

新型糖肽类抗生素 B7011 对细菌感染小鼠败血症的体内抗菌作用研究

朱珍真¹ 郎丽巍¹ 王红艳¹ 朱姗姗¹ 韩晓彤² 张翠英² 曹艳茹² 魏振满^{1,*}

(1 中国人民解放军总医院第五医学中心药学部药物试验中心, 北京 100039; 2 成都雅途生物技术有限公司, 成都 610041)

摘要: **目的** 评价新型糖肽类抗生素 B7011 对临床分离致病菌所致小鼠败血症的体内抗菌作用。**方法** 以耐万古霉素屎肠球菌 (vanomycin-resistant *Enterococci*, VRE)、甲氧西林敏感金葡球菌 (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染败血症小鼠为动物模型, 经尾静脉注射 B7011 及万古霉素, 比较两药对感染小鼠的保护作用。**结果** B7011 对 MSSA、MRSA、VRE 感染小鼠败血症模型有明显保护作用。其 ED₅₀ 分别为 0.722、0.193 和 0.395mg/kg。与万古霉素比较, 在 MRSA 和 VRE 感染的小鼠败血症模型保护试验中, 两药的 ED₅₀ 参数比较 $P<0.05$, 有显著差异; 在对 MSSA 感染的小鼠败血症模型保护模型中, 两药的 ED₅₀ 参数比较 $P>0.05$, 无显著差异。**结论** 实验结果表明, B7011 对革兰阳性菌有很好的抗菌作用, 尤其是可以显著降低耐药菌急性感染败血症小鼠的死亡数量, 其保护作用明显优于万古霉素。结合体外试验结果, 说明 B7011 有望成为临床上应用于耐药菌感染的, 具有较好疗效的新型抗生素。

关键词: 糖肽类抗生素; 败血症; 革兰阳性菌; 急性感染; 耐药性

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

In vivo antimicrobial activities of novel glycopeptide antibiotics B7011 in murine septicemia model of bacterial infections

Zhu Zhen-zhen¹, Lang Li-wei¹, Wang Hong-yan¹, Zhu Shan-wei¹, Han Xiao-tong², Zhang Cui-ying²,
Cao Yan-ru² and Wei Zhen-man¹

(1 Drug Trial Center, Pharmaceutical Department, Chinese PLA General Hospital, No.5 Medical Center, Beijing 100039;

2 Yacht Biotechnology Company, Chengdu 610041)

Abstract Objective To evaluate *in vivo* antimicrobial activities of novel glycopeptide antibiotics B7011 in murine septicemia model of clinic isolated bacterial infections. **Methods** We researched the protective effects of B7011 and vancomycin in septicemia model of Gram-positive bacterial infections, and then we calculated and compared the ED₅₀ and ED₉₅ of the two drugs with DAS2.1.1. **Results** B7011 showed good protective effects in septicemia model of MSSA, MRSA, and VRE infections. The ED₅₀ values against the three bacteria were 0.722, 0.193, and 0.395mg/kg, respectively. Compared to vancomycin, in protective test of septicemia model in mice infected with MRSA and VRE, the ED₅₀ parameters of the two drugs were significantly different ($P<0.05$). In the protective test of septicemia in mice infected with MSSA, there was no significant difference in ED₅₀ parameters between the two drugs ($P>0.05$). **Conclusion** The results showed that B7011 had a good antibacterial effect against Gram-positive bacteria, especially that the death amount of the mice with acute infections of the drug-resistant bacteria could be obviously reduced, and the protective effect was obviously better than vancomycin. Combined with test *in vitro*, the results indicate that B7011 is expected to be a new type of antibiotic which is clinically applied to drug-resistant bacteria and has a better therapeutic effect.

收稿日期: 2018-10-29

作者简介: 朱珍真, 女, 生于 1985 年, 主管药师, 研究方向为药理学, E-mail: 11068131@163.com

* 通讯作者, E-mail: weizhenman@sina.com.cn

随着细菌耐药程度日趋上升,其中葡萄球菌及肠球菌都具有较高水平的耐药性^[1-2],由其引起的败血症、急性肺炎以及皮肤和软组织感染等严重感染疾病,增加了患者的痛苦^[3],针对此类感染,研发新型抗生素已经迫在眉睫。

目前,万古霉素、利奈唑胺、达托霉素等抗生素是临床上治疗耐药菌感染的常用药。但是随之而来的是细菌对这些药物的敏感性呈逐年下降的趋势,再加之万古霉素、利奈唑胺等药物具有较大的毒副作用,使其在临床上的应用受到一定程度的限制^[4-5]。

B7011 是成都雅途生物技术有限公司自主研发的半合成第二代糖肽类抗生素,本研究的前期试验中,我们检测了 B7011 和万古霉素对目标菌株的体外抗菌活性,测得 B7011 对 MSSA、MRSA、VRE 的 MIC 值分别为 ≤ 0.125 、 ≤ 0.125 和 $0.015\mu\text{g/mL}$,均显著低于万古霉素 (1 、 1 和 $>256\mu\text{g/mL}$),表明 B7011 具有较好的体外抗菌活性。本研究以 VRE、MSSA 和 MRSA 感染败血症小鼠为动物模型,研究 B7011 对败血症小鼠的保护作用。

1 试验材料

1.1 试验药品

试验药: B7011, 成都雅途生物技术有限公司研制;批号: 121210-2, 效价: 97%; 对照药: 万古霉素 (vancomycin), 美国礼来制药公司研制;批号: c060864, 效价: 100%。

1.2 试验菌株

革兰阳性菌 3 株。其中 MSSA 为标准菌株,其菌号: ATCC29213;而 MRSA 以及 VRE 为临床分离的耐药菌株;以上菌株均由卫生部临床检验中心微生物室提供。

1.3 培养基与孵育条件^[6-7]

葡萄球菌: 恒温 35°C , 在 M-H 培养基中孵育 18h; 屎肠球菌: 恒温 35°C , 在含有 5% 绵羊血的 M-H 培养基中孵育 20~24h。

1.4 试验动物

ICR 种小鼠, 体重控制在 18~22g, 性别见具体实验方法, 由北京市斯贝福试验动物有限公司提供;动物合格证号: SYXK(京)2011-0004;动物饲养地点: 原中国人民解放军第三〇二医院实验技术保障研究中心动物实验室, 实验室许可证号: SYXK(军)2012-0010。

1.5 保护剂

高活性干酵母, 安琪酵母股份有限公司, 生产

日期: 2013 年 4 月 8 日。用纯化水配置成浓度为 5% 的混悬液, 高压后放于 4°C 冰箱保存备用。

2 试验方法

2.1 增毒实验方法^[6-8]

为了得到可导致实验动物 80%~100% 死亡的菌浓度, 即最小致死剂量 (minimum lethal dose, MLD) 菌浓度, 需要对致病菌进行增毒。增毒方法为: 于试验前 1d 将试验用菌接种于 10mL MH 液体培养基中, 按照“1.3 项”所列要求进行培养。用保护剂将培养好的菌原液做 10^{-1} 、 10^{-2} 倍稀释, 并对雄性 ICR 小鼠进行腹腔注射, 注射剂量为每只 0.5mL, 注射后观察。在无菌条件下解剖感染后刚死亡或濒死小鼠, 取心脏血涂于 MH 固体培养基上继续培养细菌, 再以此菌继续感染小鼠, 按此方法重复实验 2~3 次, 得到 MLD 菌浓度。

2.2 免疫低下小鼠的建模^[6-9]

由于 VRE 毒力较弱, 故用腹腔注射 VRE 菌液造成小鼠急性败血症时, 需在感染前先将试验小鼠制备成免疫低下小鼠, 以提高感染的成功率。制备方法为: 分别于第 1 天和第 4 天, 对 ICR 小鼠进行一次皮下注射环磷酰胺, 注射剂量为 200mg/kg/次, 通过此方法, 可以使小鼠的白细胞值降至 $100\sim150\times10^9/\text{L}$, 末次注射环磷酰胺 16h 后再腹腔注射感染 VRE 菌液, 可以保证模型对照组的死亡率在 80% 以上。

2.3 药液稀释方法^[10]

采用孙瑞元介绍的低比值系列稀释方法, 即相临两个剂量组的药液以 0.65~0.7 倍进行稀释, 一共稀释 6~7 个浓度。药物剂量可以通过预实验数据获得。在正式试验中, 最高药物剂量应尽量保证感染鼠存活率达到 70%~100%, 最低药物剂量应尽量使得感染鼠的存活率低于 30%。

2.4 ED_{50} (50% 有效剂量) 动物保护试验^[6-7]

将体重为 18~20g 的 ICR 种小鼠进行随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。禁食后, 取 5% 高活性干酵母混悬液配制的 MLD 浓度的菌液, 按每只 0.5mL 的剂量, 以腹腔注射的方式建立感染模型。注射后 1h, 通过尾静脉注射给予不同浓度的药物, 剂量为每只 0.2mL。感染后连续观察 7d, 记录各给药组、阳性对照组以及 MLD 和 0.1 MLD 感染组小鼠死亡数, 将给药剂量和对应的小鼠死亡数导入 DAS 2.1.1 软件进行半数有效剂量的运算, 得到试验药和对照药的 ED_{50} 、 ED_5 、 ED_{95} , 以及两药药效学参数比较 P 值

结果。

3 结果

3.1 对 MSSA 致小鼠急性感染败血症模型的保护作用

B7011 对 MSSA-ATCC 29213 致小鼠急性败血症模型的保护作用结果为: ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为 0.722、0.468 和 1.115mg/kg。阳性对照药万古霉素对敏感菌所致败血症模型也有较好的保护作用, 其 ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为 0.764、0.416 和 1.403mg/kg; 比较两药的保护作用, 统计结果 $P=0.645$, 提示差异无统计意义。表明 B7011 对 MSSA 所致小鼠急性败血症模型的体内保护作用与阳性对照药万古霉素相似。具体数值见表 1~2。

3.2 对 MRSA 致小鼠急性感染败血症模型的保护作用

B7011 对 MRSA- C118 致小鼠急性败血症模型的保护作用结果为: ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为 0.193、0.045 和 0.82mg/kg, 阳性对照药万古霉素组的感染动物死亡数量明显多于试验药组, 其 ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为: 0.374、0.092 和 1.515mg/kg; 比较两药的保护作用, 统计结果 $P<0.05$, 差异有统计意义, 由此可见, 针对耐药菌感染所致的小鼠急性败血症模型, 新型糖肽类抗生素 B7011 的体内保护作用明显

优于万古霉素。具体数值见表 1~2。

3.3 对 VRE 致小鼠感染败血症模型的保护作用

B7011 对 VRE-No.5 所致小鼠急性败血症模型的保护结果为: ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为 0.395、0.046 和 3.429mg/kg, 而该致病菌对阳性对照药万古霉素产生了明显的耐药性, 导致即使提高了万古霉素的给药剂量, 但动物的死亡数量仍然较多。万古霉素对 VRE 的 ED₅₀、ED₅、ED₉₅ 值分别为 1.547、0.079 和 30.168mg/kg; 两药统计学处理 P 值 <0.01 , 差异有统计意义。说明 B7011 对 VRE 所致小鼠急性败血症模型体内保护作用明显优于万古霉素。具体数值见表 1~2。

4 讨论

B7011 是成都雅途生物技术有限公司自主研发的半合成第二代糖肽类抗生素。与其他糖肽类抗生素相似, B7011 的药理作用为: 与处于分裂期的细胞壁肽聚糖前体末端的氨基酰-D-丙氨酰-D-丙氨酸结合, 以此阻碍细胞壁的合成, 从而起到抑制并杀灭细菌的作用^[11-12]。不同的是, B7011 在糖基侧链中加入了一条饱和烃基链, 长度为 11 个碳原子, 这一脂肪链的引入起到了大幅增加 B7011 半衰期的作用, 而且还有利于药物分子与致病菌细胞膜的锚定, 从而增加了 B7011 的抗菌活性。

前期的体外试验结果表明 B7011 抗菌谱主要

表 1 对 3 株菌所致小鼠急性败血症模型各组给药剂量及给药后动物死亡数量表

Tab. 1 Drug dosage for acute septicemia induced by three strains of bacteria and mortality of animals after administration

菌株	MLD (/CFU/mL)	药物	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组	第 7 组
			药物剂量 /(mg/kg)/ 死亡小鼠数 (n)						
MSSA	5.4×10 ⁹	B7011	2.040(0)	1.428(0)	1.000(1)	0.700(6)	0.490(9)	0.343(10)	0.240(10)
		万古霉素	5.000(0)	3.500(0)	2.450(0)	1.715(0)	1.201(1)	0.840(5)	0.588(7)
MRSA	5.06×10 ⁸	B7011	1.500(0)	1.050(0)	0.735(0)	0.515(3)	0.360(3)	0.252(3)	0.176(5)
		万古霉素	1.500(0)	1.050(0)	0.735(2)	0.515(6)	0.360(6)	0.252(9)	0.176(10)
VRE	9×10 ⁷	B7011	1.000(2)	0.700(4)	0.490(6)	0.343(7)	0.240(7)	0.168(7)	0.118(8)
		万古霉素	2.500(4)	1.750(6)	1.225(6)	0.858(7)	0.600(7)	0.420(7)	0.294(9)

表 2 B7011 及万古霉素对革兰阳性球菌所致小鼠败血症模型保护作用的药效学参数

Tab. 2 Pharmacodynamic parameters of the protective effect of B7011 and vancomycin against systemic infections in mice caused by Gram-positive cocci

菌株	药物	ED ₅₀ /(mg/kg)	ED ₅ /(mg/kg)	ED ₉₅ /(mg/kg)	ED ₅₀ 95% 可信限 (L ₉₅)/(mg/kg)	P 值
MSSA	B7011	0.722	0.468	1.115	0.627~0.832	0.645
	万古霉素	0.764	0.416	1.403	0.632~0.923	
MRSA	B7011	0.193	0.045	0.82	0.119~0.311	0.026*
	万古霉素	0.374	0.092	1.515	0.278~0.503	
VRE	B7011	0.395	0.046	3.429	0.261~0.597	0.002*
	万古霉素	1.547	0.079	30.168	0.772~3.100	

注: “*” 差异有统计意义

为革兰阳性菌。本研究检测了 B7011 和万古霉素对目标菌株的体外抗菌活性,测得 B7011 对 MSSA、MRSA、VRE 的 MIC 值分别为 ≤ 0.125 、 ≤ 0.125 和 $0.015\mu\text{g/mL}$,均显著低于万古霉素 (1 、 1 和 $>256\mu\text{g/mL}$)。

基于此,本研究开展了 B7011 体内抗菌作用研究。利用临床常见的革兰阳性菌急性感染 ICR 小鼠来制备败血症动物模型,给与不同剂量的药物,比较 B7011 和药性对照药万古霉素对败血症小鼠的保护作用。从已完成的 ED_{50} 动物保护试验结果可以看出: B7011 可以降低临床常见致病菌急性感染的败血症小鼠的死亡数量,特别是对万古霉素已经产生耐药的菌株,其保护作用尤为显著。结合体外试验数据,我们可以期待新型糖肽类抗生素 B7011 有望成为临床上应用于耐药菌感染的具有较好疗效的药物。目前该药已成功申请临床试验批件,将对其安全性、有效性和药动学特征等方面进行全面的研究与评估。

参考文献

- [1] Wong J W, Ip M, Tang A, *et al.* Prevalence and risk factors of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in Asia-Pacific region from 2000 to 2016: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Epidemiol*, 2018, 12(10): 1489-1501.
- [2] Shilo N, Quach C. Pulmonary infections and community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A dangerous mix [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2011, 12(3): 182-189.
- [3] 赖崇发, 严华成, 石磊, 等. 抗 MRSA 感染新药的应用与研究进展 [J]. 国外医药抗生素分册, 2017, 38(4): 166-178.
- [4] Chen L F. The changing epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: 50 years of a super bug[J]. *Am J Infect Control*, 2013, 41(5): 448-451.
- [5] Álvarez R, López Cortés L E, Molina J, *et al.* Optimizing the clinical use of vancomycin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(5): 2601-2609.
- [6] 朱珍真, 陈贞, 郎丽巍, 等. 利他唑酮干混悬剂体内抗菌作用研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 249-254.
- [7] 朱珍真, 陈贞, 王琪, 等. 利他唑酮注射剂体内抗菌作用研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(11): 865-868.
- [8] 肖秀美, 肖永红. 粒细胞减少小鼠大腿金黄色葡萄球菌感染动物模型的建立 [J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(1): 45-49.
- [9] 陈海龙, 宫立众, 郭建巍, 等. 小鼠侵袭性肺曲霉病模型的建立 [J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2013, 7(3): 6-12.
- [10] 孙瑞元. 定量药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 154-229.
- [11] Roberts K D, Sulaiman R M, Rybak M J. B7011 and oritavancin: An innovative approach to the treatment of gram-positive infections[J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35(10): 935-948.
- [12] 铁远, 刘蕾. 新型脂糖肽类抗生素达巴万星、奥利万星和特拉万星的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(22): 2542-2549.