合物的一个组分是 β -内酰胺抗生素。此内酰胺抗生素可以是青霉素，头孢菌素，Cerbapenem，单菌霉素，Pyrazidom，头霉素或 Perem，更具体地说，头孢菌素是 Cefepime，头孢氨噻或头孢噻甲羧肟，Carbapenem 是 imipenem，且单菌霉素是 aztreonam。

本发明组合物的第二个组分是阳离子寡肽。与 β -内酰胺抗生素结合，用于提供协同组合物的阳离子寡肽包括 magainins，Cecropins、肌毒素，线粒体前体蛋白及这些肽的片段、类似物和衍生物。其它阳离子肽包括人血小板因子-4 (PF-4) 和其片段、类似物及衍生物，其中包括 PF-4 的 C-13 片段。另外，阳离子寡肽在脂/液界面存在下可形成一个两亲性螺旋。寡肽至少有 8 到 11 个氨基酸长，并且一般具有下示氨基酸残基序列：



其中 aa_1 是 Pro, Ala 或 Lys, aa_2 是 Ile 或 Leu, aa_3 是 Glu 或 Lys, aa_4 是 Ser、Leu 或 Lys, 且 X 是呈 α 螺旋的 5 个氨基酸序列，并有通式序列 $aa_5\text{-Lys-Lys-}aa_6\text{-Gly}$ ，其中 aa_5 是 Ala 或 Leu, 且 aa_6 是 Leu 或 Phe。用作举例的阳离子寡肽可以是：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
(Seq. I.D. #5);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
(Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
(Seq. I.D. #7);
Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-
Gly
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
(Seq. I.D. #8);
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly
(Seq. I.D. #10);
Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-
Leu-Gly (Seq. I.D. #11); 和
Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-
Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #12).

一个阳离子寡肽也能包括：

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-
Leu-Gly 等

其中，氨基酸残基可以是 α -氨基酸。

本发明进一步提供了用于治疗由肠杆菌科细菌，特别是大肠杆菌、阴沟肠杆菌和肺炎克氏杆菌引起之感染的组合物。本发明的组合物对治疗由铜绿色假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 引起的感染也是有效的。该组合物结合有上述的 β -内酰胺抗生素与一种膜活性物质。膜活性物质破坏膜的基本功能，如依赖于包括氧化磷酸化作用之质子移动力、基本运输等的膜功能。膜活性物质包括上面和下文中所述的阳离子寡肽。

本发明也提供了用于治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的治疗方法。对本发明组合物的治疗有反应的某些感染是由肠杆菌科特别是大肠杆菌引起的。在该治疗方法中，给病人定期使用

足以抑制细菌生长的治疗有效量的本发明之组合物。用于治疗由大肠杆菌引起的细菌感染的具体结合包括 Cefepime 与 magain 2, 血小板因子 4 的 C—13 肽和有如下氨基酸序列的阳离子寡肽结合:

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Sequence I.D. #6);

Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly (Seq. I.D. #7)

Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-Gly

dAla-dLeu-dTyr-dLys-dLys-dLeu-dLeu-dLys-dLys-dLeu-dLeu-dLys-dSer-dAla-dLys-dLys-dLeu-Gly.

本发明进一步提供了在体外用补体根据抗菌活性筛选组合物的方法。受试组合物在标准培养基中与靶细菌及活性补体级联成分结合, 经过足够时间后检测抗菌活性。活性补体成分可以单独地作为血清或补体级联成分被加入。但优选的是人血清。

通过下面的详细描述, 实施例和权利要求, 本发明的优点和益处将对本领域的专业人员来说是显而易见的。

附图说明

图 1 显示 magainin 2 在缓冲液中杀死未处理的和 Cefepime 改造的大肠杆菌。大肠杆菌 ATCC 25922 在加 (Cefepime 改变的) 和不加 (未处理的) $1/4$ MIC Cefepime ($0.016 \mu\text{g}/\text{ml}$ Cefepime) 条件下生长到对数生长中期。按后述方法稀释细胞, 并加到含 GVB^{++} 缓冲液,

加或不加 Cefepime 及不同浓度的 magainin 2 肽 (在 X 轴上表示) 的试管中。存在于试管中的 Cefepime 用于检验有这种抗生素时细胞的预生长。37℃ 下 180 分钟后, 经检测每个试管中菌落形成单位 (cfu) 的数量来确定细菌的存活率细菌数被分成一式二份检验。每个 magainin 浓度: $\text{Log 杀伤} = \text{无 magainin 时的 } \text{Log}_{10} \text{ cfu} - \text{含 magainin 时的 } \text{Log}_{10} \text{ cfu}$ 。

图 2 图解显示 magainin 2 杀死人血清中之未处理的和 Cefepime 改造的大肠杆菌。将按如图 1 所示方法制备的细胞加入含 40% 人血清的试管中。37℃ 保温 180 分钟后, 通过检测每个试管中菌落形成单位 (cfu) 的数目确定细菌的存活率。试验中每个样品均重复三份, 每个 magainin 浓度: $\text{Log 杀伤} = \text{无 magainin 的 } \text{Log}_{10} \text{ cfu} - \text{含 magainin 的 } \text{Log}_{10} \text{ cfu}$ 。

图 3 图解说明 magainin 2 杀伤在活性的和失活之血清中的大肠杆菌。将按图 1 所述制备的细胞加入含 40% 人血清或 40% 热灭活血清的试管中。用存在于试管中的 Cefepime 检验有这种抗生素的细胞预生长。试管中还含有 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 magainin 2 或不加 magainin。按下列公式计算在活性或热灭活的血清中未处理的和 Cefepime 改造后之细菌的 $\text{Log 杀伤} = \text{Log}_{10} \text{ 杀伤} = \text{无 magainin 的 } \text{Log}_{10} \text{ cfu} - \text{含 magainin 的 } \text{Log}_{10}$ 。

图 4 图解说明无活性血清抑制 magainin 杀伤 Cefepime 改造的细菌。使细胞按图 1 说明所述在 Cefepime 中预生长。将

细胞加入一套含 Cefepime 和 0、2.5、5、10、20 或 40 % 热灭活血清的试管中。另一套试管内则装入含 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ magainin 2 之同样量的热灭活血清。各浓度之热灭活血清的百分抑制率 = (含 magainin cfu / 不含 magainin 的 cfu) $\times 100$ 。

图 5 图解说明人补体在 magainin 杀伤未处理的和 Cefepime 改造的大肠杆菌中的作用。大肠杆菌 ATCC 25922 在含或不含 $1/4 \text{ MIC}$ Cefepime 条件下生长：将细胞加入一套试管中，这些试管含 40 % 人补体 C8 被特异地消耗的人血清（无 C8），或 40 % C8 被消耗而又加入纯化的 C8 补回到 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ （+ C8）。Cefepime 被加至 $0.016 \mu\text{g}/\text{ml}$ （+ Cefepime）。每套试管还含有 0、6.25、12.5、25 和 $50 \text{ mg}/\text{ml}$ 的 magainin 2。在向血清内加入细菌（引入）时测定细菌的存活数，并在三小时后测定存活百分率。试验分成一式三份进行，结果以均数 ± 1 试验内标准误表示。

图 6 图解说明在合并的正常人血清中，不同抗生素对 magainin 杀伤力的影响。预培养大肠杆菌 ATCC 25922，并在不含抗生素和在各被检验的抗生素浓度为 $1/32$ 、 $1/16$ 、和 $1/8 \text{ MIC}$ 时进行试验。将细菌加到含 40 % 合并的正常人血清并含有 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ magainin 2 或无 magainin 的两套试管中。对于每个抗生素浓度： Log_{10} 杀伤 = 无 magainin 的 $\text{Log}_{10} \text{ cfu}$ — 含 magainin 的 $\text{Log}_{10} \text{ cfu}$ 。
CiPro = ciProfloxacin ND = 未检测出。

图 7 图解说明杀伤不同细菌所需之 magainin / cefepime

的量。在含和不含 $1/4$ MIC 的 cefepime 的情况下使细菌细胞生长到对数生长期。将细菌加入两套含 40% 合并之正常人血清及分别含 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ magainin 或不含 magainin 的试管中。另外，用存在于试管中的 cefepime 检测在有这种抗菌素时细胞的预生长。对于每个菌株，按下式计算 Log_{10} 杀伤： $\text{MGN} 2 = \text{无 MGN 的 } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤} - \text{加 MGN 的 } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤}$ ；
 $\text{cefepime} = \text{无 MGN } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤} - \text{无 MGN 加 cefepime 的 } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤}$ ； $\text{MGN} + \text{cefepime} = \text{无 MGN } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤} - \text{加 MGN 和 cefepime } \text{Log}_{10} \text{ 杀伤}$ 。E. coli = 阴沟肠杆菌；K. P. = 肺炎克氏杆菌。

图 8 图解说明在活性的和热灭活的血清中，来自 PF-4 的 C-13 肽对大肠杆菌的杀伤。使大肠杆菌 ATCC 25922 在加和不加 $1/5$ MIC cefepime 的环境中生长。将细胞加入一套含 40% 合并之正常人血清或 40% 热灭活血清的试管中。用存在于试管中的 cefepime 检验细胞在有这种抗菌素情况下的预生长情况。试管中也含 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ C-13 肽。对于在有活性或热灭活的血清中未处理的和 cefepime 改造的细菌： Log_{10} 杀伤 = 无 C-13 的 $\text{Log}_{10} \text{ cfu}$ - 有 C-13 的 $\text{Log}_{10} \text{ cfu}$ 。注：对在无活性血清中的 cefepime 改造的细菌未造成杀伤。

5. 本发明的详细描述

本发明涉及用于治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的组合物和方法。这种组合物含有以协同方式作用的至少两个组分。因此，该组合物所得到的效果比使用单个组分的效果更好。与单一组分相比，使用较低量和/或较少次数即能发挥的相同的或更

好的效力，也可显示出这种协同作用。本发明的组合物也可用于杀伤抗生素抗性菌株。另外，本发明涉及体外筛选组合物方法，即根据对细菌细胞的杀伤，筛选与 β -内酰胺抗菌素协同作用的组合物，以及能够与有杀菌活性的活性补体杀死细菌的组合物。

5.1 治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感之微生物引起之感染的组合物

本发明涉及到含有两种或更多种组分的用于治疗对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的组合物。对 β -内酰胺敏感的微生物可以是革兰氏阳性菌（如链球菌）或革兰氏阴性菌，例如肠杆菌科（大肠杆菌，肺炎克氏杆菌和阴沟肠杆菌等）、假单胞杆菌科（如铜绿色假单胞杆菌）和拟杆菌科细菌。在一具体方案中，该组合物包含（1）一种能抑制微生物生长的 β -内酰胺抗生素和（2）一种阳离子寡肽。 β -内酰胺抗生素可通过改变细菌细胞膜的结构抑制细菌生长，阳离子寡肽则可在细菌膜中形成通道来抑制细菌生长。因此， β -内酰胺抗生素与阳离子寡肽能以协同方式发挥作用。

上文中所定义的 β -内酰胺抗生素是那些抑制细菌细胞壁合成的抗生素。这种抗生素包括并不限于：青霉素类、头孢菌素类（如 cefepime、头孢氨噻和头孢噻甲羧肟），carbapenems（如 imipenem），单菌霉素（如 aztreonam），头霉素类、Pyrasidons 和 Penems。 β -内酰胺抗菌素可以从商业来源以及使用本领域专业人员所知的通常方法获得。

在说明书和权利要求书中使用的术语“阳离子寡肽”是指具有抗菌活性的两亲性寡肽，它们可以插入到细菌内膜中，并且当在体内与 β -内酰胺抗生素结合时，能以协同形式杀死细菌细胞。

在一具体实施方案中，阳离子寡肽含有当存在脂/液界面时其本

质上是 α —螺旋的区域。所形成的螺旋可以是左手或右手螺旋并且能包含非蛋白质氨基酸（如 α ， α —二烷基氨基酸， d —氨基酸，或氨基酸衍生物）。另外，该阳离子寡肽可形成两亲性螺旋。线性肽的某些区域是疏水的，而另一些则是亲水的，这样当螺旋形成时，螺旋的一侧便主要是亲水的，而另一侧则是疏水占优势的。虽然这一特征在检查线性序列时可能不明显，通过使用螺旋净重图（helical net diagrams）（Crick, 1953, Acta Crystallogr. 6: 684—697）或轴向螺旋投影（axial helical projection）（Schiffer et al., 1967, Biophys. J. 7: 121—135）可很容易地认识这一特性。疏水和亲水特性区域不一定无例外地由有这样特性的氨基酸残基构成。而只要保持其两亲性，只须有优势疏水或亲水氨基酸即可。同样应说明的是，有相似物理性质的区域并不需要严格地与螺旋的轴平行，而可以与轴有一个斜角。另外，螺旋性区域可能被非螺旋区域破坏，并且当 β —内酰胺抗菌素存在时仍保留增加的杀菌活性。

特定的具体例子中，阳离子寡肽可以是人血小板因子—4和其片段、类似物及衍生物。类似物和衍生物是那些保持肽的阳离子两亲性 α 螺旋性质并且仍具有杀菌活性的肽。由16种氨基酸组成的人血小板因子—4（PF—4）是一种对肝素有高亲和性的血小板 α —颗粒蛋白，其可抑制生长因子刺激的内皮细胞增殖（Maione et al., 1990, Science 247: 77—80），而且还具有免疫调节活性（Zucker et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 7571—7574）。已

发现了一个有 13 个氨基酸长的羧基末端片段 (氨基酸 58~70), 在下文将其称之为 C—13 P^F—4 片段或有下示序列的 C—13 肽。

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser (Seq. I.D. #1)

其保持了生长抑制和免疫调节活性 (Maione et al., 1990, Science 247: 77—80 and Zucker et al., 1989, Proc., Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 7571—7574)。但发现, 较小的肽即 C—12 (氨基酸 58—69) 和 C—11 (氨基酸 58—68) 有较小的抑制性 (Maione et al., 1990, Science 247: 77—80)。用 C—10 (氨基酸 58—67) 肽观察到几乎没有抑制作用。

可以按本领域专业人员已知的方法制备该阳离子寡肽。在一具体的实例中, 可使用本领域已知的方法从其天然来源中分离阳离子寡肽。例如象上文所述, 可从爪蟾中分离 magainins (Zasloff, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 5449~5453), 可从昆虫中分离 cecropins 和肌毒素类 (Christensen et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 5072—5076 和 Nakajime et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 1655—1669), 可从线粒体中分离人血小板因子—4, 另外阳离子寡肽也可以通过重组 DNA 方法获得。

例如已公开了获得 magainins (Zasloff, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 5449—

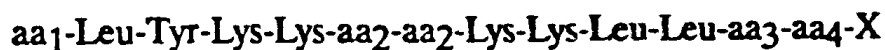
5453), Oecropins (Christensen et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 5072—5076), 肌毒素类 (Nakajima et al., 1989, J. Biol. Chem. 262: 1665—1669), 及人血小板因子—4 (St. Charles et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 2092—2099) 的方法。

也可以用本领域已知的程序通过化学合成肽序列的方法获得本发明的阳离子寡肽, 例如使用市场上提供的肽合成仪和其类似的仪器。这种肽合成的标准技术在出版物中已作过描述, 如可参见 Merrifield, 1963, J. Chem. Soc. 84: 2149—2154 和 Hunkapilliar 等人, 1984, Nature (London) 310: 105—111。

已合成了人血小板因子—4 之 C—13 肽的各种类似物。

这些保留杀菌活性的类似物是 α 螺旋, 其每圈有大约 3.6 个氨基酸, 至少有 11 到 18 个氨基酸长, 每 2 到 3 个氨基酸残基有改变的疏水和亲水区域, 这些类似物也看作是本发明的一部分。破坏分子之螺旋性质或分子之两亲性的合成的类似物可降低或消除杀菌活性。

一般说来, 本发明有杀菌活性之阳离子 α 螺旋两亲组合物的氨基酸顺序包括:



其中 aa₁ 是 Pro, Ala 或 Lys; aa₂ 是 Ile 或 Leu; aa₃ 是 Glu 或 Lys; aa₄ 是 Ser, Leu 或 Lys, 以及 X 是含有氨基酸序列 Ala—Lys—Lys—Leu—Gly 的 5

氨基酸序列。本发明的具体实例包含有下列氨基酸残基序列的寡肽：

Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser;
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;
dAla-dLeu-dTyr-dLys-dLys-dLeu-dLeu-dLys-dLys-dLeu-dLeu-dLys-dSer-dAla-
dLys-dLys-dLeu-Gly;
Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser-Ala-Orn-Orn-Leu-
Gly;
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly;
Ala-Leu-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Ser-Ala-Arg-Arg-Leu-
Gly;
Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly;
Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-
Leu-Gly; and
Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-
Ala-Lys-Lys-Leu-Gly.

由于已经描述了阳离子 α 螺旋两亲性杀菌组合物人血小板因子—4的C—13肽以及有抗菌活性的各种类似物和衍生物的一般结构，所以可以通过本领域熟知的标准技术，如使用商业上可提供的肽合成仪等合成这些肽。

应提到的是，给出本发明抗菌组合物的一般结构和用于筛选与 β —内酰胺抗菌素或人补体组分有协同作用的组合物的方法，即可使

用标准的和普通的方法，例如使用计算机模型等，很容易地预测，产生和/或制备出各种其它的类似物和衍生物。所有在结构和功能上与本文中描述的组合物相等的类似物和衍生物都包含在本发明的范围内。

在一具体实施方案中，该组合物含有：(1)可抑制细菌生长的 β -内酰胺抗生素和(2)能用于治疗由细菌引起之感染的膜活性物质。上文讨论了 β -内酰胺抗生素的例子。用于本发明说明书和权利要求的术语“膜活性物质”是指一种能干扰整体膜功能的物质。这种功能包括但不限于氧化磷酸化作用、基本的运输功能和其它与质子移动力相关的膜活性。这种物质的例子是阳离子寡肽。上文描述的阳离子寡肽包括但不限于 *magainins* (如 *magainin 1* 和 *magainin 2*)，*cecropins*，肌毒素类，线粒体前体蛋白，人血小板因子-4 和其片段、类似物及衍生物。

在一很特定的实施方案中，一种组合物含有可用于治疗由大肠杆菌、铜绿色假单胞菌、阴沟肠杆菌和肺炎克氏杆菌引起之感染的 (a) *cefepime* 和 (b) *magainin 2*。另一个具体实例中，一种组合物含有可用于治疗由大肠杆菌引起之感染的 (a) *cefepime* 和 (b) 人血小板因子-4 的 C-13 肽。再一个具体实例中，一个组合物含有用于治疗由大肠杆菌引起之感染的 (a) *ceftazidime*、*aztreonam* 或 *imipenem* 和 (b) *magainin 2*。还有一个特定实例中，组合物含有可用于治疗由大肠杆菌引起之感染的 (a) *aztreonam* 和 (b) C-13 肽类似物 G。

5. 2 应用和使用方法

本发明还涉及治疗由对 β -内酰胺敏感的微生物引起之感染的方法。在本发明一个实施方案中，该方法包括给病人使用有效剂量的组

合物，该组合物包含：(1)一种抑制微生物生长的 β -内酰胺抗生素；(2)一种作用一段时间后足以有效抵御细菌感染的阳离子寡肽。 β -内酰胺抗生素和阳离子寡肽已在上面5.1节给出定义并进行了讨论。在一个特定实例中， β -内酰胺可以是亚抑制剂量的。

本发明还涉及对由肠细菌科细菌引起的感染进行特异治疗的方法。即给病人服用含一定量可抑制肠杆菌科细菌生长的 β -内酰胺抗生素和至少一种生物膜活性物质的组合物。在一具体实施方案中所用的 β -内酰胺抗生素的量可在病人感染部位产生亚抑制性浓度。上文所讨论的生物膜活性物质可包括血清及其组分和阳离子寡肽。

在一更具体的实施方案中，可给病人服用有效剂量的含下列成分的组合物以治疗由大肠杆菌、铜绿色假单胞杆菌、阴沟肠杆菌和肺炎克氏杆菌引起的感染：(a) cefepime 和 (b) magainin 2。在另外一个非常具体的实施方案中，可给病人使用含有：(a) cefepime 和 (b) 人类血小板因子-4之C-13多肽的组合物，治疗由大肠杆菌引起的感染。在另外一个非常具体的实施方案中，治疗由大肠杆菌引起的感染，可使用含下列组分的有效剂量的组合物：(a) ceftazidime, aztreonam 或 imipenem 和 (b) magainin 2 或使用有效剂量含 aztreonam 和如下文所述的C-13多类似物G的组合物。

本发明的组合物可用于治疗各种不同的细菌感染。如上文所讨论的有几组病人对细菌感染特别敏感：如病情危急的病人；正在进行化学治疗的癌症病人；以及外科病人。这些组合物可有效地治疗这样的病人。

本发明组合物可配制成适于不同给药方式，包括全身、表面或局

部给药的剂型。根据本发明的一个实施方案，这些活性药剂可在给药前混合。而在另一个具体实施方案中，这些活性药剂也可在同一时间分别给药或在不同时间分别给药。

使用本发明组合物的方法及其配制一般可参见 Remington's pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, P A, 最新版本。全身给药最好是注射，并且可以是肌肉内，静脉内、腹膜内以及皮下注射。用于注射的组合物在溶液中配制，最好是在生理互溶缓冲液如 Hank's 或 Ringer's 缓冲液中配制。另外该组合物也可以固态形式配制，并在使用前立即溶解或悬浮在溶剂中。还包括冻干形式的制剂。

还可采用透过粘膜，透过表皮方法全身给药或口服使用该组合物。为了透过粘膜或透过表皮给药，可在配方中使用适于穿透屏障的渗透剂。这些渗透剂是本领域中已知的。如包括适于透过粘膜给药的胆汁盐和梭链孢酸衍生物。另外，可加入去污剂以促进渗透。透过粘膜给药如可通过鼻内喷雾，或使用栓剂。为了口服给药，可将组合物配制成常规口服给药剂型，例如胶囊、片剂和补剂。

为了局部给药，可将本发明的组合物配制或本领域公知的软膏、油膏、凝胶、乳膏等。

5.3 体外筛选与 β -内酰胺抗生素有协同作用之组合物的方法

此外，本发明还涉及体外筛选有杀菌活性的组合物，特别是阳离子 α -螺旋两亲性多肽组合物的改良方法。这些方法一般是本领域技术人员所熟知的方法，但还进一步包括功能性补体级联成分。现有技术方法包括园盘扩散琼脂稀释，微量稀释以及微量稀释培养液方法。这些方法中的每一个都可改进，使其包含一个活性补体级联。这种功

能性补体级联的包涵物能够识别某些为产生杀菌活性而需要活性补体的组合物。体内使用时，这些组合物通过给药而与补体结合，因为补体是哺乳动物免疫系统的一部分。现有技术中不含有活性补体的体外筛选方法并不能识别这些组合物，因而不能发现包括本发明新组合物在内的许多新的活性组合物。

可将用于本发明之体外筛选法的活性补体以血清的形式加入。已知由人、老鼠、豚鼠、兔等体内分离的血清含有高水平的活性补体，并可用于本发明的检测法中。最好是人体补体。功能性补体级联可以提供不同成份，加入到标准测定介质中。

上面已描述了本发明及其某些实施方案，下面给出的实施例旨在进一步说明而不是限制本发明。

6. 实施例：头孢菌素与阳离子肽 magainin 2 的协同作用

本实施例中证明了不同类型的 β -内酰胺抗生素与 magainin 的协同作用。在这些实验中，亚抑制浓度的抗生素与 magainin 组合能杀死细菌，而单独使用任一药剂时，则很少或不能杀死细菌。第二种类型协同是将两种试剂应用于人血清中。在人血清存在下，将抗生素与 magainin 合用可以在低于缓冲液中浓度的情况下杀死细菌。这些结果表明：这些组合物可以用于体内治疗由细菌引起的感染。这代表了另一合成效果。在血清中的协同需要一种热不稳定性因子。通过用血清进行补体蛋白质 C 8 特殊消耗实验证实这种因子是血清补体。

6. 1 材料和方法

6. 1. 1 试剂和缓冲液

使用下述缓冲液：明胶—佛罗那缓冲液 (GVB⁺⁺)

(Gewortz H. et al. , 1985, in Manual of

Clinical Immunology , N. R. Rose and H. Freedman (eds) A S M, Washington , D. C.)。另外, 将0.1%的葡萄糖加入到缓冲液中作为碳源。实验室制备磷酸盐缓冲盐水。由Bristol — Myers Squibb Company , Wallingford , Conn. 的Robert Kessler 博士处得到冻干形式的抗生素。在实验室内根据已公开的氨基酸序列 (Zasloff et . al . , 1987, proc . Natl . Acad . Sci . U. S. A. 84 : 5479—5483; Zasloff et . al . , 1988, proc . Natl . Acad . Sci . U. S. A. 85 : 910—913; and Zasloff , 1989, U. S. Patent No. 4, 810, 777)合成magainin 2。

6. 1. 2 细菌菌株和培养条件

本发明中大多数实验所使用的大肠杆菌ATCC 25922是由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 得到的。其它大肠杆菌菌株是由Harborview Medical Center , Seattle , WA提供的A011菌株, 和得自Walter Reed Army Inst . of Research , Dept. of Bacterial Disease . , Washington , D. C. 的H16菌株。另外检验了得自Veterans Administration Hospital , Seattle , WA的肺炎克氏杆菌菌株ATCC 13883和Enterobacter cloacae 。检查了菌株的纯度, 专属的特征, 然后于-70℃下储存。所有菌株均生长在AMH (Adjusted Mueller Hinton) (Jones et . al . , 1985, in Manual of clinical Microbiology , E. H. Lennette (ed.),

ASM, Washington, D. C.) 中。

6. 1. 3 血清

从五个健康的自愿者身上抽取血液，并在室温下凝固一小时。
4℃下保温20分钟后，以 $1500 \times g$ 离心15分钟。除去血清并合并之，再向其中加入10 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)，并取少量血清在-70℃下储存，作为集中备用的正常人体血清 (PNHS)。使用前很快将血清解冻，并向9份血清中加入1份0.1 M $CaCl_2$ 。或者是不加EDTA添加剂冷冻血清并在不加 $CaCl_2$ 情况下使用。此血清在冰上保留，同时将它与细菌混合以进行血清杀菌试验。除特别指出者外，血清补体均在56℃加热30分钟灭活。

6. 1. 4 最小抑制浓度的测定 (MIC)

MIC代表产生完全控制作用所需的最低抗菌剂浓度。使用ALM以微量稀释法 (Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition, Lennette, E. H. Ed. in Chief, ASM, 1985. PP. 972—977) 测定MIC。每个菌株用每种抗生素至少进行三次不同的测定。

6. 1. 5 血清杀菌试验

在有或没有抗生素的条件下过夜培养接种的细菌，使之生长至对数中期。(在660 nm处吸光率为0.35至0.5；有Cefepime存在下大约 $2 \sim 3 \times 10^8$ 细胞/ml；没有Cefepime存在下 9×10^8 细胞/ml)。细胞不经洗涤就在明胶—佛罗那缓冲液 (GVB^{++}) 中稀释至 1×10^4 细胞/ml，并取0.05 ml加至Eppendorf瓶内1.5 ml血清中。将在抗

生素中预生长的细菌细胞也稀释到含同样浓度抗生素的 GVB++ 缓冲液中。集中备用的正常人体血清 (PNHS) 或加热灭活的 PNHS 是以适当浓度稀释到 0.2 ml GVB++ 缓冲液中而预先制备的。抗生素或 magainin 是在加入细菌之前加入到血清混合物中的。反应混合物总量为 0.25 ml。通过向只含有 GVB++ 缓冲液的试管中加入 0.05 ml 细菌悬浮液, 并在测定开始时铺板, 以检测加入血清中的细菌数目。然后将反应混合物在 37 °C 下旋转保温 3 小时, 间隔地移出样品 (25 μ l) 进行平板计数分析。加胰蛋白酶大豆琼脂保温过液后检测所形成之菌落单位的数目。以一式三份计数菌落形成单位并取其平均值。

6.2 结果

研究了 magainin 2 (MGN2) 和 Cefepime (一种头孢菌素抗生素) 在缓冲液中的效果。如图 1 所示 Cefepime 与 100 μ g/ml MGN2 合用的杀菌能力高于 1.5 Log。而单独加入 Cefepime, 则杀菌能力小于 0.3 Log 10。另外单独使用 100 μ g/ml 的 MGN2 未发现显著的杀菌效果。但是当细菌与 200 μ g/ml MGN2 一起保温时则杀菌能力超过 3 Log (99.9%)。这一观察结果就鉴定协同结合来说扩展了 Zasloff 的数据。

在 40% 集中备用之正常人体血清 (PNHS) 存在下, 检验了 MGN2 对未处理细菌 (没有用 Cefepime 处理的细菌) 和 Cefepime 改造之细菌的效果 (见图 2)。当未处理的细菌加入到血清中时, 没观察到显著的 MGN 杀菌效果。这与以前所观察到的在缓冲液中 200 μ g/ml MGN2 完全杀死菌株的结果完全相反

(比较图 1 和图 2)。显然在检测杀死未处理细菌的杀菌能力时 PNH S 阻断了 MGN 2 (和 MCN 1) 的作用 (没有给出后者的数据)。而在测定 Cefepime 改造的细菌时, PNH S 的存在促进了 MGN 的杀菌能力。在 PNH S 中观察到 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ MGN 有杀菌力, 而以此浓度在缓冲液中则未见有杀菌力。因此, PNH S 阻碍了 MGN 2 对未处理细菌的杀菌活性, 但增强了对 Cefepime 改造之细菌的杀菌活性。

为了确定 PNH S 中热不稳定性因子或热稳定性因子是否负责 Cefepime 和 MGN 2 之间的协同, 检测了 PNH S 中活性血清和热灭活血清 (在 55°C 加热 30 分钟使血清补体失活) 的杀菌能力。对于未处理的细菌, 有或没有 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MGN, 都再一次没有观察到或观察到很小的杀菌效果 (见图 3)。当检测 Cefepime 改造的细菌时, 观察到活性血清中 MGN / Cefepime 有杀菌能力, 而失活血清则没有 (见图 3 和图 4)。这些实验清楚地证明: 检测在 PNH S 中的杀菌能力时, PNH S 中的热不稳定因子 (可能是补体) 对于 MGN 杀伤 Cefepime 改造的细菌是必不可少的。

血清中热不稳定因子的性质被确定为血清补体。检测了 magainin 在已特异性排除了补体蛋白质 C 8 的血清中杀伤 Cefepime 改造的或未处理的大肠杆菌 ATCC 25922 的能力。如果血清中除去补体级联的这一组分, 则没有观察到 magainin 对细菌的杀伤 (图 5)。但将纯化的 C 8 加至生理浓度 ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 时, 则发现有显著杀菌效果。另外发现杀伤 Cefepime 改变的大肠杆菌所需 magainin 浓度要比杀伤未处理细菌所需

magainin 浓度低得多。

同时也研究了集中备用的正常人血清¹⁴下各种抗生素的效果。使细菌预生长，然后在 $1/32$ MIC、 $1/16$ MIC、 $1/8$ MIC对每种被检抗生素进行分析。向两组试管中加入细菌。两组试管都含有40%集中备用的正常人血清，并且一组中含有 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 magainin 2，而另一组则没有。如图6， β -内酰胺抗生素，imipenem，与 magainin 2

有协同作用；而抗生素BBK8（一种氨基葡萄糖苷）和Ciproflaxacin（一种喹啉）两者都没有协同作用。并且cefepime，aztreonam和Ceftazidime这些 β -内酰胺型抗生素都与 magainin 有协同作用。

研究了杀伤多种细菌所需之 magainin / cefepime 的量。所研究的细菌包括大肠杆菌菌株A645、大肠杆菌菌株A011、大肠杆菌菌株H16、E. Clocae和肺炎克氏杆菌。

在有或没有 $1/4$ MIC cefepime存在下，使细菌生长至对数中期。将其加入到两组分别含40%集中备用之正常人血清的两组试管中，其中一组含有 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ magainin 2，另一组则不含 magainin。

由图7可见，对所有五个细菌菌株均显示出某些与 magainins 的协同。当有MGN存在时，杀伤数比单独使用MGN或 cefepime 时有显著提高。杀菌力比单独使用 cefepime 的杀菌力高出大约一个Log值。

本文还研究了 magainin / cefepime 合用时杀伤铜绿色假单胞杆菌的效果。同上面一样，当 magainin 存在时，杀菌力

与单独使用从MGN或 cefepime 相比有显著的提高。

7. 实施例：头孢菌素与人血小板因子—4 的阳离子多肽 C—13 的协同作用

本实施例中证明了 6-内酰胺、头孢菌素和 C—13 人血小板因子—4 肽 (HFF—4) 的协同作用。在这些实验中，亚抑制浓度的头孢菌素和 C—13 人血小板因子—4 肽合用时能杀死细菌，而当单给予其中之一时，则很少或不能杀死细菌。这些实验是在 40% 正常人血清中进行的。血清中的协同作用需要一个热不稳定因子，因为对血清较微加热灭活即会完全破坏任何协同作用。

7. 1 材料和方法

7. 1. 1 试剂和缓冲液

使用下列缓冲液：明胶—佛罗那 (GVBT⁺⁺) (Gewortz H. et. al., 1985, in Manual of Clinical Immunology, N. R. Rose and H. Freedman (eds.) ASM, Washington, D. C.). 另外将 0.1% 葡萄糖加到缓冲液中作为碳源。实验室内制备磷酸盐缓冲盐水。抗生素以冻干形式获得 (见上文)。按照已公开的氨基酸序列 (Maione . et . al ., 1990, Science 247 : 77—80) 在实验室中合成 C—13 PF—4 肽。也在实验室中以标准固相合成技术合成修饰的 C—13 PF—4 肽。

7. 1. 2 细菌菌株和培养条件

本实验所用的大肠杆菌 ATCC 25922 得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。检查菌株的纯度，专属特征，然后在 -70 °C 下储存。细菌在 AMH 中生长。

7. 1. 3 血清

从五个健康自愿者身上抽取血液，在室温下凝固1小时，再在4℃下保温20分钟后，以 $1500 \times g$ 离心15分钟。将血清移出、汇集，并在-70℃下少量储存(PNH S)。使用前立即将血清解冻，并在冰上保存直至与细菌混合用于血清杀菌试验。除特别指出者外，血清补体均在56℃加热30分钟灭活。

7. 1. 4 最小的抑制浓度的测定(MIC)

使用AMH以微量稀释法稀释，检测MIC (Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition, Lennette, E. H. Ed. in Chief, ASM, 1985, PP. 972—977)。对每个菌株的每种抗生素至少进行三次不同的检测。

7. 1. 5 血清杀菌检测法

已接种的细菌经过夜培养，生长至对数中期(有或没有抗生素)，(在660 nm处吸光率在0.35至0.5之间)，在cefepime存在下细胞生长大约是 $2 \sim 3 \times 10^8$ 细胞/ml，在没有cefepime存在下细胞生长大约是 9×10^8 细胞/ml。细胞不经洗涤就在明胶—佛罗那缓冲液(GVB⁺⁺)中稀释至 1×10^4 细胞/ml，并将其中的0.05 ml加入到一个1.5 ml Eppendorf瓶内的血清中。在抗生素中预生长的细菌细胞也在含有相同浓度抗生素的GVB⁺⁺缓冲液中稀释。预先制备好的PNH S或热灭活PNH S，在0.2 ml GVB⁺⁺中稀释到适当浓度。先向血清混合物中加入抗生素或magainin，再向其中加入细菌。反应混合物总量为0.25 ml。向只含有GVB⁺⁺的试管中加入

0.05 ml 细菌悬浮液，并在试验开始的铺板，以确定加到血清中细菌的数目。然后，反应混合物在 37℃ 下旋转保温 3 小时。间隔取样 (2.5 ml) 进行平板计数分析。加入胰蛋白酶大豆琼脂保温过夜后检测菌落形成单位数目。菌落形成单位测定三次取平均值。

7. 2. 结果

研究了由人血小板因子—4 中获得的 C—13 肽的杀菌效果。基于该阳离子多肽的氨基酸序列，它应在疏水环境中形成两亲性 α —螺旋。检测了这种肽在集中备用的人血清中杀伤大肠杆菌的能力 (见图 8)。将在有或没有 1/5 MIC 存在下生长的细菌细胞分别加入到活性的或热失活的 40% 集中备用的正常人血清中。如图所示，当血清没有热失活时，这种肽能有效地杀死 cefepime 改造的细菌，血清没有经过热失活时，则不能杀死在不加 cefepime 条件下生长的细菌。另外，当血清被热失活时，这种肽也不能杀伤 cefepime 改造的细菌。这些数据清楚地表明：该肽可与 β —内酰胺抗生素和活性血清协同，杀死细胞。同时研究了由人体血小板因子—4 获得的、具有如下序列的修饰的 C—13 肽的杀菌效果：

Pro—Leu—Tyr—Lys—Pro—Lys—Ile—
Ile—Lys—Pro—Lys—Leu—Leu—Glu—
Ser (Seq. I. P. #2)

当这一序列在正常人体血清存在下与 cefepime 一起加入到细菌中去时，发现只有较低或没有协同效果。这是由于减少了被修饰之 C—13 序列的 α 螺旋特性，因为已知脯氨酸可破坏 α —螺旋。

8. 实施例：magainin 与 cefepime 合用的体内保护效果

检测了合用 magainin 与 cefepime 以防止小鼠免受由大

肠杆菌引起的致死感染的能力。先给小鼠注射环磷酰胺，使其患嗜中性白血球减少症，然后用大肠杆菌攻击。将小鼠分成四个组：1) 不作进一步处理的小鼠；2) 只给予 magainin 或 C—13 多肽的小鼠；3) 只给予 cefepime 的小鼠；及4) 合用 magainin 2 或 C—13 多肽与 cefepime 的小鼠。注射后观察十天，记录小鼠死亡数目。从这些研究结果明显看出：未作处理或单用 magainin C—13 多肽或 cefepime 处理的都不能有效地保护小鼠免于死亡。而 magainin 与 cefepime 或 C—13 多肽与 cefepime 合用则能有效地保护小鼠。而当用丁胺卡那霉素（一种氨基葡萄糖苷）做相同实验时，既没有发现体外杀菌活性，也没有发现体内保护效果。

8. 1 原料和方法

8. 1. 1 试验和缓冲液

在实验室中制备磷酸盐缓冲盐水。cefepime 以冻干形式获得（见上文）。C—13 多肽和 magainin 2 可在实验室内根据已公开的氨基酸序列合成。

8. 1. 2 细菌菌株和培养条件

大肠杆菌 H 16 得自 Walter Reed Army Institute of research, Department of Bacterial Disease, Washington, D. C. 。检查此菌株的纯度，专属特征，然后在 -70°C 下储存。细菌在 AMH 培养液中生长。

8. 1. 3 体内实验

用细菌攻击前五天，使小鼠患嗜中性白血球减少症。经皮下注射 250 mg/kg 环磷酰胺以诱发嗜中性白血球减少症。然后腹膜内注射 2×10^4 个大肠杆菌 H 16 进行攻击。将小鼠分成四组：1)

1) 细菌攻击后 1 小时和 3.5 小时给小鼠注射 P B S; 2) 细菌攻击后 1 小时和 3.5 小时分两次给小鼠注射含 magainin 2 的 P B S (每次注射剂量为 1 m g / 小鼠); 3) 细菌攻击后 1 小时和 3.5 小时, 分两次给小鼠注射含 magainin 2 的 P B S (每次注射剂量是 0.1 m g / k g), 两次注射 magainin 2 的总量为 0.2 m g / k g; 4) 细菌攻击后 1 小时和 3.5 小时, 给小鼠注射 1 m g / 小鼠的 magainin 2 和 0.1 m g / k g cefepime, 两次注射总量为 2 m g / 小鼠 magainin 2 和 0.2 m g / k g cefepime。所有 magainin 2 和 cefepime 注射都是肌肉注射。对小鼠存活率至少追踪观察十天。

8.2 结果

检查细菌攻击后小鼠存活率, 结果如下:

第一组: 只给予 P B S, 15 只小鼠中存活 1 只;

第二组: 只给予 M G N 2, 15 只小鼠中存活 1 只;

第三组: 只给予 cefepime, 20 只小鼠中存活 1 只;

第四组: 联合给予 M G N 和 cefepime, 20 只小鼠中存活 11

只。联合用药组中小鼠存活数的提高表明, 相比于未处理组或单独使用 cefepime 或 magainin 2 组, 联合用药组显著提高保护作用 ($P < 0.05$, Fisher 准确度试验)。

另外用 P F—4 的 C—13 肽做相似的动物保护试验。在这些实验中, 除一组和三组同上外, 第二组改成用 C—13 多肽, 而不用 M G N 2; 第四组改为合用 C—13 肽和 cefepime。实验结果如下: 第一组和第三组实验结果同上; 只服用 C—13 肽的第二组, 10 只小鼠中存活一只; 联合给予 C—13 肽和 cefepime 的第

四组，10只小鼠中存活4只。这一实验结果表明，合用C—13肽和 cefepime，可提高小鼠的存活率。

检验了体内合用丁胺卡那霉素（一种氨基葡萄糖苷）与MGN2的效果。测定丁胺卡那霉素的MIC值后将小鼠分为如上四个组，得到如下结果：只给予PBS组8只小鼠无一存活；只给予MGN2（两次注射，每次1mg/小鼠）组，9只小鼠无一存活；只给予丁胺卡那霉素（两次注射，每次3mg/kg）组，10只小鼠存活三只；联合给予MGN2与丁胺卡那霉素（剂量同上文）组，10只小鼠存活1只。

9 实施例：C—13肽类似物的合成

使用固相合成技术合成了不同C—13肽的类似物（表1）。设计类似物以便以特定方式改变C—13肽的物理参数。某些物理参数的改变影响多肽类似物与细菌膜之间的相互作用。发现延伸分子以增加一圈 α 螺旋，并改变沿着单环的正电荷密度，可引起与 cefepime 之协同活性的改变。

9.1 材料和方法

9.1.1 试剂与方法

在使用Boc/苄基保护的430A型Applied Biosystems肽成仪上，以固相合成技术（Merrifield, R. B. 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149—2154）合成MGN2、Cecropin和C—13肽类似物。用低/高HF方法（Tam, J. P. et. al., 1983, J. Am. Chem. Soc. 105: 6402—6455）或用标准高HF方法（90% HF/10%茴香醚）处理固载的肽树脂并裂解之。

用高效液相层析法 (H P L C) 在 Dynamax C—8 柱 (Rainin) 上纯化去保护的肽。再用标准 H P L C 分析和氨基酸分析方法鉴定纯化的肽。

表 1
C—13 肽类似物

序号	序列 序号	氨基酸序列
C-13	1	Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser
B	3	Pro-Leu-Lys-Lys-Tyr-Ile-Ile-Lys-Lys-Glu-Leu-Leu-Ser
W	4	Pro-Leu-Tyr-Lys-Lys-Pro-Ile-Lys-Lys-Pro-Leu-Glu-Ser
H	5	Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser- Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
F	6	Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser- Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
G	7	Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Ser- Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
X		dAla-dLeu-dTyr-dLys-dLys-dLeu-dLeu-dLys-dLys-dLeu- dLeu-dLys-dSer-dAla-dLys-dLys-dLeu-Gly
II		Ala-Leu-Tyr-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Orn-Leu-Leu-Orn-Ser- Ala-Orn-Orn-Leu-Gly
EA I	8	Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys- Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
HA	9	Ala-Leu-Tyr-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Arg-Ser- Ala-Arg-Arg-Leu-Gly
P	10	Ala-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Phe- Ala-Lys-Lys-Phe-Gly
S	11	Lys-Trp-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu- Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly
J	12	Ala-Lys-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Tyr-Lys-Lys-Leu-Leu-Lys- Lys-Leu-Leu-Lys-Ser-Ala-Lys-Lys-Leu-Gly

10. 实施例：根据杀菌活性和溶血活性，体外筛选C—13肽

以体外杀菌和血细胞溶解分析法试验化学合成的血小板因子—4之C—13肽类似物与 Cefepime 的协同活性。至少约有11至18个氨基酸的肽形成大约4或5圈 α —螺旋可使杀伤一半细菌细胞所需的肽量减少8—80倍。

破坏肽的 α 螺旋特征或其两亲性的肽类似物会使杀菌活性减少或消除。加入氨基酸，形成第五个 α 螺旋环，可提高杀菌活性。改变沿着螺旋分布的正电荷密度，能进一步提高这一活性。

发现当C—13类似物H、F以及少量G，X，L和抗生素合用时，可改善杀菌能力。发现类似物H，F，G，X，II，KK，N和J需要补体，当筛选介质中存在补体时，它们能大大提高杀菌效果。当在肽的氨基方向上增加长度，或在4，5，8，9，12，15，16位置上以精氨酸取代赖氨酸时，都能提高C—13肽类似物的血细胞溶解活性。

10. 1 材料和方法

10. 1. 1 试剂和缓冲液

使用下面缓冲液：明胶—佛罗那缓冲液（GV⁺⁺B⁺⁺，如上所述）。另外向缓冲液中加入0.1%的葡萄糖作为碳源。在实验室中制备磷酸盐缓冲盐水。抗生素即 cefepime 如上文所述以冻干形式得到。

10. 1. 2 细菌菌株和培养条件

在大多数实验室中使用的大肠杆菌菌株 ATCC 25922 是从美国典型培养物收藏中心（ATCC）得到的。使用的其它大肠杆菌是得自 Harborview Medical Center, Seattle, WA 的A011，和得自 Walter Reed Army Institute of

Research, Washington, D. C. 的 K1 衣壳分离物 H16。本实验室生长的大肠杆菌 A645 AP 是 ATCC 25922 菌株在动物体内传代后得到的变体。大肠杆菌 A645 AP (PBR322) 是含有赋予 β -内酰胺抗生素抗性之质粒 PBR322 的大肠杆菌, 并是在实验室中产生的。肺炎克氏杆菌 C329 (ATCC 13883) 和铜绿色假单胞杆菌菌株 A366 (ATCC 27317) 均由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得。金黄色葡萄球菌菌株 A546 得自 Harborview Medical Center, Seattle, WA; 阴沟肠杆菌菌株 G438 得自 Veterans Administration Hospital, Seattle, WA; 无乳链球菌菌株 1334 得自 Childrens Orthopedic Hospital, Seattle, WA。抗生素抗性铜绿色假单胞杆菌菌株 M990 得自本室培养物保藏中心。检查菌株的纯度, 专属特性后在 -70°C 储存。每星期由冷冻的细菌原培养物制得新的培养物, 以避免重复的继代培养。所有菌株均生长在含有 $50\mu\text{g}/\text{l}$ CaCl_2 和 $25\text{mg}/\text{l}$ MgCl_2 的 Adjusted Mueller Hinton 培养液 (AMH) 中。

10. 1. 3. 血清杀菌试验

在有或没有 $1/4$ 或 $1/5$ MIC Cefepime 存在下, 由过夜培养物接种各细菌的所有菌株并使之生长至对数中期 (660nm 吸光率在 $0.35-0.5$ 之间, 在 Cefepime 存在下细胞生长大约是 $2-3 \times 10^8$ 个细胞/ ml , 在没有 Cefepime 存在下细胞生长大约 9×10^8 个细胞/ ml)。细胞不经洗涤即加入明胶—佛罗那缓冲液 (GV B^{++}) 稀释至 5×10^4 个细胞/ ml , 并取其中 0.05ml 加入到 1.5ml Eppendorf 瓶内的血清中

(见7.1.3节)。对于在 Cefepime 中予生长的细菌细胞,在制备和检测杀菌活性时,加入与生长时期相同量的 Cefepime。事先在 0.2 ml GVB⁺⁺ 中将集中备用的正常人血清或热灭活血清稀释至适当浓度。在加入细菌细胞之前向血清混合物中加入 Cefepime。在去离子水中稀释多肽,制成 2 mg/ml 的储备溶液,并加入到反应瓶中以达到适当浓度。总反应体积为 0.25 ml。通过向只含有 GVB⁺⁺ 缓冲液的试管中加入 0.05 ml 细菌悬浮液,并在分析开始时铺板,来检测加入到血清中的细菌的数目。然后使反应混合物在 37℃ 下旋转保温 3 小时。间隔取样 (25 μ l) 做平板计数分析。与胰蛋白酶大豆琼脂保温过夜后检测菌落形成单位的数目。三处重复检测菌落形成单位数目并取平均值。

10.1.4 溶血作用试验

将由健康自愿者身上获得的血液稀释在 PBS 中,使红细胞浓度大约为 6×10^8 细胞/ml。将肽悬浮在 PBS 中制成浓度为 2 mg/ml 的各液,并取 100 μ l 储备溶液加入到 900 μ l 稀释的红细胞中。样品在 37℃ 保温 45 分钟,以 1000 $\times$ g 离心 5 分钟,取上清液。用分光光度法在 541 nm 处检查上清液。从标准曲线上可读出溶血作用的百分数。血液以 1:10 稀释在蒸馏水中,在此基础上再进行一系列稀释,制成标准曲线。在蒸馏水中 1:10 稀释度代表 100% 溶血。

10.2 结果

试验了有或没有抗生素以及有或没有活性补体存在下,各种阳离子寡肽的杀菌效果,其中包括 Magainin, Cecropin, HPP-4 的 C-13 肽及各种 C-13 多肽类似物和衍生物 (见表 2)。

表 2

阳离子寡肽和大肠杆菌 A645 (ATCC 25922) 的体外杀菌 (ID_{50}) 及溶血活性

肽	$\frac{\text{无 CEFEPIME}}{\text{NHS HI-NHS}}$		$\frac{1/4 \text{ MIC CEFEPIME}^1}{\text{NHS HI-NHS}}$		RBC 溶解 (%) (100 $\mu\text{G/mL}$)
MGN 2	>200	>200	85	>200	1
C-13	>200	>200	80	>200	<1
B	>200	>200	>200	>200	ND ³
W ¹	>200	>200	>200	>200	ND
H	>100	>100	10	>100	1.5
F	70	>200	10	90	<1
G	4	>200	1	>200	<1
X	4	>50	<1	>50	<1
HH ²	>50	>50	>50	>50	3
II ²	1	47	<1	43	<1
KK	1	>50	<1	>50	<1
P	10	10	10	10	21
L	46	40	11	40	3
N	1	10	1	>2	7.5
J	1	>8	1	4	2.5
Cecropin	1	1	25	5	<1

1. ID_{50} 代表使输入的细菌减少 50% 所需肽的量 ($\mu\text{g/mL}$)。

2. 1/5 MIC cefepime。3. ND: 未测。

另外通过检测肽溶解人血红细胞的能力检测毒性的潜能。首先检测二级结构的两个不同方面。含有能破坏分子两亲性（类似物B）或 α 螺旋性质（类似物W）之氨基酸替代的肽，均在所有试验条件下失活，因为肽的 α 螺旋和两亲性质对保持活性是必不可少的。因此在下步修饰中保留了此两种参数。检验了一种通过加入五个氨基酸使 α 螺旋再增加一圈并保留两亲特性的修饰（类似物H）。这种修饰大大增强了在NH S中与 Cefepime 组合的杀菌力。在NH S中杀死 Cefepime 改造之细菌的抗菌活性提高了8倍（肽类似物H），而在HI—NB S中或杀死未处理细菌的能力却没有相应的提高。对类似物F之两个疏水性氨基酸的稍许改变（类似物H），可导致抗菌活性轻度提高。当类似物F中谷氨酸残基被赖氨酸取代时（类似物G），对于NH S中之 Cefepime 改造之细菌的杀菌活性提高了10倍。而此肽在HI—NH S中或对于未处理的细菌则其抗菌能力没有相应提高。另外，也未观察到血红细胞（RBC）溶解数目的增加。肽类似物G证实了单一电荷的变化即可大大影响杀菌活性

在氨基末端连接五个氨基酸使螺旋增加一圈（类似物J），并没有提高抗菌活性。这种修饰增加了血红细胞（RBC）溶解数目。这表明有较多数目螺旋的肽是有毒性的。体外分析中，肽（类似物G）与 Cefepime 在NH B中的抗菌活性增加了80倍。相反在HI—NH B或对于未处理的细菌则没有抗菌活性。对于类似物G的进一步实验表明，杀死其它细菌菌株的杀菌活性依赖于NH S（表3）。这些数据还表明，抗生素可不同程度上加强正常人血清中类似物G的杀菌活性，且其加强程度取决于细菌菌株。

表 3

G—13 多肽类似物 G 杀伤不同细菌菌株的体外杀菌活性 (ID₅₀)

菌 株	无 NHS	CEFEPI HI-NHS	1/4 MIC NHS	CEFEPI HI-NHS ²	%血清	MIC
H16	>200	>200	15	100	40	1/4
C329	1	80	1	50	10	1/8
G438	1	45	1	45	10	1/4
A366	<25	40	<25	40	10	1/8
A011	2	80	2	80	10	1/4
A586	>200	>200	>200	>200	40	SL ³
I334	>200	45	80	25	40	1/4
A645AP	1	70	1	80	10	1/4
A645AP ² (pBR322)	1	70	ND	80	10	1/8
M009 ²	2	120	ND	ND	20	1/8

1. ID₅₀ 代表使加入的细菌减少 50% 所需肽的量 (μg/ml)。

2. 抗生素抗性菌株 MIOA645AP (pBR322), 1 μg/ml; MIO M009, 64 μg/ml。

3. 在培养液中稀释抗生素, 并在 3 小时后检查细菌生长情况来确定 ceftapime 的亚致死 (SL) 浓度。

11. 实施例：C—13肽类似物与 Cefepime 合用的体内保护效果

检测了合用 C—13 肽类似物和 Cefepime 使小鼠免于由大肠杆菌引起之致命性感染的能力。注射环磷酰胺使小鼠患嗜中性白细胞减少症，然后用大肠杆菌攻击。将小鼠分成四组：（1）给予 PBS 的小鼠；（2）只给予 C—13 肽类似物的小鼠；（3）只给予 Cefepime 的小鼠；（4）合用 C—13 肽类似物与 Cefepime 的小鼠。感染后观察 10 天，并记录小鼠死之数目。结果清楚地表明：未处理，只用 Cefepime 处理或用 C—13 肽类似物 Q, X, II 和 F 处理均不足以保护小鼠免于死之。而合用 C—13 肽类似物和 Cefepime 则能有效地保护小鼠。

11. 1. 材料和方法

11. 1. 1 试剂与缓冲剂

在实验室中制备磷酸盐缓冲盐水。Cefepime 以冻干形式从 Robert Kessler 博士 (Bristol — Myers Squibb Company, Wallingford, Conn.) 处得到。Cecropin 在实验室内按已公开的序列合成。环磷酰胺购自 Mead Johnson (under the Tradename Cytosan)。

11. 1. 2 细菌菌株的培养条件

大肠杆菌 H16 得自 Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C. ; 大肠杆菌 A645 AP 在实验室内由大肠杆菌 ATCC 25922 经动物传代而产生。检查菌株的纯度，专属特征，并在 -70℃ 储存。每个星期从冷冻的细菌储备培养物制得新的培养物，以避免重复培养。所有菌株均生长

在含有 500 mg/l CaCl_2 和 25 mg/l MgCl_2 的 Adjusted Mueller Hinton 培养液中。

11. 1. 3 体内实验

使雄性 Crl:CF_1 小鼠患嗜中性白血球减少症，五天后用细菌攻击之。嗜中性白血球减少症是经皮下注射 250 mg/kg 环磷酰胺而诱发的。腹膜内注射 2×10^4 个大肠杆菌 H16 (表4) 或 5×10^4 个 A645AP 攻击小鼠。将小鼠分成作下列不同处理的四个组：1) PBS ；2) $\text{C}-13$ 肽类似物 (15 mg/kg)；3) Cefepime (0.1 mg/kg)；4) 联合注射 Cefepime 和 $\text{C}-13$ 肽类似物，注射前合并。细菌攻击 1 小时和 3.5 小时后，分别在小鼠的四条腿上进行肌肉内注射，所有注射液均在 (0.2 ml) PBS 中配制。监测小鼠存活率 10 天，并用 Fisher 准确度试验分析结果。

11. 2 结果

检测了 $\text{C}-13$ 肽类似物和 Cefepime 保护小鼠免于大肠杆菌 H16 之全身性感染的效果 (表4)。单用 PBS 、 Cefepime 或 $\text{C}-13$ 肽类似物 G 、 X 、 II 和 F ，不能明显有效地保护小鼠，而相比于未处理或单用 Cefepime 或 $\text{C}-13$ 肽类似物处理者，联合给予 Cefepime 和 $\text{C}-13$ 肽类似物 C 或 F ，小鼠则显著地提高了存活率 ($P < 0.05$, Fisher 试验)。另外用 Cecropin 做了同样的实验，无论是单独使用或合用 Cecropin 与 Cefepime ，都没有显著提高保护作用。

另外，在一相似实验中试验了另一种抗生素 aztreonam 。当这种 β 内酰胺抗生素与 $\text{C}-13$ 肽类似物 G 合用时，统计结果表明有

显著的保护作用 ($P < 0.05$; Fisher 试验)。实验结果如下: 单用 PBS, 9 只小鼠无一存活; 单用 aztreonam, 20 只小鼠中只存活一只; 单用 C—13 肽类似物 G, 10 只小鼠中无一存活; 合用 aztreonam 和 C—13 肽类似物 G, 则 20 只小鼠中存活 11 只。

还检测了 C—13 肽类似物 G 对用非 K1 大肠杆菌菌株 A645 AP (5.0×10^4 生物体) 攻击之嗜中性白血球减少症小鼠的保护效果。细菌激发后检测小鼠存活率, 结果如下: 第一组只给 PBS, 20 只小鼠中存活 3 只; 第二组只给类似物 G, 15 只小鼠无一存活; 第三组给予 Cefepime, 20 只老鼠中存活 3 只; 第四组给予类似物 G 和 Cefepime, 11 只小鼠中存活 8 只。联合用药再一次显著提高了小鼠存活率 ($P < 0.05$, Fisher 试验)。表明联合用药比单用肽或抗生素能提高存活率。

表 4
C—13 多肽类似物与 Cefepime
对一系列大肠杆菌感染的效果

处理	存活数 / 总数	百分存活率
P B S	2 / 25	8
Cefepime	3 / 25	12
G	1 / 15	6.7
Cefepime + G	11 / 20	55
X	1 / 18	5.6
Cefepime + X	15 / 20	75
I I	0 / 5	
Cefepime + II	3 / 10	30
F	0 / 10	
Cefepime + F	3 / 10	30
Cefepime	2 / 20	20
Cefepime + Cecropin	2 / 10	20

本文所描述和阐明的发明并不局限于本文公开的特定实施方案范围。因为这些实施方案是为了描述本发明的某些方面。任何等同的实施方案也都在本发明的范围内。实际上对于本领域的熟练工作者来说,通过上文的描述,对于本文以外的本发明的不同改动是显而易见的。这些改动也落入待批权利要求范围内。

序列一览表

(1) 总的情报：

(i) 申请人：Darveau, Richard P.

Blake, James J.

Cosand, Wesley L.

(ii) 发明名称：治疗由对 β -内酰胺抗生素敏感的微生物引起之感染的组合物和方法

(iii) 序列数：12

(iv) 住址

(A) 住址：Bristol — Myers Squibb 公司专利部

(B) 名：3005 First Avenue

(C) 城市：西雅图

(D) 州名：华盛顿

(E) 国家：USA

(F) ZIP: 98121

(i) 计算机易读形式

(A) 中等类型：FLOPPY 盘

(B) 计算机：IBM PC 兼容

(C) 操作系统：PC-DOS / MS-DOS

(D) 软盘：Patent In Release ~~非~~ 1.0, Version
~~非~~ 1.25

(vi) 目前申请数据：

(A) 申请号：US

(B) 申请日：1991年2月19日

(0) 分类

(vii) 在先申请数据

(A) 申请号 : US 07 / 484, 020

(B) 申请日 : 1990年2月23月

(viii) 代理人 / 代理机构情报 :

(A) 姓名 : Poor, Brian W.

(B) 注册号 : 32, 928

(C) 参考文献 / 一览表号 : ONO 63A

(ix) 通讯情报 :

(A) 电话 : 206 / 728—4800

(B) 传真 : 206 / 448—4775

(2) SEQ ID NO : 1 情报 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 13 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性的

(ii) 分子类型 : 肽

(iii) 假设 : NO

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO : 1 :

Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile

1

5

Lys Lys Leu Leu Glu Ser

10

(2) SEQ ID NO : 2 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 十五个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y e s

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 2 :

```
Pro  Leu  Tyr  Lys  Pro  Lys  Ile
  1                               5
Ile  Lys  Pro  Lys  Leu  Leu  Gly
                        1 0
```

S e r

1 5

(2) S E Q I D N O : 3 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 (L E N G T H) : 1 3 个氨基酸

(B) 类型 (T Y P E) : 氨基酸

(D) 拓扑结构 (T O P O L O G Y) : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 (H Y P O T H E T I C A L) : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 3 :

```
Pro  Leu  Lys  Lys  Tyr  Ile  Ile
  1                               5
Lys  Lys  Glu  Leu  Leu  Ser
                        1 0
```

(2) S E Q I D N O : 4

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 3 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 4 :

P r o L e u T y r L y s L y s P r o I l e

1

5

L y s L y s P r o L e u G l u S e r

1 0

(2) S E Q I D N O : 5 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 8 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 5 :

A l a L e u T y r L y s L y s I l e I l e

1

5

L y s L y s L e u L e u G l u S e r A l a

1 0

L y s L y s L e u G l y

1 5

(2) S E Q I D N O : 6 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 8 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 6 :

A l a L e u T y r L y s L y s I l e I l e

1

5

L y s L y s L e u L e u G l u S e r A l a

1 0

L y s L y s L e u G l y

1 5

(2) S E Q I D N O : 7 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 1 8 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 7 :

```

Ala  Leu  Tyr  Lys  Lys  Leu  Leu
 1                                5
Lys  Lys  Leu  Leu  Glu  Ser  Ala
                        10
Lys  Lys  Leu  Gly
 15

```

(2) SEQ ID NO : 8 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 18 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(11) 分子类型 : 肽

(111) 假设 : YES

(x 1) 序列描述 : SEQ ID NO : 8 :

```

Ala  Leu  Tyr  Lys  Lys  Leu  Leu
 1                                5
Lys  Lys  Leu  Leu  Lys  Ser  Ala
                        10
Lys  Lys  Leu  Gly
 15

```

(2) SEQ ID NO : 9 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 18 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(2) S E Q I D N O : 1 1 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 0 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 1 :

L y s T r p L y s L e u T y r L y s L y s

1

5

L e u L e u L y s L y s L e u L e u L y s

1 0

S e r A l a L y s L y s L e u G l y

1 5

2 0

(2) S E Q I D N O : 1 2 :

(1) 序列特征 :

(A) 长度 : 2 3 个氨基酸

(B) 类型 : 氨基酸

(D) 拓扑结构 : 线性

(1 1) 分子类型 : 肽

(1 1 1) 假设 : Y E S

(x 1) 序列描述 : S E Q I D N O : 1 2 :

A l a L y s L y s L e u A l a L y s L e u

1

5

T y r L y s L y s L e u L e u L y s L y s

1 0

L e u L e u L y s S e r A l a L y s L y s

1 5

2 0

L e u G l y

DARVEAU ET AL.
1/8

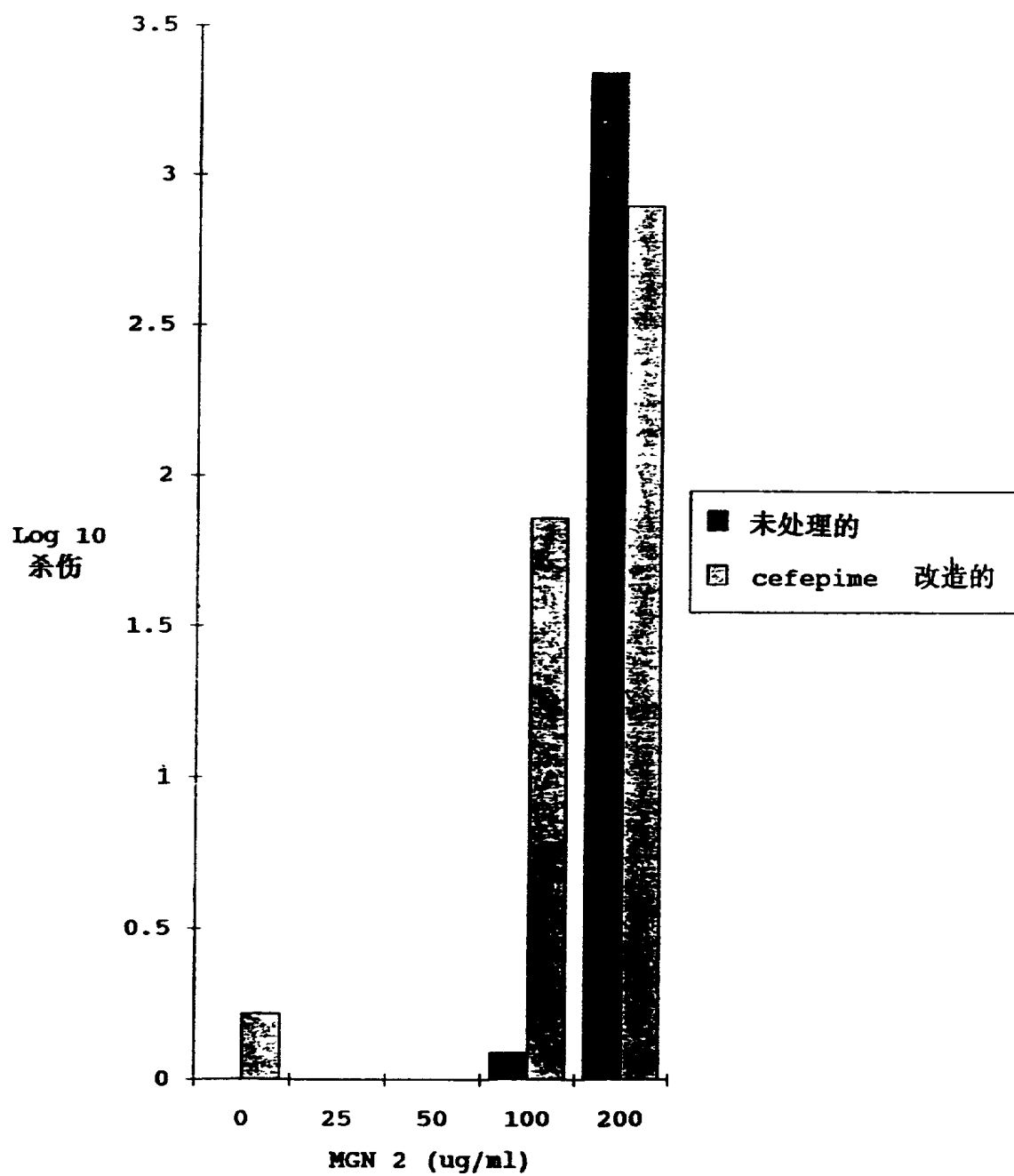


图 1

DARVEAU ET AL
2/8

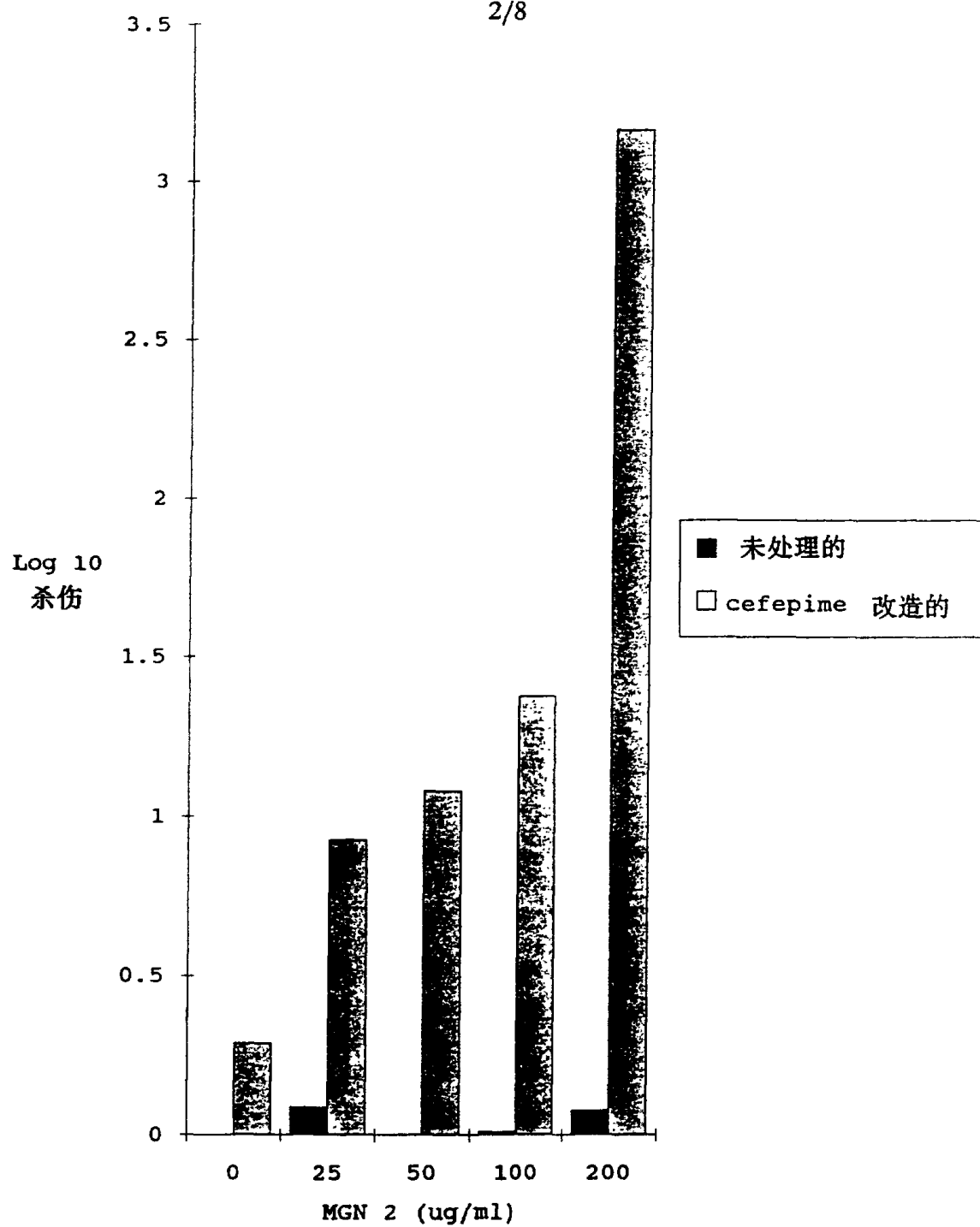


图 2

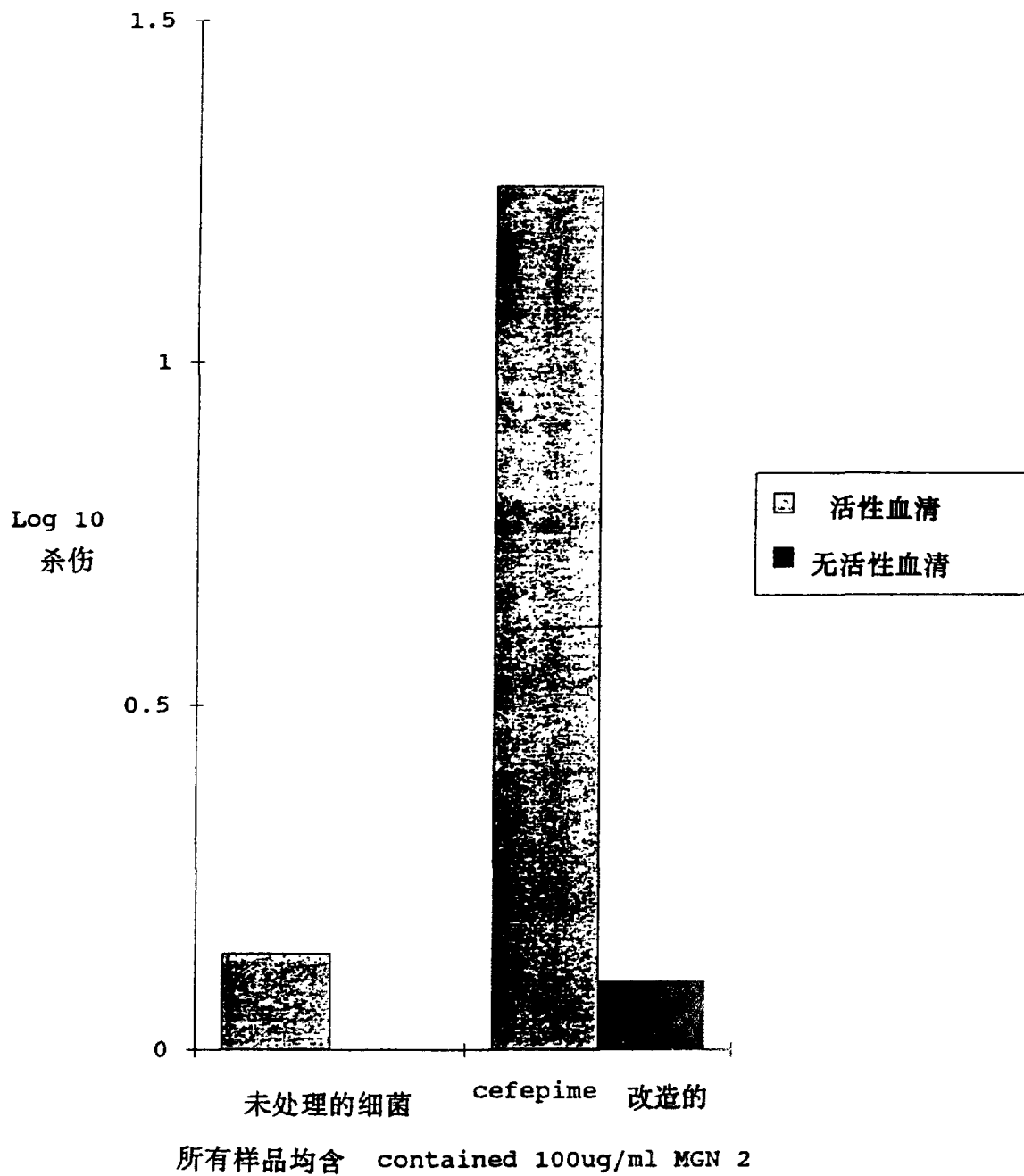


图 3

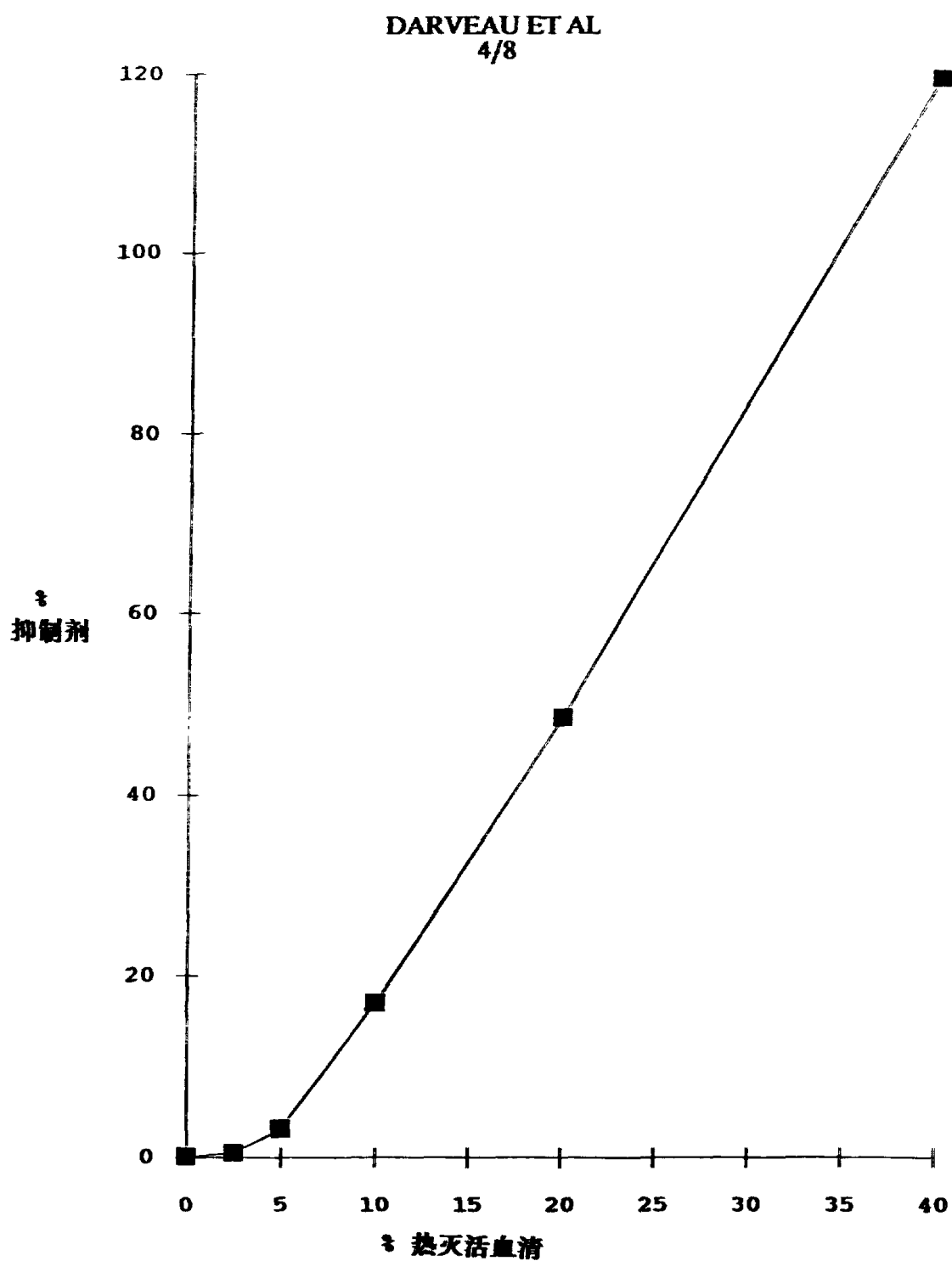


图 4

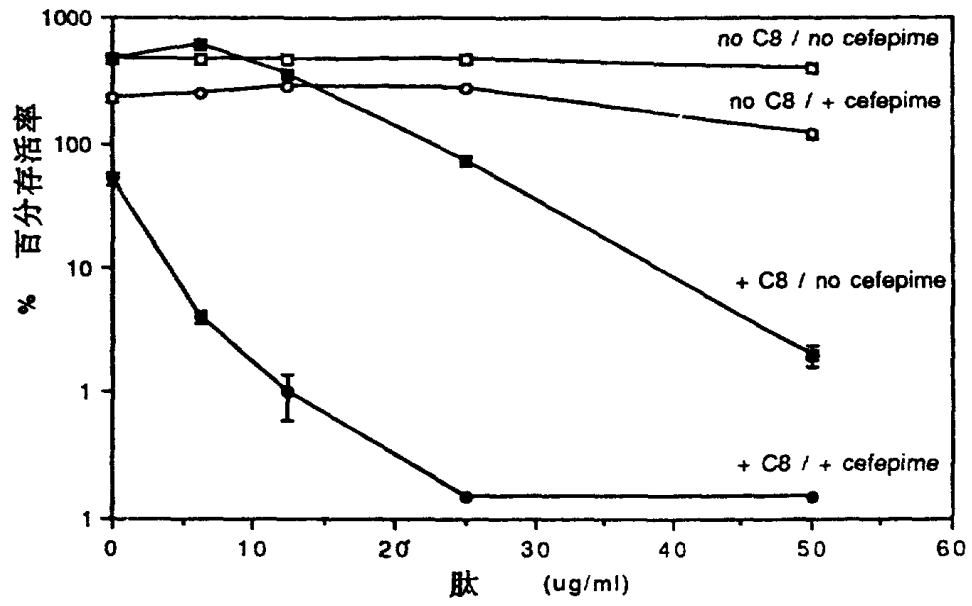


图 5

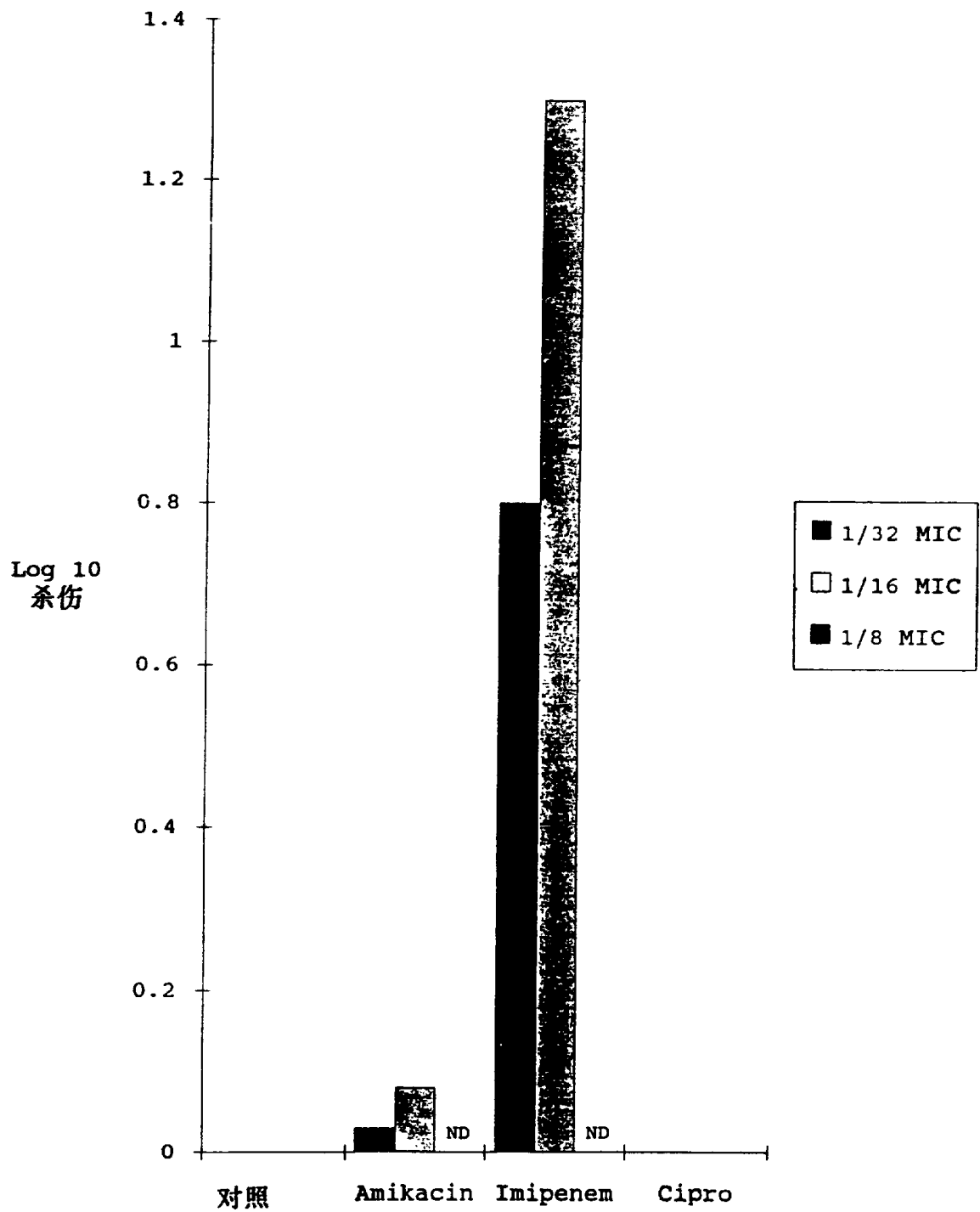


图 6

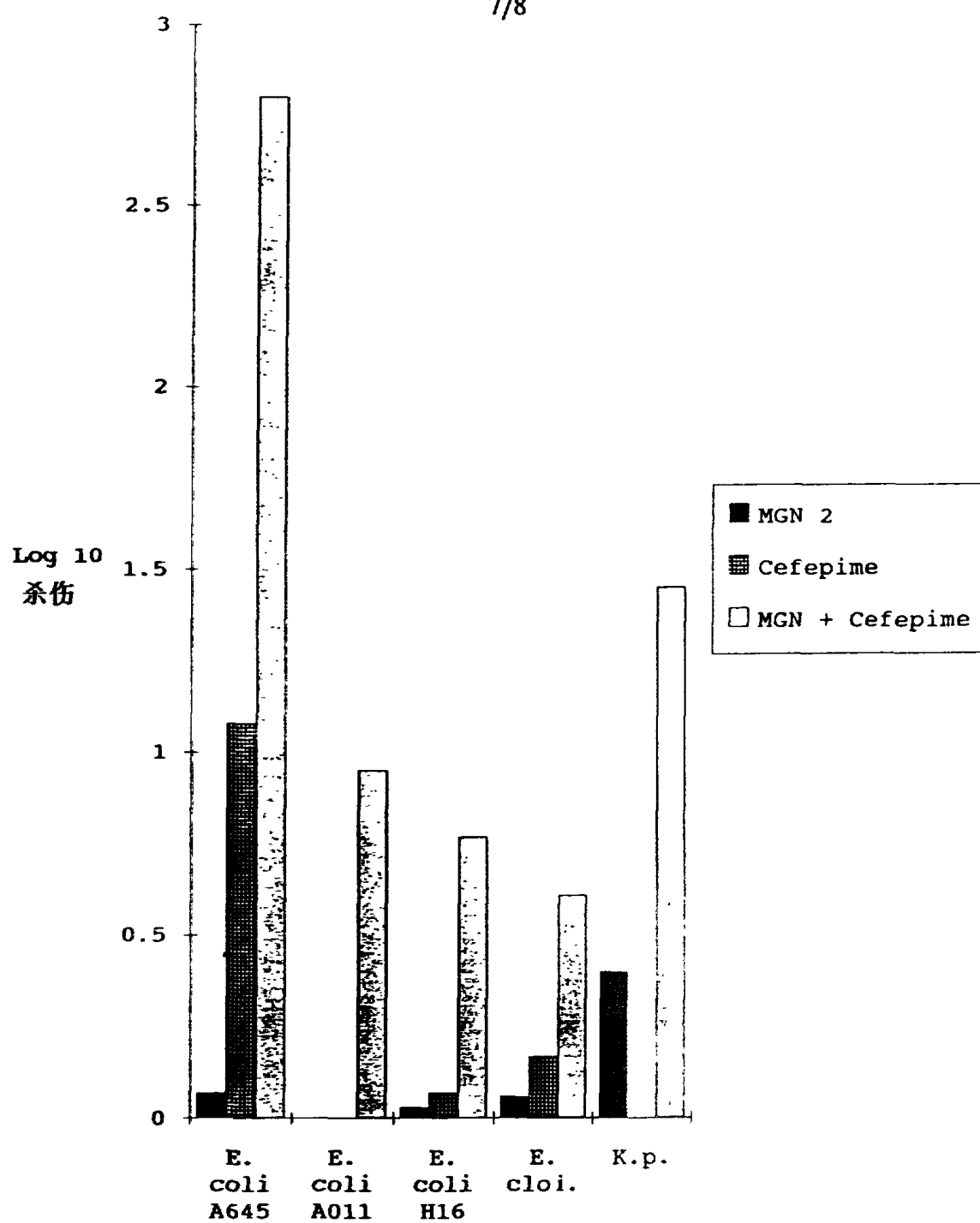


图 7

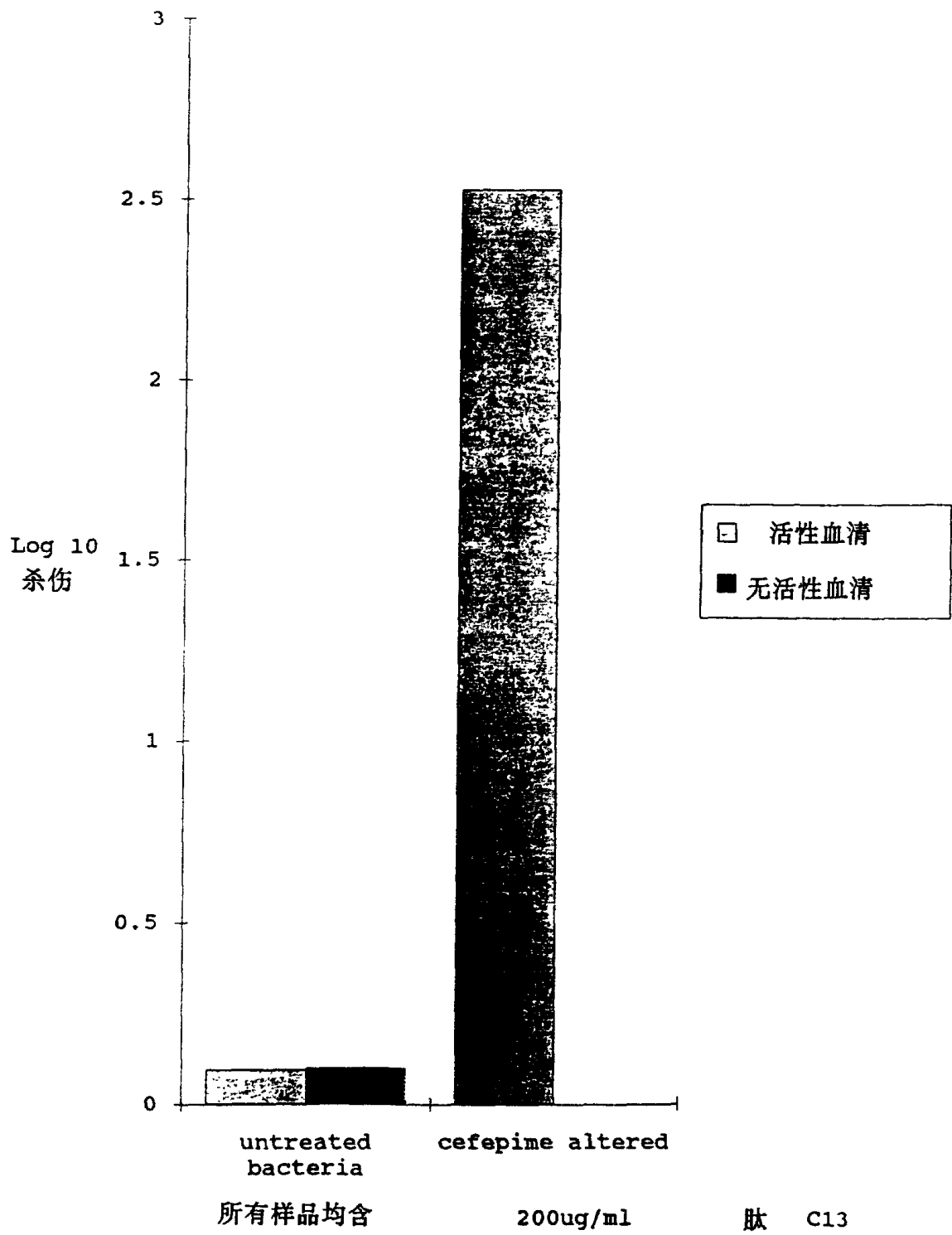


图 8