



(10) 授权公告号 CN 109414485 B

(45) 授权公告日 2022.08.12

(21) 申请号 201780032711.9

(22) 申请日 2017.04.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109414485 A

(43) 申请公布日 2019.03.01

(30) 优先权数据
62/342,382 2016.05.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/027458 2017.04.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/204918 EN 2017.11.30

(73) 专利权人 埃欧艾米斯公司

地址 美国阿肯色

(72) 发明人 R·C·爱伦

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 唐伟杰

(51) Int.Cl.

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

审查员 季璇馨

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

用于抑制脂多糖和脂质A的髓过氧化物酶组合物和方法

(57) 摘要

提供了包含髓过氧化物酶和产生过氧化物的氧化酶组合的组合物和使用该组合物灭活革兰氏阴性细菌脂多糖和脂质A内毒素的方法。

1. 一种组合物在制备用于在具有革兰氏阴性细菌感染的人或动物受试者中的位置抑制存在的脂多糖内毒素的活性的药物中的用途,所述药物被制备成向存在脂多糖内毒素的位置施用的形式,所述组合物中包含髓过氧化物酶作为唯一的活性成分,其中所述髓过氧化物酶直接接触、结合、并抑制脂多糖内毒素的活性。

2. 权利要求1的用途,其中所述髓过氧化物酶结合并抑制脂质A的内毒素活性,所述脂质A是脂多糖的毒性组分。

3. 权利要求1或2的用途,其中人或动物受试者患有牙龈、眼睛、耳朵、皮肤、软组织、伤口、阴道区域、腹股沟区域、褥疮或烧伤区域的细菌感染。

4. 权利要求1的用途,其中所述药物被制备成向脂多糖内毒素的位置递送髓过氧化物酶的剂型。

5. 权利要求4的用途,其中所述药物为局部、灌洗、口服、阴道或直肠栓剂的剂型。

6. 权利要求1的用途,其中所述药物进一步包含药学上可接受的载体。

用于抑制脂多糖和脂质A的髓过氧化物酶组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年5月27日提交的美国临时申请No.62/342382的权益。

[0003] 发明背景

[0004] 细菌毒素通过直接损害宿主组织和通过使免疫系统失效而促进感染和疾病。细菌毒素有两种类型：外毒素和内毒素。外毒素是由细菌分泌的并且取决于细菌而引起各种症状。例如，细菌外毒素是导致白喉、破伤风、肉毒杆菌中毒、霍乱、腹泻、猩红热、中毒性休克综合征和脑膜炎的原因。内毒素是脂多糖（“LPS”），且脂多糖分子的主要毒性脂质组分是脂质A。内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成部分，并且在细胞死亡时被释放。血液中的内毒素会导致发烧、腹泻、感染性休克，以及内脏器官如肾脏、肝脏、肾上腺和肺的功能的丧失。

[0005] 治疗革兰氏阴性细菌感染是具有挑战性的，因为杀死细菌导致内毒素的释放。例如，贾-赫氏 (Jarisch-Herxheimer) 反应，一种具有类似细菌性败血症的体征和症状的病症，其出现在抗生素治疗期间当内毒素从革兰氏阴性螺旋体细菌释放时，所述革兰氏阴性螺旋体细菌如密螺旋体属 (*Treponema*) (梅毒的致病因子) 和疏螺旋体菌属 (*Borellia*) (莱姆病的致病因子)。因此，需要一种抗革兰氏阴性细菌的杀微生物剂，其将不仅杀死细菌，还灭活在细菌死亡时释放的内毒素。如下面进一步讨论的，本发明解决了这个和其它需求。

[0006] 本领域公知髓过氧化物酶/过氧化氢/卤化物系统杀死细菌感染因子，包括革兰氏阴性细菌。如在美国专利No.5,888,505,6,294,168和8,945,540中所公开的，当浓度有限时，髓过氧化物酶选择性地结合，并且在过氧化物和卤化物存在下，杀死靶标微生物而不显著损害介质中的其他组分，如宿主细胞和正常菌群。由于髓过氧化物酶的选择性结合特性，当靶标微生物具有对髓过氧化物酶的结合能力大于期望微生物对髓过氧化物酶的结合能力时，靶标微生物选择性地结合髓过氧化物酶，使髓过氧化物酶与期望的微生物几乎没有或没有结合，所述靶标微生物是如病原微生物，所述期望微生物是如正常菌群的乳酸菌成员。在这个方面，髓过氧化物酶表现出高度的选择性结合和选择性杀死所测试的所有革兰氏阴性细菌。

[0007] 在过氧化物和卤化物存在的情况下，靶向结合的髓过氧化物酶催化卤化物氧化反应并促进过氧化物在目标微生物表面上歧化为单线态分子氧 (1O_2)。单线态分子氧具有微秒寿命和约0.2微米的反应半径。如此，氧化 (combustive) 杀微生物作用被限制于与髓过氧化物酶结合的微生物，同时对期望微生物或宿主细胞具有最小的附带损害。因此，如在美国专利No.5,888,505,6,294,168和8,945,540中所公开的，髓过氧化物酶可以被用作人或动物受试者的治疗性或预防性处理中的抗菌剂，以选择性地结合和杀死病原微生物，同时对宿主细胞和宿主的正常菌群具有最小的附带损害。

[0008] 本领域还公知髓过氧化物酶/过氧化氢/卤化物系统在解毒外毒素上是有效的。参见，例如，Agner, K., (1950), "Studies On Peroxidative Detoxification of Purified Diphtheria Toxin", JEM, 92 (4) 337-347; Agner, K., (1955), "Peroxidative Detoxification of Diphtheria Toxin Studied by Using I131, Recueil", 74:373-376;

Agner, K., (1947), "Detoxicating Effect of Verdoperoxidase on Toxins", Nat. 4034: 271-272 (tetanus toxin); 和 Ool et al. (1994), "Inactivation of Clostridium difficile Cytotoxin by the Neutrophil Myeloperoxidase System", J. Infect. Dis. 149 (2): 215-219.

[0009] 所有上述参考文献都教导过氧化氢是抗毒素活性所必需的。现有技术没有教导或轻微暗示在缺乏卤素过氧化物酶 (haloperoxidase) 活性的情况下, 单独的髓过氧化物酶在解毒内毒素方面是有效的。

[0010] 本发明的发明人已经发现, 髓过氧化物酶不但结合革兰氏阴性细菌, 而且结合革兰氏阴性细菌内毒素 (脂多糖) 和脂质A (产生毒性的内毒素组分), 并且这种结合抑制了脂多糖和脂质A的毒性。此外, 本发明的发明人已经惊奇地发现, 内毒素脂多糖/脂质A的髓过氧化物酶抑制不需要卤素过氧化物酶酶促产生次氯酸盐或单线态分子氧。现有技术中没有公开在不存在卤素过氧化物酶活性的情况下, 髓过氧化物酶作为抗脂多糖 (抗内毒素) 和抗脂质A药剂是有效的。

[0011] 本发明证明了用于治疗细菌感染的髓过氧化物酶组合物具有抑制 (解毒) 革兰氏阴性细菌病原体的脂多糖和脂质A内毒素活性的额外优点。因此, 本发明满足了提供有效治疗革兰氏阴性细菌感染的需求, 其既杀死细菌又抑制细菌死亡时释放的内毒素。

[0012] 发明概述

[0013] 这个发明概述是提供以简化的形式介绍选择的概念, 这些概念将在下面的详细说明中被进一步描述。这个发明概述不是旨在标识所要求保护的主题的关键特征, 也不是旨在用于帮助确定所要求保护的主题的范围。

[0014] 本发明涉及使用包含髓过氧化物酶的组合物治疗革兰氏阴性微生物感染的方法, 所述组合物结合和灭活脂多糖 (内毒素) 和脂质A, 脂质A是产生革兰氏阴性细菌毒性的内毒素的脂质组分。本发明提供了治疗患有革兰氏阴性细菌感染的人或动物受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者的革兰氏阴性细菌感染部位施用包含髓过氧化物酶的组合物, 其中所述组合物作用于解毒在感染部位存在的脂多糖和脂质A。

[0015] 在一些实施方案中, 髓过氧化物酶组合物还包含产生过氧化物的氧化酶。产生过氧化物的氧化酶的实施例包括葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶和半乳糖氧化酶。在一些实施方案中, 产生过氧化物的氧化酶是葡萄糖氧化酶。在一些实施方案中, 髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含卤化物。

[0016] 在一些实施方案中, 所述方法还包括在存在氧化酶底物的情况下使感染部位与髓过氧化物酶/氧化酶组合物接触。然而, 髓过氧化物酶的抗毒素活性不依赖于过氧化氢的产生。

[0017] 在一些实施方案中, 髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含至少两种氨基酸。在一些实施方案中, 所述至少两种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸, β 氨基酸如 β 丙氨酸、L- β -高亮氨酸、D- β -高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸、3-氨基丁酸乙酯、肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸, 或它们

的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0018] 在其它实施方案中,所述至少两种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和D-缬氨酸,或它们的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0019] 在一些实施方案中,髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含至少三种氨基酸。在一些实施方案中,所述至少三种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸,β氨基酸如β丙氨酸、L-β-高亮氨酸、D-β-高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸、3-氨基丁酸乙酯、肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸,或其它它们的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0020] 在其它方面,所述至少三种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和D-缬氨酸,或它们的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0021] 在一些实施方案中,所述三种氨基酸是甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含从1至50,000μg/ml的髓过氧化物酶。在其它实施方案中,本发明的组合物包含从0.1至约500mM的至少两种氨基酸中的每一种。在一个代表性的实施方案中,本发明的组合物包含从10至5,000μg/ml的髓过氧化物酶,从0.3至50mM的甘氨酸,从0.3至50mM的L-丙氨酸,从0.3至50mM的L-脯氨酸,和从1至500U/ml的葡萄糖氧化酶。

[0023] 在本发明的一些方面,待治疗的人或动物受试者是患有牙龈、眼睛、耳朵、皮肤、软组织、伤口、阴道区域、腹股沟区域、褥疮或烧伤区域的革兰氏阴性细菌感染。在一些实施方案中,所述感染是多重微生物感染。在其他实施方案中,感染是至少部分地由多重耐药性革兰氏阴性细菌所引起的。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明广泛的针对治疗具有革兰氏阴性细菌感染的人或动物受试者的方法,包括向受试者的革兰氏阴性细菌感染部位施用包含髓过氧化物酶的组合物,其中所述组合物作用于解毒在感染部位存在的脂多糖和脂质A。髓过氧化物酶组合物能够结合和解毒脂多糖(内毒素)和脂质A(产生毒性的内毒素的纯化组分)。

[0026] 在一些实施方案中,髓过氧化物酶组合物还包含产生过氧化物的氧化酶。在髓过氧化物酶组合物包括产生过氧化物的氧化酶的实施方案中,髓过氧化物酶和产生过氧化物的氧化酶协同作用以增加髓过氧化物酶的解毒活性。

[0027] 在有或没有氨基酸的情况下,髓过氧化物酶/氧化酶组合物在脂多糖和脂质A解毒中是有效的。在存在氨基酸的实施方案中,髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含至少两种氨

氨基酸。在一些实施方案中，髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含三种氨基酸。在一些实施方案中，髓过氧化物酶组合物还包含卤化物，例如氯化物、溴化物或碘化物。

[0028] 在一个方面，本发明的方法非常适合用于人或非人的哺乳动物受试者中易感染的局部治疗，其允许本发明的髓过氧化物酶组合物与微生物感染在该部位直接接触，所述微生物感染如例如皮肤、眼睛、耳朵、口腔、鼻腔和鼻窦通道、创伤性损伤部位、手术部位等的革兰氏阴性细菌感染。当与宿主组织接触时，本发明的髓过氧化物酶组合物可以灭活脂质A和脂多糖，同时没有相关的宿主组织破坏或正常菌群的毁坏。

[0029] 可用于本发明的髓过氧化物酶是卤化物：过氧化氢的氧化还原酶（例如，国际生物化学联合会的EC No.1.11.1.7和EC No.1.11.1.10），其中卤化物，即氯化物、溴化物或碘化物是电子供体或还原剂，过氧化物是电子受体或氧化剂。虽然卤素过氧化物酶活性是杀微生物活性所必需的，但是髓过氧化物酶通过直接结合而抑制脂多糖和脂质A，不依赖于卤素过氧化物酶酶促作用。

[0030] 对于大多数目的而言，本发明的组合物将通常包含至少约0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的髓过氧化物酶。在一些实施方案中，本发明的组合物将包含从约1至约50,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的髓过氧化物酶，更优选从约5至约10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的髓过氧化物酶，甚至更优选从约10至约5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的髓过氧化物酶。

[0031] 可用于本发明的产生过氧化物的氧化酶包括，例如，氧化酶，如葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶和半乳糖氧化酶。作为代表性的示例，当氧化酶是葡萄糖氧化酶并且其底物是葡萄糖时，本发明的组合物可以包含从约0.05至约3,000U/ml，更优选从约0.1至约1,000U/ml，甚至更优选从约1至约500U/ml的葡萄糖氧化酶，和从约0.1至约100mM，更优选从约0.5至约80mM，甚至更优选从约1至约50mM的葡萄糖。

[0032] 髓过氧化物酶通过直接结合而抑制脂多糖和脂质A的内毒素活性，不依赖于卤素过氧化物酶酶促作用。在卤素过氧化物酶酶促的实施方案中，该方法还包括在卤化物和氧化酶底物存在的情况下使感染部位与组合物接触。

[0033] 在一些实施方案中，本发明的组合物包含至少两种氨基酸，其选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸、 β 氨基酸，如 β 丙氨酸、L- β -高亮氨酸、D- β -高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸和3-氨基丁酸乙酯，以及它们的烷基酯，如例如L-丙氨酸甲酯、D-丙氨酸甲酯、L-赖氨酸甲酯二盐酸盐、甘氨酸甲酯盐酸盐、L-脯氨酸甲酯盐酸盐、L-缬氨酸乙酯盐酸盐和2-氨基丙酸乙酯，以及N-取代的氨基酸，如肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸。

[0034] 在其它实施方案中，本发明的组合物包含至少两种氨基酸，其选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和D-缬氨酸，以及它们的烷基酯。

[0035] 在一些实施方案中，髓过氧化物酶/氧化酶组合物还包含至少三种氨基酸。在一些

实施方案中,所述至少三种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-缬氨酸,β氨基酸如β丙氨酸、L-β-高亮氨酸、D-β-高亮氨酸、3-氨基丁酸、L-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、D-2,3-二氨基丙酸一盐酸盐、L-3-氨基异丁酸、D-3-氨基异丁酸、3-氨基丁酸乙酯、肌氨酸甲酯盐酸盐和3-哌啶甲酸,或它们的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0036] 在其它方面,所述至少三种氨基酸选自甘氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸酐、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸酐、马尿酸、L-组氨酸、L-亮氨酸、D-亮氨酸、L-异亮氨酸、D-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、牛磺酸、L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和D-缬氨酸,或它们的烷基酯或药学上可接受的盐。

[0037] 在一些实施方案中,所述三种氨基酸是甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸。

[0038] 用于本发明组合物中的有用量的氨基酸将根据组合物中髓过氧化物酶的量和使用环境中存在的症状而变化。对于大多数目的而言,本发明的组合物将通常包含从约0.1至约500mM,更优选从约0.2至约100mM,甚至更优选从约0.3至约50mM的每种氨基酸。

[0039] 在不存在底物并因此不存在卤素过氧化物酶活性的情况下,本发明的组合物抑制内毒素,所述组合物包含髓过氧化物酶、产生过氧化物的氧化酶、有或没有氨基酸。然而,与不存在产生过氧化物的氧化酶底物的组合物相比较,本发明的组合物与产生过氧化物的氧化酶底物组合可以产生相当或稍微更大和延长的脂多糖(内毒素)和脂质A抑制作用(即卤素过氧化物酶作用)。

[0040] 在包括产生过氧化物的氧化酶底物的实施方案中,本发明的髓过氧化物酶组合物的活性是杀微生物,这是由于过氧化物和氯化物或溴化物的反应形成次卤酸盐,并且过氧化物和次卤酸盐的反应形成单线态分子氧。用于产生过氧化物目的的特别有用的药剂包括,例如,氧化酶如葡萄糖氧化酶、胆固醇氧化酶和半乳糖氧化酶。

[0041] 作为说明性的示例,适合用作抗毒素制剂的组合物可以包含从约10至5,000μg/ml的髓过氧化物酶,从0.3至50mM的甘氨酸,从0.3至50mM的L-丙氨酸,从0.3至50mM的L-脯氨酸和从1至500单位/ml的葡萄糖氧化酶。

[0042] 本发明的组合物还可以包含卤化物。当卤化物是氯化物时,在本发明组合物中使用的氯化物的量将优选落入到每毫升氯化物溶液中从约10μmol至约200μmol氯化物(即10至200mEq氯化物/L)的范围内。血浆中氯离子的生理浓度是约105mEq/L。当包括时,本发明的组合物可以包含每毫升液体组合物从约0.5μmol溴化物至约20μmol溴化物(即,0.5至20mEq溴化物/L),更优选每毫升液体组合物从约1μmol溴化物至约10μmol溴化物(即,1至10mEq溴化物/L),最优选每毫升液体组合物从约100nmol溴化物至约1μmol溴化物。

[0043] 该组合物可以额外包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中,组合物可以在液体载体中方便的提供。为此,可以通常地使用任何液体载体,条件是载体不会显著的干扰髓过氧化物酶的选择性结合能力或酶活性(如果期望杀微生物的作用)。可选择地,组合物可以在液体中溶解时被活化的固体形式提供。

[0044] 在包括产生过氧化物的氧化酶底物的实施方案中,髓过氧化物酶/氧化酶系统是

适于作为两部分组成 (binary) 制剂构建的,其中组合物的活性成分被配制成在使用时可以联用 (consolidation) 的两个单独部分。例如,两部分组成制剂的第一组合物可以包含含有髓过氧化物酶和氧化酶的溶液。在一些实施方案中,第一组合物包含两种或三种氨基酸。在一些实施方案中,所述三种氨基酸是甘氨酸、L-丙氨酸和L-脯氨酸。两部分组成制剂的第二组合物可以包含氧化酶的底物,例如对于葡萄糖氧化酶的葡萄糖(即右旋糖)。例如,可以以固体薄片的形式提供底物。在一些实施方案中,髓过氧化物酶组合物可以额外包含乙醇,以促进氧化酶底物溶解并被氧化酶利用。

[0045] 在一个实施方案中,本发明的方法包括向感染部位施用包含髓过氧化物酶、产生过氧化物的氧化酶和至少两种氨基酸的第一组合物;和向感染部位施用包含氧化酶底物的第二组合物。在一些实施方案中,第一组合物和第二组合物是在施用至感染部位之前混合的。在一些实施方案中,第一组合物和第二组合物是同时施用于感染部位的。在一些实施方案中,第一组合物和第二组合物是依次施用于感染部位的。第一组合物和第二组合物是可以任何顺序施用的。

[0046] 上述两部分组成制剂可以被用于发挥杀微生物的作用,和可以被用于提高内毒素的抑制作用,但不是通过髓过氧化物酶或髓过氧化物酶-氧化酶复合物而抑制脂多糖和脂质A所需要的。

[0047] 对于局部应用,解毒组合物可以以任何有效的药学上可接受的形式施用于温血动物,包括人和动物受试者,例如以局部、灌洗、口服、阴道或直肠栓剂的剂型,作为局部、口腔、鼻腔喷雾、用于吸入的气溶胶或任何其它方式有效地递送活性髓过氧化物酶至细菌感染部位。将优选地设计给药途径以获得组合物与毒素的直接接触,所述毒素由感染的细菌产生或与其相关。在本发明的一个方面,本发明的组合物被递送或局部施用于受感染或易受感染的人或动物受试者的区域,如例如,牙龈、眼睛、耳朵、皮肤、伤口、阴道区域、腹股沟区域、褥疮、烧伤、医用敷料、尿布或其它可能潮湿的覆盖物下的区域等。

[0048] 对于局部应用,药学上可接受的载体可以采用液体、乳膏、泡沫、洗剂、软膏、悬浮液、栓剂或凝胶的形式,并且可以额外包含水性或有机溶剂、缓冲剂、乳化剂、凝胶剂、保湿剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、防腐剂、延时释放剂和少量保湿剂、多价螯合剂、染料、香料和常用于局部施用的药物组合物中的其它组分。此外,本发明的组合物可以浸渍在敷料或覆盖物中用于应用至受试者。

[0049] 结合下面代表性的示例可以更好地理解前述内容,所述代表性的示例是出于说明性和非限制性目的而提供的。

实施例

[0050] 使用购自Charles River Endosafe,Charleston,South Carolina的Limulus Amebocyte Lysate **Endosafe®** Endochrome-K试剂盒(“LAL”)研究各种试剂对细菌内毒素脂多糖和脂质A的抑制作用。LAL测定法是一种检测和测量样品中细菌内毒素活性的方法。在以下实施例中使用的LAL测定法是动力学比色测定法,其检测和测量颜色的出现。颜色出现的时间与样品中内毒素的量反向相关。通过与标准曲线比较确定未知样品中的内毒素水平。样品中存在的内毒素的量由内毒素单位(“EU”)表示。**Endosafe®** LAL测定法可以检测100-0.001EU/ml。

[0051] 实施例1

[0052] 该实施例证明了包含髓过氧化物酶的组合物对脂多糖内毒素的抑制作用。测试以下四种试剂或试剂的组合：(1) 髓过氧化物酶；(2) 葡萄糖氧化酶；(3) 髓过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和氨基酸；和(4) 髓过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖和氨基酸。

[0053] 本实施例中使用的髓过氧化物酶(“MPO”)是猪髓过氧化物酶(Exoxemis, Inc., Little Rock, Ark, U.S.A.)。葡萄糖氧化酶(“GO”)源自黑曲霉(*Aspergillus niger*), 购自英国Biozyme公司。使用从Genscript, cat#L00338购得的Toxin Eraser Endotoxin Removal试剂盒, 通过使MPO或GO经过多粘菌素b柱两次以除去在测试添加剂中存在的LPS, 进一步纯化髓过氧化物酶和葡萄糖氧化酶。

[0054] 过程. 储备溶液是由以下的测试添加剂制成的: 髓过氧化物酶(1mg/ml); 葡萄糖氧化酶(1mg/ml); E-101(酶)(1mg/ml MPO; 0.25mg/ml GO); E-101(底物)(最终葡萄糖27mg/ml); E-101(完整的)(1mg/ml MPO; 0.25mg/ml GO; 54mg/ml葡萄糖)。

[0055] 如本文所使用的, 术语“E-101(酶)”是指含有髓过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和氨基酸甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸的水性媒介物的溶液, 所述水性媒介物包含150mM氯化钠和0.02%w/v的聚山梨醇酯80的20mM pH6.5的磷酸钠缓冲液。

[0056] 如本文所使用的, 术语“E-101(底物)”是指含有27mg/ml葡萄糖的水性媒介物的溶液, 所述水性媒介物包含150mM氯化钠和0.02%w/v的聚山梨醇酯80的20mM pH6.5的磷酸钠缓冲液。

[0057] 如本文所使用的, 术语“E-101(完整的)”是指通过组合一份E-101(酶)和两份E-101(底物)形成的制剂。

[0058] 使用每孔100 μ L的终体积在96孔微量滴定板上进行测试。以最终期望浓度的两倍制备试剂, 每孔加入50 μ L体积。每孔加入50 μ L的LPS内毒素。在省略试剂的孔中, 用**Endosafe®**测定试剂盒提供的等体积的低内毒素试剂水(“LRW”)代替其体积。

[0059] 通过在测试溶液中在增加的内毒素含量和减少的髓过氧化物酶含量下内毒素的抑制, 确定髓过氧化物酶组合物抑制脂多糖的能力。该方法允许评估1毫克髓过氧化物酶的最大抑制活性, 其中限制内毒素的可用性, 并且还能够比较髓过氧化物酶对葡萄糖氧化酶的抑制活性以及与含有和不含底物的葡萄糖氧化酶的组合对葡萄糖氧化酶的抑制活性。

[0060] 测试了LPS的8个活性(浓度): 每测试溶液40EU、80EU、120EU、300EU、600EU、10000EU、20000EU和40000EU。髓过氧化物酶的浓度从1mg/ml至0.03mg/ml测试溶液不同。单独测试时, 葡萄糖氧化酶的浓度从1mg/ml至0.03mg/ml不同。与髓过氧化物酶组合测试的葡萄糖氧化酶的浓度在从0.25mg/ml至0.0075mg/ml不同。(E101酶和E101完整中MPO与GO的比例为4:1)。使用由**Endosafe®**测定试剂盒提供的低内毒素试剂水(LRW)进行连续稀释。

[0061] 在进行LAL测定之前, 将脂多糖与各种测试添加剂预温育30分钟, 以确定测试样品中存在的内毒素活性的量。在预温育期后, 加入100 μ L显色鲎变形细胞溶解物(*Limulus Amebocyte Lysate*) (LAL) 溶液(Charles River Kit R1708K), 并且使用Tecan Sunrise微孔板分光光度计在405nm波长下测量吸光度的变化。确定在各种浓度的测试试剂中抑制的内毒素的量, 然后外推该值以确定每毫克髓过氧化物酶抑制的内毒素单位的数目。例如, 如果含有40EU LPS和0.5mg/ml MPO的样品导致40EU的完全抑制, 那么由1mg MPO抑制的EU数目被计算为80EU。

[0062] 结果显示在下表1中。表1中的数据报道了由1mg MPO抑制的内毒素单位的量。

[0063] 表1

被抑制的脂多糖内毒素单位/mg MPO				
EU	被抑制的 EU/mg MPO			
起始浓度	MPO	GO	E101 (酶)	E101 (完整的)
40 EU	140* EU	70 ** EU	320 *** EU	528 *** EU
80 EU	154 EU	79 EU	640 EU	640 EU
120 EU	113 EU	115 EU	960 EU	944 EU
300 EU	3600 EU	291 EU	2400 EU	2400 EU
600 EU	4256 EU	532 EU	4800 EU	4472 EU
1000 EU	5096 EU	3056 EU	8000 EU	6696 EU
2000 EU	6984 EU	6984 EU	15816 EU	11056 EU
4000 EU	13360 EU	13360 EU	15672 EU	26720 EU

[0064] [0065] *通过0.25mg/ml MPO抑制了40EU中的35EU,外推至每1mg MPO抑制140EU

[0066] **通过0.5mg/ml GO抑制了40EU中的35EU,外推至每1mg GO抑制70EU

[0067] ***E101 (酶) 和E101 (完整的) 包含比例为4:1的MPO和GO。计算每mg MPO的抑制活性。

[0068] 上述数据表明髓过氧化物酶是脂多糖内毒素的有效抑制剂。数据表明,1毫克的髓过氧化物酶可以抑制超过10,000EU/mL的LPS。当在低浓度LPS下测试时,葡萄糖氧化酶表现出约一半的髓过氧化物酶抑制作用,但是在较高LPS剂量(例如,4,000EU/mL)下,GO也抑制大于10,000EU/mL。

[0069] 与各自MPO和GO形成鲜明的对比,1毫克髓过氧化物酶和0.25毫克葡萄糖氧化酶的组合表现出比没有葡萄糖氧化酶的髓过氧化物酶获得的效果高几倍的抑制作用。对于髓过氧化物酶与葡萄糖氧化酶和葡萄糖(葡萄糖氧化酶的底物)的组合,发现了类似的结果。

[0070] 实施例2

[0071] 该实施例证明了包含髓过氧化物酶的组合对脂质A的抑制作用,所述脂质A是脂多糖的毒性组分。在该实施例中,通过测量在测试溶液中在增加的脂质A含量和减少的髓过氧化物酶含量下的内毒素抑制,确定髓过氧化物酶组合抑制脂质A的能力。测试溶液具有与实施例1中相同的组分和浓度,并且过程是相同的。测试了脂质A的9个活性(浓度):每测试溶液10EU、20EU、40EU、80EU、300EU、600EU、1000EU、2000EU和4000EU。如实施例1进行计算,以确定每毫克髓过氧化物酶抑制的脂质A内毒素单位的数目。结果报道在下表2中。

[0072] 表2

被抑制的脂质 A 内毒素单位/mg MPO				
EU	被抑制的 EU/mg MPO			
起始浓度	MPO	GO	E101 (酶)	E101 (完整的)
10 EU	9 EU	<5 EU	320 EU	320 EU
20 EU	30 EU	<5 EU	640 EU	640 EU
40 EU	27 EU	<5 EU	640 EU	496 EU
80 EU	88 EU	<5 EU	2560 EU	1504 EU
300 EU	336 EU	<5 EU	9568 EU	7456 EU
600 EU	534 EU	124 EU	18434 EU	18176 EU
1000 EU	2616 EU	200 EU	27104 EU	13408 EU
2000 EU	4028 EU	823 EU	55808 EU	50368 EU
4000 EU	8328 EU	591 EU	92864 EU	43760 EU

[0073] 表2中的数据表明单独的髓过氧化物酶和髓过氧化物酶与葡萄糖氧化酶组合对脂质A活性的抑制作用甚至比表1中数据表明的髓过氧化物酶对脂多糖活性的抑制作用更显著。表2中的数据显示葡萄糖氧化酶单独对脂质A几乎没有抑制作用,但是单独的髓过氧化物酶对脂质A的抑制作用大于8,000EU/mg MPO(从4,000EU的脂质A的抑制外推)。在相同的4,000EU脂质A浓度下,MPO和GO的组合表现出对脂质A大于92,000EU/mg髓过氧化物酶的抑制作用。

[0075] 这些数据显示葡萄糖氧化酶和髓过氧化物酶的组合作为革兰氏阴性细菌脂质A内毒素活性的有效抑制剂协同作用。此外,如实施例1,数据显示内毒素抑制作用不依赖于卤素过氧化物酶杀微生物的活性。值得注意的是,在酶活性制备物中,对脂质A的抑制作用出现轻微降低。

[0076] 实施例3

[0077] 表1和表2中的数据表明,髓过氧化物酶和髓过氧化物酶:葡萄糖氧化酶对内毒素的抑制作用与测试的内毒素(LPS或脂质A)的浓度成比例;即,相对于所测试的一系列内毒素的内毒素增加,反应基本上是一阶的。

[0078] 为了测试髓过氧化物酶抑制内毒素的极限,通过使用相当于1mg/mL MPO的恒定浓度的MPO、E101酶(MPO:GO)或E101完整的(MPO:GO:葡萄糖),测试高浓度的LPS和脂质A,并且通过 2^n 稀释将LPS和脂质A的浓度从10,000,000EU/mL(3.3mg/mL LPS和3.0mg/mL脂质A)变化至312,500EU/mL。结果显示在下表3和4中。

[0079] 表3

被抑制的脂多糖内毒素单位/mg MPO				
EU	测量的 EU 活性			
起始浓度	MPO	GO *	E101 (酶)	E101 (完整的)
10,000,000 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
5,000,000 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
2,500,000 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
1,250,000 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
625,000 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
312,500 EU	降低,但是太高 无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU

[0081] *1mg/ml 葡萄糖氧化酶

[0082] 表4

被抑制的脂质 A 内毒素单位/mg MPO				
EU	测量的 EU 活性			
起始浓度	MPO	GO *	E101 (酶)	E101 (完整的)
10,000,000 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
5,000,000 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
2,500,000 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
1,250,000 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
625,000 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU
312,500 EU	太高无法测量	太高无法测量	0 EU	0 EU

[0084] 表3和表4中的数据表明,在最高浓度(10,000,000EU/mL)下,LPS和脂质A被1mg/mL MPO与GO的组合完全抑制,即E101酶(MPO:GO)或E101完整的(MPO:GO:葡萄糖),单独的MPO显示出部分抑制(延迟的EU动力学),但无法被进一步量化。

[0085] 这些数据清楚地显示髓过氧化物酶和葡萄糖氧化酶协同作用以抑制革兰氏阴性细菌的脂多糖(内毒素)和脂质A。此外,由于MPO/GO的抑制作用与MPO/GO加葡萄糖的抑制作用大致相同,数据显示内毒素抑制作用不依赖于卤素过氧化物酶杀微生物的活性。

[0086] 虽然已经说明和描述了说明性的实施方案,应当理解的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在其中进行各种变化。