



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115137733 B

(45) 授权公告日 2024.01.02

(21) 申请号 202211021342.2

(22) 申请日 2022.08.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115137733 A

(43) 申请公布日 2022.10.04

(73) 专利权人 吉林大学
地址 130000 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 王建锋 石琳琳 邓旭明 周永林
邱家章 房天琪 张灿 冯海华
马赫然

(74) 专利代理机构 北京专赢专利代理有限公司
11797
专利代理师 李斌

(51) Int.Cl.

A61K 31/575 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2018339015 A1, 2018.11.29

CN 103857440 A, 2014.06.11

US 2017043026 A1, 2017.02.16

US 2007197485 A1, 2007.08.23

US 2016128944 A1, 2016.05.12

US 2012082659 A1, 2012.04.05

审查员 李雯

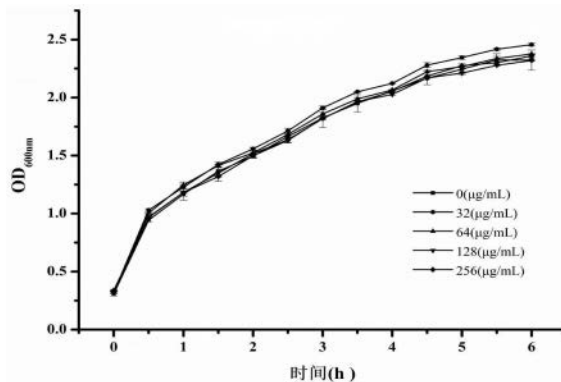
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用

(57) 摘要

本发明涉及熊去氧胆酸的一种新的用途,公开了熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用,包括熊去氧胆酸与多粘菌素E联用在制备抗MCR-3阳性菌感染药物中的应用;熊去氧胆酸与多粘菌素E联用在制备用于治疗MCR-3沙门氏菌,15E464mcr-3分离株感染引起疾病的药物中的应用。本发明提供了熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的新医用用途,公开了熊去氧胆酸能够抑制MCR-3酶的活性,恢复多黏菌素E对MCR-3肠杆菌的杀菌活性;熊去氧胆酸联用多黏菌素E对多黏菌素E对MCR-3沙门氏菌引起的感染具有良好的治疗效果,具有广泛的医用用途。



- 1.熊去氧胆酸与多粘菌素E联用在制备抗MCR-3阳性菌感染药物中的应用；
所述熊去氧胆酸与多粘菌素E联用后能够恢复多粘菌素E对MCR-3沙门氏菌15E464 mcr-3分离株的杀菌活性；
所述熊去氧胆酸的浓度为64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，多粘菌素E的浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及熊去氧胆酸的一种新的用途,尤其涉及熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用。

背景技术

[0002] 迄今为止,已在从人类、食物、动物、农场和环境中的不同细菌物种中鉴定出MCR-3基因的变体。2015年在中国发现质粒介导的粘菌素抗性基因MCR-3以及MCR-1通过接合在细菌中的全球传播已被发现。

[0003] 多粘菌素是分子量为 1200 Da 的小脂多肽,带有连接到疏水脂肪酸的聚阳离子环。包括粘菌素在内的多粘菌素是组织良好的药物,并且多重耐药革兰氏阴性细菌感染的发生率不断增加。粘菌素的机制是通过与革兰氏阴性菌的脂多糖结合并随后分解膜来介导的。粘菌素(多粘菌素 E)被认为是临床使用中治疗革兰氏阴性细菌感染的最后一种抗生素,因此耐粘菌素肠杆菌科是全球公认的对公共卫生的重要威胁。现今需要寻找一种可以替代抗生素的天然化合物。

[0004] 熊去氧胆酸,化学名称为 $3\alpha,7\beta$ -二羟基- 5β -胆甾烷-24-酸,为有机化合物,无臭,味苦。医学上用于增加胆汁酸分泌,并使胆汁成分改变,降低胆汁中胆固醇及胆固醇酯,有利于胆结石中的胆固醇逐渐溶解。但截至目前国内外并没有公开将熊去氧胆酸在制备MCR-3抑制剂中的应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有技术中存在的缺点,而提出的熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0007] 熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用。

[0008] 优选的,熊去氧胆酸与多粘菌素E联用在制备抗MCR-3阳性菌感染药物中的应用;

[0009] 熊去氧胆酸与多粘菌素E联用后能够恢复多粘菌素E对MCR-3沙门氏菌、15E464 mcr-3分离株的杀菌活性。

[0010] 优选的,熊去氧胆酸与多粘菌素E联用在制备用于治疗MCR-3沙门氏菌,15E464 mcr-3分离株感染引起疾病的药物中的应用。

[0011] 优选的,所述的熊去氧胆酸的分子式为 $C_{24}H_{40}O_4$,分子量为392.572。

[0012] 本发明提供了熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的新医用用途,公开了熊去氧胆酸能够抑制MCR-3酶的活性,恢复多黏菌素E对MCR-3肠杆菌的杀菌活性;熊去氧胆酸联用多黏菌素E对多黏菌素E对MCR-3沙门氏菌引起的感染具有良好的治疗效果,具有广泛的医用用途。

附图说明

- [0013] 图1为熊去氧胆酸联合多黏菌素E对MCR-3沙门氏菌,15E464 *mcr-3*分离株的生长曲线;
- [0014] 图2为熊去氧胆酸联合多黏菌素E对MCR-3大肠杆菌,KY924928*mcr-3*分离株的生长曲线;
- [0015] 图3为熊去氧胆酸联合多黏菌素E对MCR-3沙门氏菌,15E464 *mcr-3*分离株的时间-杀菌曲线;
- [0016] 图4为大肠杆菌经熊去氧胆酸和粘菌素处理后的扫描电镜图;
- [0017] 图5为未经处理的大肠杆菌的扫描电镜图。

具体实施方式

[0018] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0019] 试验例1

[0020] 最小抑菌浓度试验:

[0021] 于96孔无菌微孔板内按棋盘法进行熊去氧胆酸、多黏菌素E单用及二者联用抗产MCR-3沙门氏菌,15E464 *mcr-3*分离株的抑菌活性实验,确定二者单独应用及联合应用MIC值,计算部分抑菌浓度指数(FIC)。FIC=MIC(多黏菌素E联合)/MIC(多黏菌素E单用)+MIC(熊去氧胆酸联合)/MIC(熊去氧胆酸单用),熊去氧胆酸联用多黏菌素E对MCR-3阳性菌分离株的MIC及FIC值试验结果见表1:

[0022] 表1

菌株	药物	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		FIC
		单独应用	联合应用	
[0023] <i>Salmonellasp. strain 15E464 (mcr-3)</i>	多黏菌素 E	64	4	0.125
	熊去氧胆酸	>1024	64	
<i>E. coli strain KY924928 (mcr-3)</i>	多黏菌素 E	64	4	0.375
	熊去氧胆酸	>1024	256	

[0024] 结论:熊去氧胆酸单独应用不具备抑菌效果,与多黏菌素E联用能够降低多黏菌素E对*Salmonellasp. strain 15E464 (mcr-3)*和*E. coli strain KY924928 (mcr-3)*的MIC值16倍,FIC数值表明二者具有协同作用。

[0025] 试验例2

[0026] 生长曲线试验:

[0027] 取MCR-3沙门氏菌,15E464 *mcr-3*分离株,接种至LB液体培养基中过夜培养(37 $^{\circ}\text{C}$,200 rpm),次日1:100扩培至OD_{600nm}为0.3左右,分装于5个锥形瓶(20 ml/瓶)中,设定不加药物组和不同浓度熊去氧胆酸处理组。37 $^{\circ}\text{C}$,200 rpm继续培养,每隔1h测定并记录每组样品的OD_{600nm},直至细菌生长至平台期,绘制生长曲线(图1)。

[0028] 结论:在4h或6h的培养时间内,熊去氧胆酸处理组(32-256 $\mu\text{g/ml}$)与未加药物处理组相比,细菌生长至平台期OD_{600nm}值无显著差异,表明广藿香酮在有效浓度范围内不影响

细菌正常生长。

[0029] 取MCR-3大肠杆菌, KY924928 *mcr-3*分离株, 接种至LB液体培养基中过夜培养(37 °C, 200 rpm), 次日1:100扩培至OD_{600nm}为0.3左右, 分装于5个锥形瓶(20 ml/瓶)中, 设定不加药物组和不同浓度熊去氧胆酸处理组。37 °C, 200 rpm继续培养, 每隔1h测定并记录每组样品的OD_{600nm}, 直至细菌生长至平台期, 绘制生长曲线(图2)。

[0030] 结论: 在4或6h的培养时间内, 熊去氧胆酸处理组(32-256 μg/ml)与未加药物处理组相比, 细菌生长至平台期OD_{600nm}值无显著差异, 表明广藿香酮在有效浓度范围内不影响细菌正常生长。

[0031] 试验例3

[0032] 时间-杀菌曲线试验:

[0033] 取MCR-3沙门氏菌, 15E464 *mcr-3*分离株过夜培养物, 调整至 1×10^8 CFUs/mL, 备用。分别取无菌试管4组(无药对照组、64μg/mL熊去氧胆酸组、4 μg/mL多黏菌素E组及熊去氧胆酸联用多黏菌素E组), 每组标记为1、3、5、7、9h, 所有试管内均加入1 mL高压灭菌的LB培养基, 之后, 每管内均加入10 μL调整后的菌液, 使每个试管内的菌液浓度为 5×10^5 CFUs/mL。其中熊去氧胆酸组、多黏菌素E组及熊去氧胆酸联用多黏菌素E组分别加入对应用量的抗生素及抑制剂, 混匀之后立即将无抗生素对照组的菌液进行涂板计数, 作为0 h的菌落数。之后, 每1、3、5、7及9 h分别取对应试管内的菌液, 涂板计数, 绘制时间-杀菌曲线(图3)。

[0034] 结论: 熊去氧胆酸与多黏菌素E联用组在10 h内均比无药对照组、熊去氧胆酸组和多黏菌素E组杀菌效果显著, 且效果稳定。

[0035] 试验例4

[0036] 扫描电子显微镜 (SEM) 分析:

[0037] 过夜培养的大肠杆菌*E. coli* strain KY924928 (*mcr-3*) 用熊去氧胆酸(64μg/mL)和粘菌素(4μg/mL)组合在37°C下处理4h-5h, 洗涤、离心并重悬于PBS中, 以获得0.5 OD_{600nm}的细菌样液。将样品与含有多聚赖氨酸(1%)的新鲜PBS缓冲液预孵育, 然后在4°C下在戊二醛中固定过夜。通过SEM(Hitachi S3400, Tokyo, Japan)观察细菌的形态变化。

[0038] 结论: 在扫描电镜下, 联合治疗与图4中的空白组相比, 细菌形态发生显著变化, 死大肠杆菌*E. coli* strain KY924928 (*mcr-3*) 细胞壁明显收缩, 呈球形, 见图5。

[0039] 本发明涉及熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的应用, 通过棋盘法和时间-杀菌曲线法验证熊去氧胆酸能够恢复多粘菌素对MCR-3沙门氏菌的杀菌活性, 通过分子对接计算了MCR-3熊去氧胆酸复合物、与纯蛋白MCR3的均方根波动(RMSF)。

[0040] 在熊去氧胆酸存在下, 氨基酸的波动会一定程度的减弱, 因此熊去氧胆酸可以与抗生素联用, 增加对超级耐药菌使用药物的选择性, 降低多黏菌素用量, 恢复多粘菌素对革兰氏阴性菌的敏感性有着重要意义

[0041] 本发明提供了熊去氧胆酸在制备MCR-3酶抑制剂中的新医用用途, 公开了熊去氧胆酸能够抑制MCR-3酶的活性, 恢复多黏菌素E对MCR-3肠杆菌的杀菌活性; 熊去氧胆酸联用多黏菌素E对多黏菌素E对MCR-3沙门氏菌引起的感染具有良好的治疗效果, 具有广泛的医用用途。

[0042] 以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此,

任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

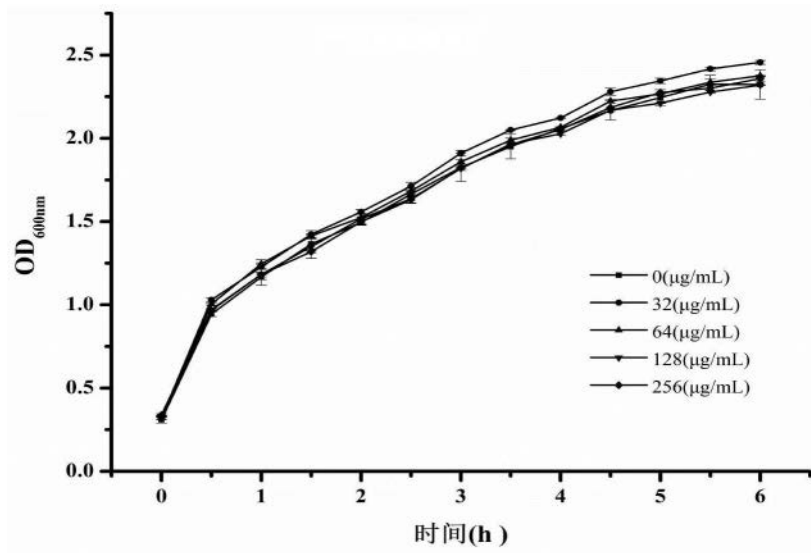


图1

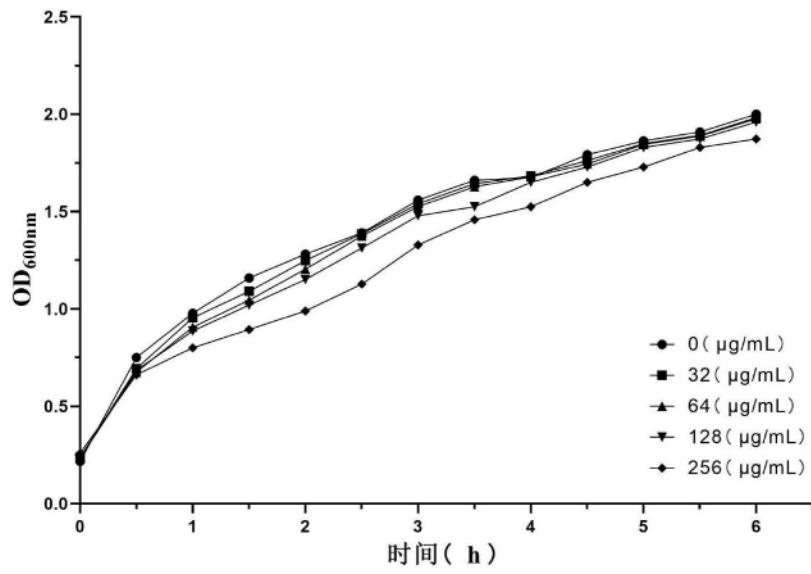


图2

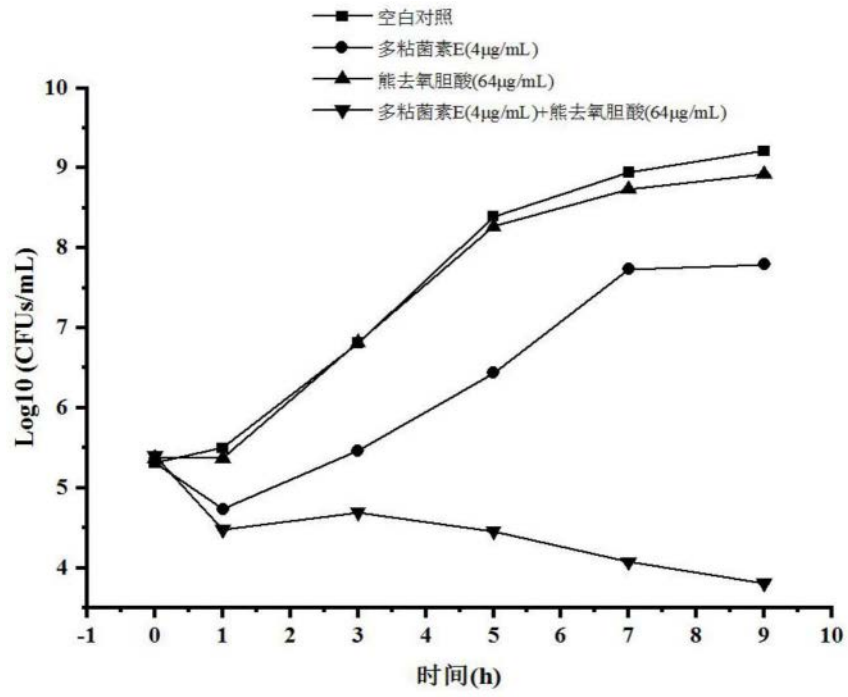


图3

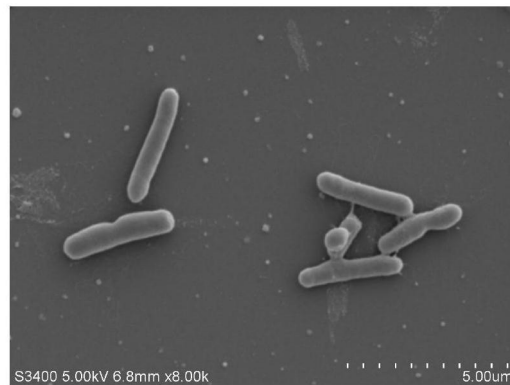


图4

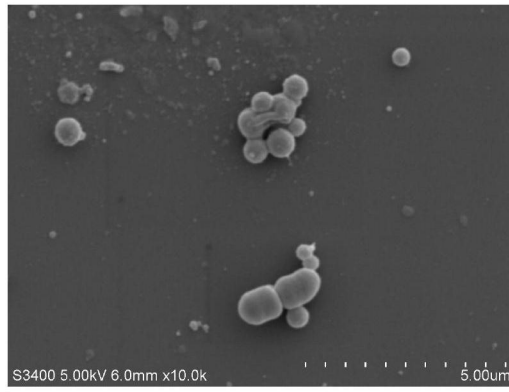


图5