



(43) 申请公布日 2025.05.30

(72)发明人 迈克尔·布鲁斯·威金

Condition	OD 490
DI water	0.68
α-淀粉酶 +4% PVA +200 mM 海藻糖	0.08
α-淀粉酶 +4% PVA +200 mM 海藻糖	0.12
α-淀粉酶 +2% PVA +200 mM 海藻糖	0.08
α-淀粉酶 +2% PVA +200 mM 海藻糖	0.12
50 mM 柠檬酸盐 缓冲液 +2% PVA +200 mM 海藻糖	0.38
50 mM 柠檬酸盐 缓冲液 +2% PVA +200 mM 海藻糖	0.39
50 mM 柠檬酸盐 缓冲液 +200 mM 海藻糖	0.18
50 mM 柠檬酸盐 缓冲液 +200 mM 海藻糖	0.18
α-淀粉酶 +200 mM 海藻糖	0.25
α-淀粉酶 +200 mM 海藻糖	0.25
DI water	0.05

1. 一种用于治疗睑缘炎和干眼症中的一种或更多种的方法, 包括向受试者施用治疗有效量的组合物, 所述组合物包含用一定浓度的 CaCl_2 稳定化的活性 α -淀粉酶或其功能片段以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物在局部涂药器中。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述局部涂药器是擦拭物。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述擦拭物是预先润湿的。

5. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述擦拭物包含干成分。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物被配制为喷雾剂或液体。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物被施加至眼睑。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述施用促进所述受试者的眼睛中或所述受试者的眼睛周围的区域中的生物膜的去除。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述治疗有效量的所述组合物被每天施用持续至少10秒的时间段。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述治疗有效量的所述组合物被每天施用持续至少1周的时间段。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述 α -淀粉酶与来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 α -淀粉酶肽序列共享90%的序列同源性。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述 α -淀粉酶与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列共享95%的序列同源性。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物包含1mg/mL (w/v) 的所述活性 α -淀粉酶至20mg/mL (w/v) 的所述活性 α -淀粉酶。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述组合物包含1mg/mL (w/v) 的所述活性 α -淀粉酶至10mg/mL (w/v) 的所述活性 α -淀粉酶。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述治疗有效量包含一滴或更多滴具有在1I.U./mg至3000I.U./mg之间的所述活性 α -淀粉酶的制剂。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中 CaCl_2 的浓度在从0.2% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物还包含柠檬酸盐缓冲剂。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述施用是眼部施用。

19. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述施用是对外眼的局部施用。

20. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物还包含缓和剂。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述缓和剂是羧甲基纤维素钠 (CMC)。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述组合物包含从0.2%至2.5%的所述CMC。

23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述缓和剂是聚乙烯醇 (PVA)。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述组合物包含从0.1%至4%的所述PVA。

25. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述组合物是眼用组合物。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述组合物还包含眼用收敛剂、眼用缓和剂、眼用润肤剂、眼用高渗剂或眼用血管收缩剂中的一种或更多种。

27. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述组合物被配制为液体。

28. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述组合物被配制为凝胶。
29. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述受试者是人类。
30. 一种眼用组合物, 包含治疗有效量的用于治疗睑缘炎或干眼状况的功能活性 α -淀粉酶、用于使所述 α -淀粉酶稳定化的一定浓度的 CaCl_2 以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。
31. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中所述 α -淀粉酶与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列共享90%的序列同源性。
32. 根据权利要求31所述的眼用组合物, 其中所述 α -淀粉酶与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列共享95%的序列同源性。
33. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中所述组合物包含1mg/ml (w/v) 的所述功能活性 α -淀粉酶至20mg/ml (w/v) 的所述功能活性 α -淀粉酶。
34. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中 CaCl_2 的浓度在从0.2% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内。
35. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含眼用收敛剂、眼用缓和剂、眼用润肤剂、眼用高渗剂或眼用血管收缩剂中的一种或更多种。
36. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的羧甲基纤维素钠。
37. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的羟乙基纤维素。
38. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的羟丙甲纤维素。
39. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的甲基纤维素。
40. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.01% (v/v) 至1.0% (v/v) 之间的葡聚糖。
41. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.001% (v/v) 至0.1% (v/v) 之间的明胶。
42. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.01% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的甘油。
43. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.05% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的聚乙二醇300。
44. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.05% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的聚乙二醇400。
45. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至1.0% (v/v) 之间的聚山梨醇酯。
46. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至2.0% (v/v) 之间的丙二醇。
47. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.2% (v/v) 至6.0% (v/v) 之间的聚乙烯醇。

48. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.1% (v/v) 至4.0% (v/v) 之间的聚维酮。

49. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.001% (v/v) 至0.1% (v/v) 之间的苯扎氯铵 (BAK)。

50. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含在0.0001% (v/v) 至0.01% (v/v) 之间的polyquad (聚季铵盐-1)。

51. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含稳定化的氧氯复合物。

52. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含过硼酸钠。

53. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含依地酸二钠和山梨酸。

54. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含硼酸盐、山梨醇、丙二醇和锌离子缓冲剂。

55. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含柠檬酸盐缓冲剂。

56. 根据权利要求35所述的眼用组合物, 其中所述组合物还包含聚己缩胍 (聚六亚甲基双胍)。

57. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中所述组合物被配制为液体。

58. 根据权利要求30所述的眼用组合物, 其中所述组合物被配制为凝胶。

59. 一种组合物, 包含根据权利要求30-58中所述的组分的任何组合。

60. 一种组合物, 包含浓度在从1mg/mL至20mg/mL的范围内的功能活性 α -淀粉酶、用于使所述 α -淀粉酶稳定化的浓度在从0.4% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内的 CaCl_2 、浓度在从0.1%至5%的范围内的聚乙烯醇 (PVA) 以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

61. 根据权利要求60所述的组合物, 其中所述功能活性 α -淀粉酶的浓度为10mg/mL。

62. 根据权利要求60所述的组合物, 其中所述聚乙烯醇 (PVA) 的浓度为4%。

63. 根据权利要求60所述的组合物, 其中所述 CaCl_2 的浓度为0.4%。

64. 一种局部涂药器, 包含浓度在从1mg/mL至20mg/mL的范围内的功能活性 α -淀粉酶、用于使所述 α -淀粉酶稳定化的浓度在从0.2% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内的 CaCl_2 、浓度在从0.1%至5%的范围内的聚乙烯醇 (PVA) 以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

65. 根据权利要求64所述的局部涂药器, 包含10mg/mL的功能活性 α -淀粉酶、浓度为约0.4% (w/v) 的 CaCl_2 和浓度为4% (w/v) 的聚乙烯醇 (PVA)。

66. 根据权利要求64所述的局部涂药器, 其中所述局部涂药器是擦拭物。

67. 根据权利要求64所述的局部涂药器, 其中所述擦拭物被单独包裹。

干眼症治疗

[0001] 背景

[0002] 在下面的论述中,出于背景和介绍的目的,将描述某些文章和方法。本文所包含的任何内容都不应被解释为对现有技术的“承认”。申请人明确保留在适当情况下证明本文引用的文章和方法根据适用的法定条款不构成现有技术的权利。

[0003] 睑缘炎是眼睑及其周围区域的炎症。睑缘炎通常影响双眼,包括沿眼睑边缘的区域。当睫毛根部附近的微小油腺变得堵塞,引起刺激和发红时,睑缘炎被认为发生。若干种疾病和状况可能与睑缘炎相关。除了不舒服和难看之外,睑缘炎通常作为难以治疗的慢性状况发生,这主要是因为目前现有的治疗,包括人工泪液、免疫抑制药物(restasis)、短期使用抗生素、短期使用类固醇、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)拮抗剂(xiidra)、热敷、强脉冲光治疗或将睑脂(meibum)机械地压出睑板腺,没有解决疾病的根本原因。

[0004] 在用于治疗睑缘炎的治疗库(arsenal)中仍然存在显著的差距,这主要是由于现有治疗在解决潜在原因方面的局限性。本公开内容首先通过将眼睑上的生物膜形成鉴定为驱动睑缘炎预后的重要因素来解决该需求。第二,本公开内容提供了组合物和使用该组合物的方法,该方法提供了针对睑缘炎和干眼症的有效治疗性治疗。

[0005] 概述

[0006] 提供本概述以简化的形式介绍概念的选择,概念在下文的详细描述中进一步描述。本概述不意图确定所要求保护的主题的关键特征或必要特征,也不意图被用于限制所要求保护的主题的范围。根据包括在附图中图示出并在所附权利要求中限定的那些方面的以下书面详细描述,所要求保护的主题的其他特征、细节、效用和优点将是明显的。

[0007] 在一些方面中,本公开内容提供了一种用于治疗睑缘炎和干眼症中的一种或更多种的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,该组合物包含任选地用一定浓度的CaCl₂稳定化的活性 α -淀粉酶或其功能片段以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,施用促进受试者的眼睛中或受试者的眼睛周围的区域中生物膜的去除。在一些情况下,治疗有效量的组合物被每天施用持续至少1秒、至少5秒、至少1天、1周的时间段或持续至少1个月的时间段。

[0008] 在一些方面中,本公开内容提供了一种眼用组合物(ophthalmic composition),该眼用组合物包含治疗有效量的用于治疗睑缘炎或干眼状况的功能活性 α -淀粉酶、用于使 α -淀粉酶稳定化的一定浓度的CaCl₂以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。

[0009] 在一些方面中,本公开内容提供了组合物和方法,该组合物包含 α -淀粉酶。在一些方面中,本公开内容提供了一种用于治疗睑缘炎和干眼症中的一种或更多种的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,该组合物包含用一定浓度的CaCl₂稳定化的活性 α -淀粉酶或其功能片段以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。在一些制剂中,组合物在擦拭物(wipe),例如预先润湿的擦拭物或包含干成分的擦拭物中。在许多情况下,组合物被施加至眼睑或用作面部擦拭物。在一些情况下,施用促进受试者的眼睛中或受试者的眼睛周围的区域中生物膜的去除。组合物可以被每天施用,例如持续足够长以提供与生物膜的接触的时间段、至少1秒、至少5秒、至少10秒。组合物可以被每天施用持续至少1周的时

间段。在一些方面中， α -淀粉酶与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列共享至少90%的序列同源性、至少95%的序列同源性或至少99%的序列同源性。在一些方面中，组合物包含1mg/mL (w/v) 的活性 α -淀粉酶至20mg/mL (w/v) 的活性 α -淀粉酶、1mg/mL (w/v) 的活性 α -淀粉酶至10mg/mL (w/v) 的活性 α -淀粉酶或另一合适的量。在一些方面中，治疗有效量包含一滴或更多滴具有在1I.U./mg至3000I.U./mg之间的活性 α -淀粉酶的制剂。在一些方面中，CaCl₂的浓度在从0.2% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内。在一些方面中，组合物还包含柠檬酸盐缓冲剂。

[0010] 在一些方面中，本公开内容提供了一种眼用组合物，该眼用组合物包含治疗有效量的用于治疗睑缘炎或干眼状况的功能活性 α -淀粉酶、用于使 α -淀粉酶稳定化的一定浓度的CaCl₂以及一种或更多种药学上可接受的赋形剂。组合物中的 α -淀粉酶可以与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列共享至少90%、至少95%或至少99%的序列同源性。组合物可以包含1mg/ml (w/v) 的功能活性 α -淀粉酶至20mg/ml (w/v) 的功能活性 α -淀粉酶。组合物可以包含在1I.U./mg至3000I.U./mg之间的活性 α -淀粉酶。在一些方面中，CaCl₂的浓度在从0.2% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内。组合物还可以包含眼用收敛剂、眼用缓和剂 (ophthalmic demulcent)、眼用润肤剂、眼用高渗剂 (ophthalmic hypertonicity agent) 或眼用血管收缩剂中的一种或更多种。在一些制剂中，缓和剂可以是羧甲基纤维素钠 (CMC)，例如从0.2% 至3.5%的CMC。在一些制剂中，缓和剂可以是聚乙烯醇 (PVA)，例如0.1% 至5%的PVA。在一些方面中，组合物还包含柠檬酸盐缓冲剂。

[0011] 在一些制剂中，组合物还包含在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的羟乙基纤维素、在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的羟丙甲纤维素、在0.2% (v/v) 至3.5% (v/v) 之间的甲基纤维素、在0.01% (v/v) 至1.0% (v/v) 之间的葡聚糖、在0.001% (v/v) 至0.1% (v/v) 之间的明胶、在0.01% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的甘油、在0.05% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的聚乙二醇300、在0.05% (v/v) 至1.5% (v/v) 之间的聚乙二醇400、在0.2% (v/v) 至1.0% (v/v) 之间的聚山梨醇酯、在0.2% (v/v) 至2.0% (v/v) 之间的聚丙二醇、在0.2% (v/v) 至6.0% (v/v) 之间的聚乙烯醇、在0.1% (v/v) 至4.0% (v/v) 之间的聚维酮、在0.001% (v/v) 至0.1% (v/v) 之间的苯扎氯铵 (BAK) 和/或在0.0001% (v/v) 至0.01% (v/v) 之间的polyquad (聚季铵盐-1)。在一些制剂中，组合物还包含稳定化的氧氯复合物、过硼酸钠、依地酸二钠和山梨酸、硼酸盐、山梨醇、丙二醇和锌离子缓冲剂、聚己缩胍 (polyhexanide) (聚六亚甲基双胍)。在优选的情况下，组合物可以在柠檬酸盐缓冲剂中稳定化。

[0012] 组合物可以是眼用组合物，即其中施用是眼部施用 (ophthalmic administration) 的组合物。在一些方面中，施用是对外眼的局部施用。在一些方面中，组合物被配制为液体。在其他方面中，组合物被配制为凝胶。然而，在某些优选的情况下，组合物以干粉形式或以湿擦拭物配制在擦拭物中。

[0013] 在一些方面中，本公开内容提供了一种组合物，该组合物包含浓度在从1mg/mL至20mg/mL的范围内的功能活性 α -淀粉酶、用于使 α -淀粉酶稳定化的浓度在从0.4% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内的CaCl₂、浓度在从0.1% 至5%的范围内的聚乙烯醇 (PVA) 以及至少一种药学上可接受的赋形剂。在一些方面中，功能活性 α -淀粉酶的浓度为10mg/mL，和/或聚乙烯醇 (PVA) 的浓度为4%，和/或CaCl₂的浓度为0.4%。

[0014] 在一些方面中，本公开内容提供了一种局部涂药器，例如擦拭物，其包含浓度在从

1mg/mL至20mg/mL的范围内的功能活性 α -淀粉酶、用于使 α -淀粉酶稳定化的浓度在从0.4% (w/v)至0.8% (w/v)的范围内的CaCl₂、浓度在从0.1%至5%的范围内的聚乙烯醇(PVA)以及至少一种药学上可接受的赋形剂。在一些制剂中,局部涂药器例如擦拭物包含浓度为约10mg/mL的功能活性 α -淀粉酶、浓度为约0.4% (w/v)的CaCl₂和浓度为约4% (w/v)的聚乙烯醇(PVA)。在一些方面中,擦拭物被单独包裹。

[0015] 下文更详细地描述本发明的这些方面和其他特征和优点。

[0016] 附图简述

[0017] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色展示的附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本将在要求并支付必要费用后由主管局提供。

[0018] 根据下面结合附图进行的对说明性实施方案的详细描述,将更充分地理解本发明的前述和其他特征和优点,在附图中:

[0019] 图1A和图1B(图1A和图1B)是描绘罹患睑板腺阻塞、睫毛根部处有光泽的生物膜、睫毛上有光泽的生物膜以及睫毛生长方向错误的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者用Blephex和强脉冲光疗法进行治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。

[0020] 图2A和图2B(图2A和图2B)是描绘在拍摄图1A和图1B的照片之后大约6个月的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者被开处方每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。

[0021] 图3A和图3B(图3A和图3B)是描绘在拍摄图2A和图2B的照片之后大约6个月的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者被开处方每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。

[0022] 图4A和图4B(图4A和图4B)是描绘在拍摄图3A和图3B的照片之后大约4个月的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者继续每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))治疗。

[0023] 图5A和图5B(图5A和图5B)是描绘在拍摄图4A和图4B的照片之后大约1个月并且在受试者接受几次施加包含1mg/mL来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物之后受试者的眼睛的两个不同区域的照片。

[0024] 图6A和图6B(图6A和图6B)是描绘在拍摄图5A和图5B的照片之后大约6个月的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄图5A和图5B的照片之后,受试者接受包含1mg/mL来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物的常规每日使用。如图6A和图6B中示出的,生物膜被明显消除,睫毛没有所有生物膜,眼睑中的炎症和发红减少,患者报告干眼症状的重大改善。

[0025] 图7A和图7B(图7A和图7B)是描绘在拍摄图5A和图5B的照片之后大约6个月以及在大约6个月的时间进程内常规每日使用包含1mg/mL来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物之后受试者的眼睛的两个不同区域的照片。

[0026] 图8A和图8B(图8A和图8B)是描绘在拍摄图6A和图6B的照片之后大约4个月并且在常规每日使用包含1mg/mL来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物之后受试者的

眼睛的两个不同区域的照片。

[0027] 图9A和图9B(图9A和图9B)是描绘在接受处于0.01%次氯酸中的10mg/ml剂量的 α -淀粉酶之后受试者的眼睛的区域的照片。

[0028] 图10A和图10B(图10A和图10B)是描绘在用包含处于0.01%次氯酸中的10mg/ml的 α -淀粉酶和 Ca^{2+} 的组合物治疗之前和之后眼睛的区域的直接比较的照片。

[0029] 图11A(图11A)是图示出测试多种浓度的包含钙辅因子(CaCl_2)的多种 α -淀粉酶组合物的结果的图表。

[0030] 图11B(图11B)是定量通过包含一定范围的 CaCl_2 的多种组合物在10min内去除的生物膜百分比的图表。

[0031] 图12A(图12A)是定量多种防腐剂,即BAK(苯扎氯铵)、氧氯0.1%、polyquad(聚季铵盐-1)0.001%和漂白剂对照对酶稳定性的影响的分析结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0032] 图12B(图12B)是定量多种防腐剂,即BAK(苯扎氯铵)和GenAqua/Dequest(过硼酸钠)对酶稳定性的影响的分析结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0033] 图13(图13)是定量0.01%次氯酸防腐剂对酶活性的分析结果的图表。

[0034] 图14A(图14A)是图示出多种缓和剂的分析结果的图表,所述缓和剂包括聚乙二醇400(PEG 400)1%、羧甲基纤维素钠(CMC)2.5%、甘油1%、聚维酮(PVP)2%、丙二醇1%、聚乙烯醇(PVA)4%、葡聚糖70 0.1%+羟丙甲纤维素0.3%。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0035] 图14B(图14B)是图示出多种缓和剂的分析结果的图表,所述缓和剂包括聚乙烯醇(PVA)、PVA+ α -淀粉酶、羧甲基纤维素钠(CMC)以及羧甲基纤维素钠(CMC)+ α -淀粉酶。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0036] 图14C(图14C)是图示出在36天之后用在4% PVA中稳定化的 α -淀粉酶测试的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0037] 图15(图15)是图示出用于金黄色葡萄球菌(staph aureus)生物膜减少的眼用抗生素比较的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0038] 图16(图16)是图示出多种热稳定的糖和缓和剂(包括海藻糖和蔗糖与缓和剂的组合)对生物膜减少的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0039] 图17(图17)是图示出用多种浓度的海藻糖(包括3%、6.8%和8%)测试的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4% CaCl_2 和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30\text{U}/\text{mg}$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0040] 图18A(图18A)是图示出在具有糖稳定剂和缓和剂的情况下测试50mM柠檬酸盐缓

冲剂的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4%CaCl₂和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30U/mg$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0041] 图18B(图18B)是图示出在糖稳定剂和缓和剂的情况下测试100mM柠檬酸盐缓冲剂的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4%CaCl₂和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30U/mg$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0042] 图19(图19)是图示出测试透明质酸和茶树油对包含 α -淀粉酶的组合物的影响的结果的图表。 α -淀粉酶溶液是补充有0.4%CaCl₂和0.56% NaCl的10mg/mL的 $\sim 30U/mg$ 来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录号#10065)。

[0043] 应当理解,附图和图片不一定是按比例。

[0044] 通过引用并入

[0045] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地且单独地指示通过引用并入。

[0046] 定义

[0047] 在本文中可互换地使用的术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”包括任何长度的氨基酸的聚合形式,包括编码和非编码的氨基酸以及化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸。该术语还包括已经修饰的聚合物,诸如具有修饰的肽主链的多肽。术语“结构域”是指具有特定功能或结构的蛋白质或多肽的任何部分,例如 α -淀粉酶或溶菌酶催化结构域是指能够破坏肽键的结构域。

[0048] 蛋白质被称为具有“N-末端”和“C-末端”。术语“N-末端”涉及由具有游离胺基团($-NH_2$)的氨基酸终止的蛋白质或多肽的起始。术语“C-末端”涉及由游离羧基基团($-COOH$)终止的氨基酸链(蛋白质或多肽)的末端。

[0049] 如本文使用的,术语“生物膜”是指与眼睑的表面相关并包封在通常由多糖材料制成的基质中的微生物细胞的集合(assembly)。生物膜的下层包含在多糖基质中与其他有机组分诸如DNA、蛋白质和无机材料结合在一起的微生物。上层是延伸到周围介质中的较疏松的无定形层。与生物膜毗邻的流体层通常具有固定亚层和动态亚层。

[0050] 术语“保守氨基酸取代”是指用具有相似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代通常存在于序列中的氨基酸。保守取代的实例包括非极性(疏水性)残基诸如异亮氨酸、缬氨酸或亮氨酸对另一个非极性残基的取代。同样,保守取代的实例包括一个极性(亲水性)残基对另一个极性残基的取代,诸如在精氨酸和赖氨酸之间、在谷氨酰胺和天冬酰胺之间或在甘氨酸和丝氨酸之间。另外,碱性残基诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸对另一个碱性残基的取代,或者一个酸性残基诸如天冬氨酸或谷氨酸对另一个酸性残基的取代是保守取代的另外的实例。非保守取代的实例包括非极性(疏水性)氨基酸残基诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸或甲硫氨酸对极性(亲水性)残基诸如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸和/或极性残基对非极性残基的取代。在下文中总结了典型的氨基酸分类。

[0051]	丙氨酸	Ala	A	非极性	中性的	1.8
	精氨酸	Arg	R	极性	带正电荷的	-4.5
	天冬酰胺	Asn	N	极性	中性的	-3.5
	天冬氨酸	Asp	D	极性	带负电荷的	-3.5
	半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性的	2.5
	谷氨酸	Glu	E	极性	带负电荷的	-3.5
	谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性的	-3.5
	甘氨酸	Gly	G	非极性	中性的	-0.4
	组氨酸	His	H	极性	带正电荷的	-3.2
	异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性的	4.5
	亮氨酸	Leu	L	非极性	中性的	3.8
	赖氨酸	Lys	K	极性	带正电荷的	-3.9
	甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性的	1.9
	苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性的	2.8
	脯氨酸	Pro	P	非极性	中性的	-1.6
	丝氨酸	Ser	S	极性	中性的	-0.8
	苏氨酸	Thr	T	极性	中性的	-0.7
	色氨酸	Trp	W	非极性	中性的	-0.9
	酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性的	-1.3
	缬氨酸	Val	V	非极性	中性的	4.2

[0052] 在两个多核苷酸或多肽序列的上下文中,“序列同一性”或“同一性”指的是当在指定的比较窗口上比对最大对应时两个序列中相同的残基。当关于蛋白质使用序列同一性百分比时,不相同的残基位置通常因保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基被具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的其他氨基酸残基取代,并且因此不改变分子的功能性质。当序列在保守取代中不同时,可以向上调整序列同一性百分比以校正取代的保守性质。通过这样的保守取代而不同的序列被称为具有“序列相似性”或“相似性”。用于进行这种调整的手段是熟知的。通常,这涉及将保守取代评分为部分错配而不是完全错配,从而增加序列同一性百分比。因此,例如,在相同的氨基酸被给予1的分数并且非保守取代被给予0的分数的情况下,保守取代被给予在0和1之间的分数。计算保守取代的评分,例如,如在程序PC/GENE(Intelligenetics,Mountain View,California)中实施的。

[0053] “序列同一性百分比”包括通过比较窗口上比较两个最佳比对的序列(最大数量的完全匹配的残基)而确定的值,其中与用于两个序列的最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含添加或缺失(即,空位)。通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量以产生匹配位置的数量,将匹配位置的数量除以比较窗口中的位置的总数,并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比来计算百分比。除非另外说明(例如,较短序列包括连接的异源序列),否则比较窗口是被比较的两个序列中较短序列的全长。

[0054] 除非另外陈述,否则序列同一性/相似性值包括使用GAP Version 10使用以下参数获得的值:使用空位权重为50和长度权重为3以及nwsgapdna.cmp评分矩阵的核苷酸序列的%同一性和%相似性;使用空位权重为8和长度权重为2以及BLOSUM62评分矩阵的氨基酸序列的%同一性和%相似性;或其任何等效程序。“等效程序”包括任何序列比较程序,其对

于所讨论的任何两个序列,当与通过GAP Version 10生成的相应比对相比时,生成具有相同的核苷酸或氨基酸残基匹配以及相同的序列同一性百分比的比对。

[0055] 术语“体外(in vitro)”包括人工环境和在人工环境(例如,试管)内发生的过程或反应。术语“体内(in vivo)”包括自然环境(例如,细胞或生物体或身体)和在自然环境中发生的过程或反应。术语“离体(ex vivo)”包括已经从个体的身体中移除的细胞以及在这样的细胞内发生的过程或反应。

[0056] “包含(comprising)”或“包括(including)”一种或更多种所列举的要素的组合物或方法可以包括未具体列举的其他要素。例如,“包含(comprises)”或“包括(includes)”蛋白质的组合物可以包含单独或与其他成分组合的蛋白质。过渡短语“基本上由...组成”意指权利要求的范围应被解释为涵盖权利要求中列举的指定的要素以及不实质上影响所要求保护的发明的基本特性和新颖特性的那些要素。因此,当在本发明的权利要求中使用时,术语“基本上由...组成”不意图被解释为等效于“包含(comprising)”。

[0057] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形可以发生或不发生,并且意指该描述包括其中所述事件或情形发生的情况和其中所述事件或情形不发生的情况。

[0058] 值范围的指定包括在该范围内或定义该范围的所有整数,以及由该范围内的整数定义的所有子范围。

[0059] 除非从上下文中另外明显的,否则术语“约”涵盖所陈述的值的标准测量误差范围(例如,SEM)内的值。

[0060] 术语“和/或”是指并涵盖一个或更多个相关联的所列项目的任何和所有可能的组合,以及当在替代方案(“或”)中解释时缺乏组合。

[0061] 术语“或”是指特定列表中的任何一个成员,并且还包括该列表中成员的任何组合。

[0062] 除非上下文另外清楚地指出,否则冠词“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”的单数形式包括复数指示物。例如,术语“蛋白质”或“至少一种蛋白质”可以包括多于一种蛋白质,包括其混合物。

[0063] 统计学显著性意指 $p \leq 0.05$ 。

[0064] 详细描述

[0065] 综述

[0066] 结合本文描述的方法、组合物或制剂的一种实施方案描述的所有功能意图适用于本文描述的方法、组合物或制剂的另外的实施方案,除非在明确陈述的情况下或在特征或功能与另外的实施方案不相容的情况下。例如,在结合一种实施方案明确描述组分的给定特征或功能但未结合可选择的实施方案明确提及的情况下,应当理解,可以结合可选择的实施方案部署、利用或实现该特征或组分,除非该特征或组分与可选择的实施方案不相容。

[0067] 干眼病的主要原因中的一种被认为是发生在产生和支持泪液产生的组织中的炎症。睑缘炎描述了睑缘的炎症。这通常是干眼病的早期指征,并且通常在患有干眼病的人中观察到。当患者因睑缘炎寻求医疗护理时,通常是因为他们开始出现干眼病症状。目前对于干眼病的治疗包括人工泪液、免疫抑制药物(restasis)、暂时使用抗生素、暂时使用类固醇、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)拮抗剂(xiidra)、热敷、强脉冲光治疗或将睑脂机械地压出睑板腺。

[0068] 睑缘炎的重要驱动因素被认为是眼睑的睑板腺的细菌充血。患有干眼病的人具有增加的细菌水平并且特别是在眼睑、眼睛和周围组织上存在生物膜是常见的。睑缘对于生物膜形成是理想的,因为它为细菌的生存提供了水分、油和营养。对来自睑缘炎患者的眼睑的生物膜的分析指示,葡萄球菌属(*Staphylococcus* genus)是最普遍的细菌。进一步分析示出,46%至51%的患有葡萄球菌性睑缘炎的患者金黄色葡萄球菌检测呈阳性。金黄色葡萄球菌被认为是比眼睑上发现的其他葡萄球菌属细菌更具致病性的物种。当这些细菌在眼睑上生长和繁殖时,它们形成生物膜。

[0069] 细菌生物膜将细菌包封在多糖基质中,这可以使生物膜对抗生素和白细胞更具抗性。生物膜中的细菌还可以交换遗传信息,以更好地在其环境中生存。随着生物膜的进展,细菌开始释放毒素以分解眼睑组织以获取营养。这导致来自身体的炎性应答。由于细菌被包裹在生物膜中,因此身体的免疫应答几乎不能阻止细菌对眼睑组织的攻击。这导致干扰例如泪液组分的产生的发炎的组织。当来自生物膜的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌将脂肪酶释放到睑板腺中时,出现另外的并发症。这导致睑板腺的透明油变成浑浊的污泥状油,该浑浊的污泥状油堵塞睑板腺,导致睑板腺功能障碍(MGD)和品质差的泪液。目前对睑缘上的生物膜的治疗包括眼科医生用专门的工具和家用眼睑清洁剂和擦洗物(scrub)进行机械擦洗。用于从睑缘去除生物膜的唯一FDA批准的方法是使用Blephex,这是一种被设计为擦洗掉生物膜的机械装置,类似于在牙医处从牙齿去除菌斑。

[0070] 某些 α -淀粉酶菌株在抑制和减少金黄色葡萄球菌生物膜方面显示出一定的体外有效性,包括来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 目录#10065)、来自枯草芽孢杆菌的 α -淀粉酶(Sigma, 目录#10070)、来自人类唾液的 α -淀粉酶(Sigma, 目录#A1031)以及来自甘薯的 β -淀粉酶。值得注意的是,现有数据表明,大多数测试的人类 α -淀粉酶在防止生物膜生长方面有效,但在分解现有生物膜方面无效。

[0071] 本发明涉及一种组合物和用于使用该组合物通过使用酶淀粉酶或通过组合使用酶淀粉酶和溶菌酶来酶促分解眼睑中的生物膜的方法。酶淀粉酶的相关特性在上文描述,并且溶菌酶是天然抗生素。尽管淀粉酶和溶菌酶可以天然存在于健康人的泪液中,但本公开内容假设,患有干眼病的人产生不足量的这些酶以有效防止导致炎症循环的生物膜的形成。此外,本公开内容表明,在用于眼部施用的适当制剂中使用这些酶显著减少了眼睑上的生物膜形成和细菌积聚。

[0072] II. 包含酶的眼用制剂

[0073] 本公开内容预期了可以从受试者的眼睛中去除一层或更多层生物膜,从而治疗由生物膜的存在引起或加剧的状况的酶类别。在一些方面中,本公开内容预期了可以通过例如多糖的酶促降解导致生物膜的去除来去除生物膜的酶类别。在一些方面中,本公开内容预期了可以通过降解细胞膜组分并使其锚定到固体表面不稳定来裂解微生物细胞的酶类别。在优选的方面中,本公开内容所预期的酶是 α -淀粉酶和/或 α -淀粉酶和溶菌酶的组合。

[0074] 淀粉酶是一组重要的酶,其被分类为 α 亚型、 β 亚型、 γ 亚型、异淀粉酶、葡糖淀粉酶以及其他。淀粉酶可以在植物来源和微生物来源两者中找到。基于作用模式,淀粉酶可以被分类为外切淀粉酶和内切淀粉酶。外切淀粉酶从非还原端水解底物,产生较短的最终产物,而内切淀粉酶以随机方式作用于淀粉分子内的内部糖苷键,产生不同长度的寡糖。 α -淀粉酶和 β -淀粉酶具有催化壳聚糖水解并降低其分子量的潜力,这使得壳聚糖更可溶并适于配

制在液体眼用组合物中。存在于例如嗜肺军团菌 (*L.pneumophila*) 中的多种淀粉酶对于将多糖水解成葡萄糖和在帮助细胞内增殖方面是必需的。淀粉酶还有助于触发促炎应答,这进一步有助于防止细菌复制。

[0075] 主要作用于作为主要底物的淀粉(多糖)的 α -淀粉酶由两种葡萄糖聚合物-直链淀粉和支链淀粉组成。 α -淀粉酶有助于 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键的水解,这导致小葡萄糖(单糖)和麦芽糖(二糖)的形成。为了发挥作用, α -淀粉酶本质上是一种金属酶,其通常需要金属诸如 Ca^{2+} ,用于维持酶分子的稳定性。序列比对研究已经发现, α -淀粉酶具有四个也存在于 β 链内的保守区域。 α -淀粉酶可以广泛地存在于植物、微生物和高等动物内。通过 α -淀粉酶的酶促作用获得的代谢产物是多种长度的寡糖,包括具有6-8个具有-1,6键和-1,4键的葡萄糖单元的支链麦芽寡糖、麦芽糖和麦芽三糖。这些淀粉酶可以经由催化糖苷键断裂的催化基团与底物结合。

[0076] 本公开内容预期了包含与合适量的金属(优先地 Ca^{2+})复合的 α -淀粉酶的组合物,用于维持酶的稳定性。本公开内容的淀粉酶可以例如通过重组技术制备,并且其可以与来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列具有至少99%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%或至少30%的同源性。本公开内容的 α -淀粉酶可以通过表达来自重组生物体的适合的核酸分子来制备,该核酸分子可以与编码来自米曲霉的 α -淀粉酶肽序列的核酸序列具有至少99.99%、至少99.9%、至少99%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、至少50%、至少45%、至少40%、至少35%或至少30%的同源性。用于制备本发明的 α -淀粉酶的适合的核酸序列可以是简并序列。序列之间的同源性百分比可以使用多于一种算法,包括定义中描述的算法来计算。

[0077] 表1列出了本公开内容所预期的淀粉酶的非限制性实例及其对生物膜的活性的初步评估:

表 1			
研究级:	Sigma Aldrich	减少生物膜	阻止生物膜生长
α -淀粉酶	来自猪胰腺的 α -淀粉酶	未知的	未知的
	来自枯草芽孢杆菌的 α -淀粉酶	仅在 3 小时后	是
	来自米曲霉的 α -淀粉酶	是<10 min	是
	来自人类唾液的 α -淀粉酶	否	是
	来自解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶	未知的	未知的

[0079]

	来自地衣芽孢杆菌的 α -淀粉酶	未知的	未知的
	来自地衣芽孢杆菌的热稳定 α -淀粉酶	未知的	未知的
β -淀粉酶	来自大麦的 β -淀粉酶		
	来自甘薯的 β -淀粉酶	否	部分地
葡糖淀粉酶	来自根霉菌属的葡糖淀粉酶	未知的	未知的
	来自黑曲霉的淀粉葡糖苷酶	未知的	未知的
	来自根霉属的淀粉葡糖苷酶。	未知的	未知的
	来自芽孢杆菌属的麦芽糖淀粉酶	未知的	未知的
食品级：	诺维信(Novozymes)食品和饮料产品		
燕麦饮料	Fungamyl®是一种高品质的外切作用 α -淀粉酶和内切作用 α -淀粉酶的共混物	是	未知的
	BAN®是一种高品质的内切 α -淀粉酶	未知的	未知的
	Amylase® AG 是一种外切作用葡糖淀粉酶	未知的	未知的
	Maltogenase®是一种高品质的热稳定的外切作用麦芽糖淀粉酶	未知的	未知的
果汁	Amylase® AG 300 L 提供稳健的淀粉降解。	未知的	未知的
	Amylase® AG XXL 是一种用于淀粉降解的热稳定溶液，其在范围广泛的 pH 值内也是高度稳定的。	未知的	未知的
酿造	Termamyl® Classic，热稳定的淀粉酶	未知的	未知的

[0080] 本公开内容的酶(例如 α -淀粉酶)可以从商业来源购买并与其他组分组合以产生本文描述的眼用组合物。可选择地,本公开内容的酶可以例如通过肽合成或适合的核酸分子的表达来制备。肽测序方法的非限制性实例包括:a)液相肽合成;b)用聚苯乙烯树脂、聚酰胺树脂、PEG杂化聚苯乙烯树脂、PEG基础树脂和/或任何固相支持物的组合的固相肽合成;和c)合成生物学。用于表达适合的核酸分子的方法的非限制性实例包括分子克隆和重组DNA技术。

[0081] III.眼用组合物

[0082] 本公开内容的眼用组合物可以是本文描述的一种或更多种酶与其他化学组分的组合,所述其他化学组分诸如使酶稳定化并支持其活性的金属组分(例如 Ca^{2+} 和 α -淀粉酶)、载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂。眼用组合物有助于将呈功能性和活性形式的 α -淀粉酶施用于受试者的眼睛。眼用组合物可以以治疗有效量施用,例如作为经由光学途径或局部途径的滴眼液(例如,直接施加至眼睑的溶液、凝胶或乳膏),经由具有溶液、凝胶或乳膏的洗眼液,或经由包含一定剂量的酶的擦拭物(例如湿擦拭物)。

[0083] 活性化合物,包括例如 α -淀粉酶,可以被配制成多种液体和可局部施用的组合物,诸如溶液、悬浮液、洗剂、凝胶、糊剂、加药的棒(medicated stick)、香膏、乳膏和软膏。这样的药物组合物可以包含增溶剂、稳定剂、张度增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0084] 活性化合物,包括例如 α -淀粉酶,可以被配制成擦拭物,例如一次性使用、单独包裹的擦拭物或其中具有多于一个擦拭物的包装。

[0085] 在实践本文提供的治疗或使用的方法时,治疗有效量的本文描述的酶以眼用组合物被施用至患有待治疗的疾病或状况的受试者。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,诸如人类。治疗有效量可以取决于疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康、所使用的化合物的效能以及其他因素而广泛地变化。在优选的情况下,疾病或状况是睑缘炎、干眼症或另一种相关的炎性状况。

[0086] 本文描述的酶,例如 α -淀粉酶,可以以从约0.1mg/mL至约2000mg/mL;从约0.1mg/mL至约1000mg/mL;从约0.1mg/mL至约500mg/mL;从约0.1mg/mL至约100mg/mL;从约0.1mg/mL至约50mg/mL;从约0.1mg/mL至约25mg/mL;从约0.1mg/mL至约10mg/mL;从约1mg/mL至约2000mg/mL;从约1mg/mL至约1000mg/mL;从约1mg/mL至约500mg/mL;从约1mg/mL至约100mg/mL;从约1mg/mL至约50mg/mL;从约1mg/mL至约25mg/mL;从约1mg/mL至约10mg/mL的范围存在于液体组合物中。

[0087] 本文描述的酶可以以从约5mg/mL至约1000mg/mL、从约5mg/mL至约500mg/mL、从约5mg/mL至约100mg/mL、从约5mg/mL至约50mg/mL、从约5mg/mL至约25mg/mL或从约5mg/mL至约20mg/mL的范围存在于液体组合物,例如 α -淀粉酶中。前述范围仅是提示性的。剂量可以根据许多变量而改变,包括例如所使用的酶的活性、待治疗的疾病或状况、施用模式、个体受试者的需求、正在治疗的疾病或状况的严重程度以及从业者的判断。

[0088] 本文描述的每种酶,例如 α -淀粉酶,可以例如以粉末形式或以溶液形式以约0.1mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg的量存在于单瓶使用管或擦拭物中。

[0089] 本文描述的每种酶,例如 α -淀粉酶,可以例如以粉末形式或以溶液形式以提供以下的活性的量存在于单瓶使用管或擦拭物中:大于15.0U/mg、大于16.0U/mg、大于17U/mg、大于18U/mg、大于19U/mg、大于20U/mg、大于21U/mg、大于22U/mg、大于23U/mg、大于24U/mg、大于25U/mg、大于26U/mg、大于27U/mg、大于28U/mg、大于29U/mg、大于30U/mg、大于31U/mg、大于32U/mg、大于33U/mg、大于34U/mg、大于35U/mg、大于36U/mg、大于37U/mg、大于38U/mg、大于39U/mg、40U/mg、大于41U/mg、大于42U/mg、大于43U/mg、大于44U/mg、大于45U/mg、大于46U/mg、大于47U/mg、大于48U/mg、大于49U/mg、大于50U/mg、大于51U/mg、大于52U/mg、大于53U/mg、大于54U/mg、大于55U/mg、大于56U/mg、大于57U/mg、大于58U/mg、大于59U/mg、大于

60U/mg、大于61U/mg、大于62U/mg、大于63U/mg、大于64U/mg、大于65U/mg、大于66U/mg、大于67U/mg、大于68U/mg、大于69U/mg、大于70U/mg、大于71U/mg、大于72U/mg、大于73U/mg、大于74U/mg、大于75U/mg、大于76U/mg、大于77U/mg、大于78U/mg、大于79U/mg、大于80U/mg、大于81U/mg、大于82U/mg、大于83U/mg、大于84U/mg、大于85U/mg、大于86U/mg、大于87U/mg、大于88U/mg、大于89U/mg、大于90U/mg、大于91U/mg、大于92U/mg、大于93U/mg、大于94U/mg、大于95U/mg、大于96U/mg、大于97U/mg、大于98U/mg、大于99U/mg或大于100U/mg,所述活性定义为一个单位将在pH 6.9、20℃在3分钟内从淀粉中释放1mg的麦芽糖。

[0090] 本文描述的每种酶,例如 α -淀粉酶,可以例如以粉末形式或以溶液形式以提供以下的活性的量存在于单瓶使用管或一次性使用擦拭物中:介于15.0U/mg至40U/mg之间、介于15.0U/mg至50U/mg之间、介于15.0U/mg至60U/mg之间、介于15.0U/mg至70U/mg之间、介于15.0U/mg至80U/mg之间、介于15.0U/mg至90U/mg之间、介于15.0U/mg至100U/mg之间、介于15.0U/mg至110U/mg之间、介于15.0U/mg至120U/mg之间、介于15.0U/mg至130U/mg之间、介于15.0U/mg至140U/mg之间、介于15.0U/mg至150U/mg之间、介于15.0U/mg至160U/mg之间、介于15.0U/mg至170U/mg之间、介于15.0U/mg至180U/mg之间、介于15.0U/mg至190U/mg或介于15.0U/mg至200U/mg,所述活性定义为一个单位将在pH 6.9、20℃在3分钟内从淀粉中释放1mg的麦芽糖。

[0091] 本文描述的辅因子,例如 CaCl_2 ,可以以在从0.01% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.1% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.2% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.3% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.4% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.5% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.6% (w/v) 至1.5% (w/v)、0.01% (w/v) 至1.0% (w/v)、0.1% (w/v) 至1.0% (w/v)、0.2% (w/v) 至1.0% (w/v)、0.3% (w/v) 至1.0% (w/v)、0.4% (w/v) 至1.0% (w/v)、0.2% (w/v) 至0.8% (w/v)、0.3% (w/v) 至0.8% (w/v)、0.4% (w/v) 至0.8% (w/v) 的范围内或另一个合适的范围的浓度存在。

[0092] 眼用组合物,例如擦拭物、滴剂或另一种合适的组合物,可以使用包含赋形剂和助剂的一种或更多种生理学上可接受的载体来配制,所述生理学上可接受的载体有助于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制品。制剂可以取决于所选择的施用途径进行修改。包含本文描述的化合物的眼用组合物可以以常规方式制造,例如借助于常规混合、溶解、制粒或乳化。眼用组合物可以包括至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂以及本文描述的化合物或药学上可接受的盐形式。

[0093] 用于制备包含本文描述的化合物的组合物的方法可以包括将化合物(例如,合适浓度的 α -淀粉酶)与一种或更多种惰性、药学上可接受的赋形剂一起配制。液体组合物包括,例如,化合物溶解在其中的溶液,包含化合物的乳液,或包含含有如本文公开的化合物的脂质体、胶束或纳米颗粒的溶液。半固体组合物包括,例如,凝胶、悬浮液和乳膏。组合物可以呈液体溶液或悬浮液,适合于在使用之前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或作为乳液。组合物可以配制在擦拭物中。这些组合物还可以包含少量的无毒的辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂和其他药学上可接受的添加剂。适合用于本公开内容的剂型的非限制性实例包括液体、酞剂、纳米悬浮液、水性或油性悬浮液、滴剂、糖浆及其任何组合。

[0094] 适合用于本公开内容的药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包括收敛剂、缓和剂、润肤剂、制粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、甜味剂、助流剂、抗粘剂、抗静电剂、表面活性剂、抗氧化剂、树胶、包衣剂、着色剂、调味剂、增塑剂、防腐剂、糖、悬浮剂、乳化剂、植物纤维

素材料和成球剂(spheronization agent)及其任何组合。

[0095] 在一些情况下,本公开内容的包含 α -淀粉酶、溶菌酶和/或葡聚糖酶中的一种或更多种的眼用组合物包含收敛剂。合适的收敛剂是下文公开的大致浓度的硫酸锌:

[0096]	表2
	眼用收敛剂
	硫酸锌,0.25%

[0097] 眼用缓和剂

[0098] 本公开内容证明 α -淀粉酶在抑制和减少体内金黄色葡萄球菌生物膜方面是有效的(参见图6A-图9B)。眼睑上的金黄色葡萄球菌生物膜被认为是干眼病的主要原因, α -淀粉酶先前没有被用于从眼睑去除生物膜。本公开内容预期了具有某些眼用缓和剂的眼用制剂,用于从眼睛、眼睑和周围组织去除生物膜,从而治疗睑缘炎和干眼状况。

[0099] 眼用缓和剂可以用于滴眼液,以既增稠滴剂,润滑上皮,又缓解干燥和刺激。本公开内容的眼用组合物可以包含 α -淀粉酶以及表3的一种或更多种眼用缓和剂。

[0100]	表3
	眼用缓和剂
	0.2%至2.5%的羧甲基纤维素钠
	0.2%至2.5%的羟乙基纤维素
	0.2%至2.5%的羟丙甲纤维素
	0.2%至2.5%的甲基纤维素
	当与本节中的另一种聚合物缓和剂一起使用时的0.1%葡聚糖70
	0.01%的明胶
	0.2%至1%的甘油
	0.2%至1%的聚乙二醇300
	0.2%至1%的聚乙二醇400
	0.2%至1%的聚山梨醇酯80
	0.2%至1%的丙二醇
	0.1%至4%的聚乙烯醇
	0.1%至2%的聚维酮

[0101] 眼用润肤剂

[0102] 眼用润肤剂通常是指可以在眼睛上或皮肤中形成膜的组分。通常,眼用润肤剂可以缓解干燥、瘙痒和脱屑,并且潜在地帮助保持皮肤或眼睛表面上的 α -淀粉酶的湿润层。本公开内容的眼用组合物可以包含 α -淀粉酶以及表4的一种或更多种眼用润肤剂。

表 4	
[0103]	眼用润肤剂
	与专论中包括的一种或更多种油性润肤剂组合的 1%至 10%的无水羊毛脂
	与专论中包括的一种或更多种油性润肤剂组合的 1%至 10%的羊毛脂
	与专论中包括的一种或更多种其他润肤剂组合的多达 50%的轻质矿物油

[0104]

与专论中包括的一种或更多种其他润肤剂组合的多达 50%的矿物油
与专论中包括的一种或更多种其他润肤剂组合的多达 5%的石蜡
多达 100%的凡士林
多达 100%的白色软膏，
多达 100%的的白色凡士林
与专论中包括的一种或更多种其他润肤剂组合的多达 5%的白蜡
与专论中包括的一种或更多种其他润肤剂组合的多达 5%的黄蜡

[0105] 眼用高渗剂

[0106] 眼用高渗剂用于减少由手术、感染、创伤或其他眼部状况引起的角膜 (你的眼睛的前表面) 肿胀。本公开内容的眼用组合物可以包含α-淀粉酶以及表5的一种或更多种眼用高渗剂。

[0107]

表5
眼用高渗剂
2%至5%的氯化钠

[0108] 眼用血管收缩剂

[0109] 使用血管收缩剂可以有助于减少由生物膜引起的眼睑上的炎症。本公开内容的眼用组合物可以包含α-淀粉酶以及表6的一种或更多种眼用血管收缩剂,所述眼用血管收缩剂包括:盐酸麻黄碱、盐酸萘甲唑啉、盐酸去氧肾上腺素、盐酸四氢唑啉、苯扎氯铵、羟甲唑啉、酒石酸溴莫尼定。

[0110]

表6
眼用血管收缩剂
0.123%的盐酸麻黄碱
0.01%至0.03%的盐酸萘甲唑啉
0.08%至0.2%的盐酸去氧肾上腺素
0.01%至0.05%的盐酸四氢唑啉
0.025%的酒石酸溴莫尼定。

[0111] 本公开内容的眼用组合物可以包含α-淀粉酶以及表7的一种或更多种另外的组分:

[0112]

表 7	
成分	目的
硫化硒	用于治疗角化过度，从眼睑去除角蛋白可以有助于疏通睑板腺。该药物目前处于本申请的临床试验
全氟己基辛烷	减少泪膜不稳定性
0.01%-0.02%次氯酸	减少细菌
茶树油	抗微生物剂

[0113]

蔗糖	用于淀粉酶的糖稳定剂
海藻糖	用于淀粉酶的糖稳定剂
硼酸	缓解眼睛刺激
硼酸钠	温和抗生素/缓冲剂
氯化钙	用于 α -淀粉酶的 Ca^{2+} 必需辅因子
卵磷脂	增加脂质浓度

[0114] 本公开内容的眼用组合物可以包含 α -淀粉酶以及表8的一种或更多种另外的组分：

[0115]

表 8	
成分	目的
山梨醇	降低胶凝剂诸如 HP 瓜尔胶的粘度
透明质酸	在水中结合数倍于其重量以降低泪液渗透压的保湿剂。它还附着到眼表面以使泪膜的厚度稳定化
透明质酸钠	透明质酸的衍生物并且共享许多其有益性质。透明质酸钠是一种保湿剂、润滑剂和低渗剂(hypo-osmotic)。它天然存在于眼睛中，在眼睛中它作为对眼表损伤的应答产生。
L-肉碱和赤藓糖醇	组合地总是被视为渗透保护剂。被脱水细胞吸收，其中它们促进水合作用并防止细胞收缩和炎症。
羟丙基瓜尔胶 (HP 瓜尔胶)	用作增稠剂的豆类蛋白质
聚丙烯酸	它增加了人工泪液的粘度和滞留时间
泰洛沙泊 (tyloxapol)	有助于去除来自隐形眼镜表面的脂质和粘液
氨丁三醇	有机胺质子受体。乳化剂(稀蜡剂(thins waxy agent))

[0116] 缓冲系统

[0117] 缓冲系统用于获得对眼睛健康和舒适的人工泪液的pH。pH ~ 7对干眼症患者来说是最舒适的(正常泪液pH为约6.5-7.6)。尽管发现纯化的人类胰腺 α -淀粉酶(α -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖-水解酶, EC 3.2.1.1)在宽范围的pH值(5.0至10.5)内是稳定的,但缓冲系统也可以有助于维持本公开内容的眼用组合物中 α 淀粉酶的最佳活性。本公开内容预期, α -淀粉酶的酶促活性的最佳pH为5.5,并且其预期使用下文组分中的一种或更多种以达到在5-7.5之间的pH的某些组合物。

[0118]

表 9	
成分	
硼酸	
硼酸盐缓冲剂	
柠檬酸钠	
柠檬酸	

[0119]

磷酸盐	
磷酸盐-乙酸盐	
磷酸盐-柠檬酸盐	
磷酸盐-柠檬酸盐-碳酸氢盐	
氢氧化钠	

[0120] 电解质(例如,金属)

[0121] 电解质可以被添加到眼用组合物中以维持或降低泪液渗透压,因为高渗透压产物从上皮细胞吸水,干扰代谢。一些添加的电解质对于角膜上皮代谢也是重要的。一些电解质是上文描述的缓冲系统的一部分。在本公开内容的眼用组合物中,可能需要一些电解质作为一种或更多种酶的金属稳定剂。

表 10	
成分	
氯化钙	对于 α -淀粉酶的活化可能需要 Ca
氯化镁	
氯化钾	
氯化锌	
氯化钠	
柠檬酸钠	
乳酸钠	
碳酸氢钠	
碳酸氢钙	*不在任何当前滴眼液中

[0123] 本公开内容的眼用组合物可以包含 α -淀粉酶、溶菌酶和/或葡聚糖酶中的一种或更多种以及表11的一种或更多种另外的防腐剂:

表 11	
防腐剂	
苯扎氯铵 0.01%	
Polyquad 0.001%	
GenAqua (过硼酸钠)	
Purite (稳定化的氧氯复合物)	
依地酸二钠 0.1%和山梨酸 0.1%	
Polixetonium (聚季铵盐-42)	
OcuPure (稳定化的氧氯复合物)	
Dequest (过硼酸钠)	
SofZia	
聚六亚甲基双胍	

乙二胺四乙酸(EDTA)	
过硼酸钠	

[0126] IV. 眼用制剂

[0127] 本文描述的眼用组合物可以被配制为滴眼液容器(5mL、10mL、15mL、20mL或另一合适的体积)或配制成适合于单次施用精确剂量的单位剂型。当配制为滴眼液时,制剂可以是这样的,即每个“滴剂”包含合适量的具有一定活性范围的酶。本文描述的眼用组合物可以被“嵌入”局部涂药器诸如布或擦拭物中,其可以具有包含制剂的干粉或者其可以是湿的。

[0128] 在单位剂型中,将制剂分成包含适当量的一种或更多种酶(例如 α -淀粉酶或者 α -淀粉酶和溶菌酶)的单位剂量。单位剂量可以呈包含离散量的制剂的包装的形式。非限制性实例是小瓶或安瓿中的液体。水性悬浮液组合物可以被包装在单剂量的不可重新封闭的容器(single-dose non-reclosable container)中。多剂量的可重新封闭的容器可以例如与防腐剂组合使用。多种防腐剂和缓和剂可以被添加到组合物中(上文进一步描述的)。例如,容器可以具有多个干或湿的具有本公开内容的制剂的擦拭物。

[0129] 可以用本公开内容的 α -淀粉酶、溶菌酶或葡聚糖酶配制的眼用滴眼液的非限制性实例包括:

[0130]

表 12			
产品	包装	活性成分	非活性成分
高级眼部舒缓干眼症 恢复滴眼液(Advanced eye relief dry eye rejuvenation) (Bausch & Lomb)	15 mL 瓶	甘油(0.3%) 丙二醇 (1.0%)	苯扎氯铵(0.01%)、硼酸、依地酸二钠、 氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠。盐 酸和/或氢氧化钠可以用于调节 pH
<u>Bion Tears</u> (Alcon)	28 PF 小瓶 (0.4 mL)	葡聚糖 70 0.1%, 羟丙甲 纤维素 2910 0.3% 注意: 你在找 Tears Naturale 吗(已停产)? Bion Tears 具有相同的 活性成分, 但非活性成 分略有不同。	氯化钙、氯化镁、氯化钾、纯化水、碳 酸氢钠、氯化钠、氯化锌、盐酸和/或氢 氧化钠和/或二氧化碳用于调节 pH。
BioTrue 润滑滴眼液 (Bausch & Lomb)	10 mL PF 瓶	甘油 0.5%	硼酸、赤藓糖醇、氯化钾、纯化水、硼 酸钠、透明质酸钠
Blink Contacts 润滑滴 眼液	(10 mL)瓶	(镜片润湿滴剂的成分没 有按活性相对于非活性 进行分解)	硼酸; 氯化钙; 氯化镁; 氯化钾; 纯化 水; 硼酸钠; 氯化钠; 作为防腐剂的亚 氯酸钠(OcuPure 品牌); 透明质酸钠。

[0131]

<i>Blink GelTears 润滑滴眼液</i>	10 mL 瓶	聚乙二醇 400 0.25%	硼酸；氯化钙；氯化镁；氯化钾；纯化水；硼酸钠；氯化钠；作为防腐剂的亚氯酸钠(OcuPure 品牌)；透明质酸钠。
<i>Blink Tears 润滑滴眼液</i>	15 mL 瓶	聚乙二醇 400 0.25%	硼酸；氯化钙；氯化镁；氯化钾；纯化水；硼酸钠；氯化钠；作为防腐剂的亚氯酸钠(OcuPure 品牌)；透明质酸钠。
<i>Blink Tears 无防腐剂润滑滴眼液</i>	25 0.4 mL PF 小瓶	聚乙二醇 400 0.25%	硼酸；氯化钙；氯化镁；氯化钾；纯化水；硼酸钠；氯化钠；透明质酸钠。
<i>Blink-N-Clean 隐形眼镜滴剂</i>	15 mL 瓶	聚六亚甲基双胍 0.0001%、氨丁三醇(缓冲剂)、羟丙基甲基纤维素(润滑剂)、泰洛沙泊(表面活性剂)、依地酸二钠(螯合剂)	纯化水、氯化钠
Clear Eyes 天然泪液润滑滴眼液(Clear Eyes Natural Tears Lubricant)	瓶	聚乙烯醇 0.5% 聚维酮 0.6%	苯扎氯铵、右旋糖、依地酸二钠、氯化钾、纯化水、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、磷酸钠(磷酸二氢钠和磷酸氢二钠)
Clear Eyes 户外干眼症防护滴眼液(Clear Eyes Outdoor Dry Eye Protection)	瓶	聚乙烯醇 0.5% 聚维酮 0.6%	苯扎氯铵、右旋糖、依地酸二钠、氯化钾、纯化水、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、磷酸钠(磷酸二氢钠和磷酸氢二钠)
Clear Eyes 纯净舒缓干眼症滴眼液(Clear Eyes Pure Relief for Dry Eyes) *已停产*	“240 滴”PF 多剂量瓶	甘油 0.25%	硼酸、纯化水、硼酸钠、氯化钠、透明质酸钠
隐形眼镜舒适滴剂(Contact lens comfort drops)(Akorn)	15 mL 瓶	羧甲基纤维素钠	硼酸盐缓冲剂、氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠(小苏打)、氯化钙、氯化镁、磷酸钠、用膦酸稳定化的过硼酸钠
<u>Freshkote 无防腐剂多剂量滴眼液(Freshkote Preservative Free Multi-dose) (Focus)</u>	10 mL PF 瓶	聚乙烯吡咯烷酮 2.0%， 聚乙烯醇 2.7%	硼酸、依地酸二钠、乙醇、甘油、卵磷脂、磷脂、聚山梨醇酯-80、氯化钾、纯化水、氯化钠。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
<u>Freshkote 无防腐剂一次性使用小瓶(Freshkote Preservative Free Single Use Vials) (Focus)</u>	30 0.3 mL 一次性使用小瓶	聚乙烯吡咯烷酮 2.0%， 聚乙烯醇 2.7%	硼酸、依地酸二钠、乙醇、甘油、卵磷脂、磷脂、聚山梨醇酯-80、氯化钾、纯化水、氯化钠。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
<u>Gentcal 凝胶(严重)</u>	10 g 管	羟丙基纤维素 0.3%。	卡波普 980、磷酸、纯化水、氢氧化钠、

[0132]

(Alcon)			过硼酸钠和山梨醇
Genteal Mild (Alcon) *已停产*	15 mL/25 mL 瓶	羟丙甲纤维素 0.2%	硼酸、氯化钙二水合物、GenAqua (过硼酸钠)、磷酸、氯化钾、纯化水和氯化钠
Genteal Moderate (Alcon)	15 mL 瓶	葡聚糖 70 0.1%，甘油 0.2%，羟丙甲纤维素 0.3%	硼酸、氯化钙、甘氨酸、盐酸和/或氢氧化钠(用于调节 pH)、氯化镁、POLYQUAD® (聚季铵盐-1) 0.001%、防腐剂、聚山梨醇酯 80、氯化钾、纯化水、氯化钠、氯化锌。
Genteal 软膏 (Alcon)	3.5 g	白凡士林 93% 矿物油 4%	无水液体羊毛脂
Genteal Tears (Alcon) 先前是 Tears Naturale Free	36 PF 小瓶 (0.9 mL)	葡聚糖 70 0.1%，羟丙甲纤维素 2910 0.3%	氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠，可以含有：盐酸、氢氧化钠
Lubrifresh PM	3.5 g 管	83%凡士林 15%矿物油	羊毛脂醇
Oasis Tears (Oasis Medical)	10 mL 瓶	甘油(0.22%)	EDTA、山梨酸钾、氯化钠、透明质酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水
Oasis Tears (Oasis Medical)	30 PF 小瓶 (0.3 mL)	甘油(0.2%)	透明质酸、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水。
Oasis Tears PF (Oasis Medical)	10 mL PF 瓶	甘油(0.25%)	氯化钠、透明质酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水
Oasis Tears Plus (Oasis Medical)	30 PF 小瓶 (0.3 mL)	甘油(0.2%)	透明质酸、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水。
Oasis Tears Plus PF (Oasis Medical)	10 mL PF 瓶	甘油(0.2%)	氯化钠、透明质酸钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水。
Optase 干眼症强效滴剂 (Optase Dry Eye Intense Drops)	10 mL (0.33 盎司)瓶	甘油(0.2%)	盐酸、透明质酸钠、山梨醇、氨丁三醇、水
Optase 干眼症喷雾剂 (Optase Dry Eye Spray)	17 mL (0.58 盎司)瓶	甘油 1%	沙棘籽油、透明质酸钠、柠檬酸氨丁三醇
Optase Hylo Night	5 g 管	白凡士林(90%)、羊毛脂 (6.9%)	棕榈酸视黄醇(维生素 A)，轻质液体石蜡可以含有花生油
Optase MGD Advanced	10 mL (0.33 盎司)瓶	甘油 0.9%	柠檬酸一水合物、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯、氯化钾、纯化水、沙茶籽油、透明质酸钠、单油酸钠、海藻糖、氨丁三醇

[0133]

<u>Refresh Celluvisc</u> (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	羧甲基纤维素钠 1%	氯化钙、氯化钾、纯化水、氯化钠和乳酸钠。
Refresh Classic (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	聚乙烯醇 1.4% 聚维酮 0.6%	纯化水、氯化钠。还可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Refresh Contacts (Allergan)	12 mL 瓶	羧甲基纤维素钠	氯化钠、硼酸、硼酸钠十水合物、氯化钾、氯化钙、氯化镁、纯化水，并用 PURITE® (稳定化的氧氯复合物)保存。该配方还可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Refresh Digital	10 mL 瓶	羧甲基纤维素钠 0.5% 甘油 1% 聚山梨醇酯 80 0.5%	硼酸；A 型卡波姆共聚物；蓖麻油；赤藓糖醇；左卡尼汀；纯化水；PURITE® (稳定化的氧氯复合物)；和氢氧化钠。
<u>Refresh Digital PF</u>	30 个 0.4 mL PF 小瓶	羧甲基纤维素钠 0.5% 甘油 1% 聚山梨醇酯 80 0.5%	硼酸；A 型卡波姆共聚物；蓖麻油；赤藓糖醇；左卡尼汀；纯化水；和氢氧化钠。
<u>Refresh LacriLube</u> (Allergan) 已停产	3.5 g 管	矿物油 42.5% 白凡士林 56.8%	氯丁醇和羊毛脂醇。
Refresh Liquigel (Allergan)	15 mL 瓶	羧甲基纤维素钠 1%	硼酸、氯化钙、氯化镁、氯化钾、纯化水、PURITE® (稳定化的氧氯复合物)、硼酸钠和氯化钠。
<u>Refresh Optive</u> (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	羧甲基纤维素钠 0.5%、 甘油 0.9%	硼酸；氯化钙二水合物；赤藓糖醇；左卡尼汀；氯化镁六水合物；氯化钾；纯化水；硼酸钠十水合物；和柠檬酸钠二水合物。
	15 mL 瓶		硼酸；氯化钙二水合物；赤藓糖醇；左卡尼汀；氯化镁六水合物；氯化钾；纯化水；PURITE® (稳定化的氧氯复合物)；硼酸钠十水合物；和柠檬酸钠二水合物。
<u>Refresh Optive Advanced</u> (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	羧甲基纤维素钠 0.5% 甘油 1% 聚山梨醇酯 80 0.5%	硼酸；A 型卡波姆共聚物；蓖麻油；赤藓糖醇；左卡尼汀；纯化水；和氢氧化钠。

[0134]

	10 mL 瓶		硼酸；蓖麻油；赤藓糖醇；左卡尼汀；A 型卡波姆共聚物；纯化水；和 PURITE® (稳定化的氧氯复合物)。还可以含有氢氧化钠来调节 pH。
Refresh Optive 凝胶滴剂 (Allergan)	10 mL 瓶	羧甲基纤维素钠 1%、甘油 0.9%	硼酸；氯化钙二水合物；赤藓糖醇；左卡尼汀；氯化镁六水合物；氯化钾；PURITE® (稳定化的氧氯复合物)；硼酸钠十水合物；柠檬酸钠二水合物；纯化水。
Refresh Optive MEGA-3 (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	羧甲基纤维素钠 0.5% 甘油 1% 聚山梨醇酯 80 0.5%	硼酸；丁基化羟基甲苯；蓖麻油；赤藓糖醇；亚麻籽油；左卡尼汀；pemulen TR-2；聚氧乙烯 40 硬脂酸酯；纯化水；氢氧化钠；海藻糖。
Refresh Plus (Allergan)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	羧甲基纤维素钠 0.5%	氯化钙；氯化镁；氯化钾；纯化水；氯化钠；和乳酸钠。还可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Refresh PM 软膏 (Allergan)	3.5 g 管	矿物油 42.5% 白凡士林 57.3%	羊毛脂醇
Refresh Relieva	10 mL (0.33 液体盎司)多剂量瓶 也以 30 PF 小瓶盒销售	羧甲基纤维素钠 0.5%和甘油 0.9%	硼酸；氯化钙二水合物；赤藓糖醇；左卡尼汀；氯化镁六水合物；氯化钾；纯化水；硼酸钠十水合物；柠檬酸钠二水合物；和透明质酸钠。还可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Refresh Tears (Allergan)	15 mL 瓶	羧甲基纤维素钠	氧氯复合物、硼酸钠十水合物、氯化钠、氯化钾、氯化钙二水合物、氯化镁六水合物、硼酸、调节 pH 的氢氧化钠和纯化水。
Retaine CMC (Ocusoft)	30 PF 小瓶 (0.6 mL)	羧甲基纤维素钠 0.5%	氯化钙、氯化镁、氯化钾、纯化水、氯化钠、乳酸钠。还可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Retaine HPMC (Ocusoft)	10 mL 瓶 (不含防腐剂)	羟丙甲纤维素 0.3%	柠檬酸、柠檬酸钠、山梨醇、注射用水。

[0135]

<u>Retaine MGD</u> (Ocusoft) (相当于在欧洲销售的 Cationorm)	30 PF 小瓶 (0.4 mL)	轻质矿物油(0.5%) 矿物 油(0.5%)	西他氯铵(cetalkonium chloride)、甘油、 泊洛沙姆 188、tris 盐酸盐、氮丁三醇、 泰洛沙泊、注射用水。
<u>Retaine PM 软膏</u> (Ocusoft)	5 g 管	矿物油(20%) 白凡士林 (80%)	无(少数不含羊毛脂醇的软膏中的一种)
Soothe 长效水合滴眼 液 (Soothe Long Lasting Hydration) (Bausch & Lomb)	15 mL 瓶	聚维酮(2.0%)	苯扎氯铵(0.005%)、硼酸、依地酸二钠二 水合物、纯化水、硼酸钠、氯化钠、泰 洛沙泊。盐酸和/或氢氧化钠可以用于调 节 pH。
Soothe 水合润滑滴眼 液(Soothe Lubricant Eye Drops Hydration) (Bausch & Lomb)	15 mL 瓶	聚维酮(1.25%)	硼酸、氯化钾、硼酸钠和氯化钠; 用依 地酸二钠 0.1%和山梨酸 0.1%保存
Soothe 无防腐剂润滑 滴眼液 (Bausch & Lomb)	28 PF 小瓶 (0.6 mL)	甘油(0.6%) 丙二醇 (0.6%)	硼酸、羟烷基膦酸盐、纯化水、海藻酸 钠、硼酸钠
Soothe 最大水合滴眼 液(Soothe Maximum Hydration) (Bausch & Lomb)	15 mL 瓶	聚维酮(2.0%)	苯扎氯铵(0.005%)、硼酸、依地酸二钠二 水合物、纯化水、硼酸钠、氯化钠、泰 洛沙泊。盐酸和/或氢氧化钠可以用于调 节 pH。
Soothe 夜间软膏 (Bausch & Lomb)	3.5 g 管	矿物油(20%)、白凡士林 (80%)	无。 注意-这是列表上唯一不含羊毛脂醇的 润滑软膏中的一种 (6/14/18)
Soothe XP 润滑滴眼液 (Soothe XP Emollient) (Bausch & Lomb)	15 mL 瓶	轻质矿物油(1.0%)、矿物 油(4.5%)	硼酸、依地酸二钠、辛苯苧醇-40、聚季 铵盐-1(防腐剂)、聚山梨醇酯 80、纯化水、 硼酸钠十水合物。可以含有盐酸和/或氢 氧化钠(来调节 pH)。
Soothe XP 润滑 PF 滴 眼液(Soothe XP Emollient PF) (Bausch & Lomb)	30 0.3 mL 不 含防腐剂的 小瓶	轻质矿物油(1.0%)、矿物 油(4.5%)	硼酸、依地酸二钠、辛苯苧醇-40、聚山 梨醇酯 80、纯化水、硼酸钠十水合物。 可以含有盐酸和/或氢氧化钠(来调节 pH)。

[0136]

Systane (Alcon)	28 PF 小瓶 (0.4 mL)	聚乙二醇 400 0.4%，丙 二醇 0.3%	硼酸、氯化钙、羟丙基瓜尔胶、氯化镁、 氯化钾、纯化水、氯化钠、氯化锌。可 以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
	15 mL 瓶		硼酸、氯化钙、羟丙基瓜尔胶、氯化镁、 作为防腐剂的聚季铵盐-1、氯化钾、纯 化水、氯化钠、氯化锌。可以含有盐酸 和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Balance (Alcon)	10 mL 瓶	丙二醇 0.6%	硼酸、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、依地酸 二钠、羟丙基瓜尔胶、矿物油、聚氧乙 烯 40 硬脂酸酯、POLYQUAD® (聚季铵 盐-1) 0.001%防腐剂、脱水山梨糖醇三硬 脂酸酯、山梨醇和纯化水。可以含有盐 酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Complete (Alcon)	10 mL 瓶(1/3 液体盎司)	丙二醇 0.6%	硼酸、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、依地酸 二钠、羟丙基瓜尔胶、矿物油、聚氧乙 烯 40 硬脂酸酯、POLYQUAD (聚季铵盐 -1) 0.001%防腐剂、脱水山梨糖醇三硬脂 酸酯、山梨醇和纯化水。可以含有盐酸 和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Complete 无防 腐剂多剂量(Alcon)	10 mL PF 瓶 (1/3 液体盎 司)	丙二醇 0.6%	硼酸、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、羟丙基 瓜尔胶、矿物油、聚氧乙烯 40 硬脂酸酯、 脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、山梨醇和纯 化水。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调 节 pH。
Systane Contacts (Alcon)	12 mL 瓶	葡聚糖、羟丙基甲基纤 维素	氯化钠、氯化钾、0.1%依地酸二钠和 POLYQUAD® (聚季铵盐-1)
Systane Day & Night (Alcon)	两个 10 mL 瓶(Systane 凝胶滴剂和 Systane Ultra)	参见 Systane 凝胶滴剂和 Systane Ultra	参见 Systane 凝胶滴剂和 Systane Ultra

[0137]

Systane 凝胶滴剂 (Alcon)	10 mL 瓶	聚乙二醇 400 0.4%、丙二醇 0.3%	氨甲基丙醇、硼酸、依地酸二钠、羟丙基瓜尔胶、POLYQUAD® (聚季铵盐-1) 0.001%防腐剂和氯化钾、氯化钠、山梨醇和纯化水。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Hydration PF	一盒 30 个 10 mL 小瓶	聚乙二醇 400 0.4%、丙二醇 0.3%	氨甲基丙醇、硼酸、羟丙基瓜尔胶、氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠、透明质酸钠、山梨醇。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Hydration 多剂量无防腐剂	10 mL 瓶	聚乙二醇 400 0.4%、丙二醇 0.3%	氨甲基丙醇、硼酸、羟丙基瓜尔胶、氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠、透明质酸钠、山梨醇。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane 润滑眼部凝胶 (Alcon)	10 g	羟丙甲纤维素(0.3%)	卡波普 980、磷酸、纯化水、过硼酸钠和山梨醇。可以含有氢氧化钠来调节 pH。
Systane 夜间软膏 (Alcon)	3.5 g 管	白凡士林 94% 矿物油 3%	无水液体羊毛脂 3%。
Systane Sport (Alcon)	两个 10 mL 瓶	聚乙二醇 400 0.4%润滑剂丙二醇 0.3%	氨甲基丙醇、硼酸、羟丙基瓜尔胶、POLYQUAD® (聚季铵盐-1) 0.001%防腐剂和氯化钾、纯化水、氯化钠、山梨醇。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
Systane Ultra (Alcon)	25 PF 小瓶 (0.7 mL) 60 PF 小瓶 (0.7 mL)	聚乙二醇 400 0.4%、丙二醇 0.3%	氨甲基丙醇、硼酸、羟丙基瓜尔胶、氯化钾、纯化水、氯化钠、山梨醇。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。
	10 mL 瓶		氨甲基丙醇、硼酸、羟丙基瓜尔胶、POLYQUAD* (聚季铵盐-1) 0.001%防腐剂和氯化钾、纯化水、氯化钠、山梨醇。可以含有盐酸和/或氢氧化钠来调节 pH。

[0138]

TheraTears 干眼症治疗滴眼液(TheraTears dry eye therapy) (Akorn)	30 mL 瓶	羧甲基纤维素钠(0.25%)	硼酸盐缓冲剂、氯化钙、Dequest、氯化镁、氯化钾、纯化水、碳酸氢钠、氯化钠、过硼酸钠、磷酸钠
	32 PF 小瓶 (0.6 mL)		硼酸盐缓冲剂、氯化钙、氯化镁、氯化钾、纯化水、碳酸氢钠、氯化钠和磷酸钠。
TheraTears EXTRA 干眼症治疗滴眼液 (TheraTears EXTRA Dry Eye Therapy)	15 mL 瓶	羧甲基纤维素钠(0.25%)	硼酸、氯化钙、Dequest、氯化钾、碳酸氢钠、硼酸钠、氯化钠、氯化镁、过硼酸钠、磷酸钠、海藻糖、注射用水
TheraTears 夜间干眼症治疗滴眼液 (TheraTears nighttime dry eye therapy) (凝胶) (Akorn)	28 PF 小瓶 (0.6 mL)	羧甲基纤维素钠(1%)	硼酸盐缓冲剂、氯化钙、氯化镁、氯化钾、水(纯化的)、碳酸氢钠(小苏打)、氯化钠、磷酸钠
Visine 干眼症舒缓滴眼液(Visine Dry Eye Relief)	15 mL 瓶	甘油 0.2% 羟丙甲纤维素 0.2% 聚乙二醇 400 1%	抗坏血酸、苯扎氯铵、硼酸、右旋糖、磷酸二钠、甘氨酸、氯化镁、氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠
Visine 疲劳眼干眼症舒缓滴眼液(Visine Tired Eye Dry Eye Relief)	15 mL 瓶	甘油 0.2% 羟丙甲纤维素 0.36% 聚乙二醇 400 1%	抗坏血酸、硼酸、右旋糖、甘氨酸、氯化镁、聚季铵盐-42、氯化钾、纯化水、硼酸钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠
用于干眼症的 iVIZIA 无菌润滑滴眼液, 无防腐剂	0.33 液体盎司瓶	聚维酮 0.5%	

[0139] 可以用本公开内容的 α -淀粉酶配制的眼用滴眼液的非限制性实例包括:

[0140]

表 13			
供应商	名称	防腐剂	浓度(如有说明)
Bausch + Lomb	高级眼部舒缓干眼症恢复 润滑滴眼液(Advanced Eye Relief Dry Eye Rejuvenation	苯扎氯铵	0.010%

[0141]

	Lubricant eye drops)		
	Soothe XP 润肤滴眼液 (Soothe XP Emolient Eye Drops)	Polyquad	
Soothe	最大水合润滑滴眼液 (Lubricant Eye Drops - Maximum Hydration)	苯扎氯铵	0.005%
	水合润滑滴眼液(Hydration Lubricant Eye Drops)	依地酸二钠 山梨酸	0.1% 0.1%
Clear Eyes	天然泪液润滑滴眼液 (Natural Tears Lubricant)	苯扎氯铵	
Johnson & Johnson Vision	Visine 干眼症疲劳眼舒缓滴眼液(Visine Dry Eye Tired Eye Relief)	苯扎氯铵	
Prestige Consumer Healthcare	Murine Tears 干眼症滴眼液 (Murine Tears for Dry Eyes)	苯扎氯铵	
Alcon	ISOPTO* TEARS 0.5%	苯扎氯铵	0.010%
	Systane Original	Polyquad	0.001%
	Systane Ultra	Polyquad	0.001%
	Systane Ultra Hydration	Polyquad	0.001%
	Systane Balance	Polyquad	0.001%
	Systane Complete	Polyquad	0.001%
	Systane 凝胶滴剂	Polyquad	0.001%
	Systane 润滑眼凝胶	过硼酸钠	
	GenTeal	GenAqua (过硼酸钠)	
	Tears Naturale II	Polyquad	0.001%
	Tears Naturale Forte	Polyquad	0.001%
Allergan	Refresh Repair	Purite (稳定化的氧氯复合物)	
	Refresh Optive	Purite (稳定化的氧氯复合物)	
	Refresh Optive 凝胶滴剂	Purite (稳定化的氧氯复合物)	
	Refresh Optive Advanced	Purite (稳定化的氧氯复合物)	
	Refresh Tears	Purite (稳定化的氧氯复合物)	
Refresh Liquigel	Purite (稳定化的氧氯复合物)		

[0142]

Focus Laboratories	FreshKote 润滑滴眼液	Polixetonium (聚季铵盐-42)	
Johnson and Johnson Vision	Blink Tears 润滑滴眼液	OcuPure (稳定化的氧氯复合物)	
	Blink Gel Tears 润滑滴眼液	OcuPure (稳定化的氧氯复合物)	
Visine Dry Eye Tired Eye Relief	聚季铵盐-42		
Thera Tears	Extra 干眼症治疗滴眼液 (Extra Dry Eye Therapy)	Dequest (过硼酸钠)	
Dry Eye Therapy	Dequest (过硼酸钠)		

实施例

[0143] 提出以下实施例,以便向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开内容和描述,并且不意图限制发明人认为是他们的发明的范围,也不意图表示或暗示下文的实验是所进行的全部或唯一实验。本领域技术人员将理解,在不脱离如广泛描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对如具体方面中所示出的本发明进行许多变化和/或修改。因此,本发明的方面在所有方面中被认为是说明性的而不是限制性的。

[0144] 实施例1.眼用缓和剂组合物

[0145] 本实施例描述了用于测试包含治疗有效浓度的来自米曲霉的 α -淀粉酶与多种眼用缓和剂的组合物的程序。选择以下眼用缓和剂的基本原理如下:

[0146] 缓和剂的选择

[0147] 纤维素衍生物(缓和剂组合物1-缓和剂组合物4):

[0148] 米曲霉 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)催化多糖中1,4- α -D-葡萄糖苷键的内水解(endohydrolysis)。虽然纤维素由多糖制成,但是由于它们通过 β (1 $\rightarrow$ 4)葡聚糖键连接,因此 α -淀粉酶被认为不会破坏这样的键,并且可能通过与其结合而变得抑制。本研究将评估纤维素衍生物是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂,或者 α -淀粉酶活性是否被抑制。

[0149] 葡聚糖:

[0150] 葡聚糖是包含 α -1,6糖苷键的支链葡聚糖多糖。值得注意的是,葡聚糖不同于糊精,糊精是可以包含 α -1,4键或 α -1,6键的多糖。本研究将评估葡聚糖是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂。

[0151] 明胶:

[0152] 明胶包含蛋白质和肽,并且预期不与 α -淀粉酶功能性相互作用。本研究将评估明胶是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂。

[0153] 多元醇:

[0154] 假设向 α -淀粉酶的水溶液中添加多元醇可以增加溶液中 α -淀粉酶的热稳定性。本研究将评估多元醇是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂。

[0155] 聚乙烯醇:

[0156] 聚乙烯醇是一种生物相容性、水溶性的合成聚合物,并且不应与 α -淀粉酶相互作用。本研究将评估聚乙烯醇是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂。

[0157] 聚维酮:

[0158] 聚维酮是一种生物相容性、水溶性的聚合物,并且不应与 α -淀粉酶相互作用。本研究将评估聚维酮是否适合用作包含 α -淀粉酶的组合物中的缓和剂。

[0159] 本研究中测试的组合物如下:

表14	
α -淀粉酶+缓和剂组合物	关键组分(酶+眼用缓和剂)
组合物1	α -淀粉酶+羧甲基纤维素钠, 0.2%至2.5%(体积百分比)
组合物2	α -淀粉酶+羟乙基纤维素, 0.2%至2.5%(体积百分比)
组合物3	α -淀粉酶+羟丙甲纤维素, 0.2%至2.5%(体积百分比)
组合物4	α -淀粉酶+甲基纤维素, 0.2%至2.5%(体积百分比)
[0160] 组合物5	α -淀粉酶+葡聚糖70, 0.1%(体积百分比)
组合物6	α -淀粉酶+明胶, 0.01%(体积百分比)
组合物7	α -淀粉酶+甘油, 0.2%至1%(体积百分比)
组合物8	α -淀粉酶+聚乙二醇300, 0.2%至1%(体积百分比)
组合物9	α -淀粉酶+聚乙二醇400, 0.2%至1%(体积百分比)
组合物10	α -淀粉酶+聚山梨醇酯80, 0.2%至1%(体积百分比)
组合物11	α -淀粉酶+丙二醇, 0.2%至1%(体积百分比)
组合物12	α -淀粉酶+聚乙烯醇, 0.1%至4%(体积百分比)
[0161] 组合物13	α -淀粉酶+聚维酮, 0.1%至2%(体积百分比)

[0162] 1.1组合物开发-缓和剂表征

[0163] 通过在缓冲盐水溶液中使用不含防腐剂的商业滴眼液来制备 α -淀粉酶与上文提及的眼用缓和剂组合的组合物。值得注意的是, α -淀粉酶被认为需要钙离子才能发挥作用,并且本公开内容的组合物包括钙离子。注意:可以基于Ca辅因子测试结果在方案中调节CaCl₂浓度。如果过量的Ca导致酶失活,则可以调节浓度。

[0164] 在不同的实验中测试包含不同防腐剂的组合物,描述于实施例2。

[0165] 1.1.1组合物开发-具有辅因子的 α -淀粉酶制剂(无缓和剂):

[0166] 步骤1:制备10ml的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶溶液。向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0167] 步骤2:将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。混合直至所有组分溶解并

均匀分布。

[0168] 1.1.2组合物开发- α -淀粉酶制剂+纤维素衍生物缓和剂(组合物1-组合物4):

[0169] 用于制备10ml的具有0.5%羧甲基纤维素钠的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案。注意:羧甲基纤维素钠可以在上表中描述的范围被羟乙基纤维素、羟丙甲纤维素或甲基纤维素取代。

[0170] 步骤1:向烧瓶中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。向烧瓶中添加40mg的氯化钙和56mg的氯化钠。混合直至所有组分溶解并均匀分布。

[0171] 步骤2:添加50mg的羧甲基纤维素钠(Sigma-Aldrich目录#419273)(或本文描述的另一种适合的纤维素衍生物)并混合直至溶解。

[0172] 1.1.3组合物开发- α -淀粉酶制剂+葡聚糖缓和剂(组合物5):

[0173] 用于制备10ml的具有0.1%葡聚糖70、0.3%羟丙甲纤维素的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案

[0174] 步骤1:将20mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)添加到烧瓶中的2ml ALCON GenTeal Tears不含防腐剂的一次性小瓶中。混合直至所有组分溶解并均匀分布。

[0175] 步骤2:将0.006g的氯化钙溶解到溶液中,混合直至溶解。

[0176] 1.1.4组合物开发- α -淀粉酶制剂+明胶(组合物6):

[0177] 用于制备2ml的具有0.01%明胶的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案:

[0178] 步骤1:向烧瓶中的2ml室温盐水中添加0.2mg纯明胶粉末,不要混合。

[0179] 步骤2:使明胶起泡(bloom)持续5min。

[0180] 步骤3:将烧瓶加温至50℃,并且混合明胶直至溶解。

[0181] 步骤4:在继续之前,将烧瓶冷却至室温。

[0182] 步骤5:向烧瓶中添加20mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0183] 将0.006g的氯化钙溶解到溶液中。

[0184] 1.1.5组合物开发- α -淀粉酶制剂+甘油(组合物7):

[0185] 用于制备10ml的具有0.5%甘油的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案:

[0186] 步骤1:向烧瓶中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。向烧瓶中添加40mg的氯化钙和56mg的氯化钠。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0187] 步骤2:向烧瓶中添加100mg的甘油。用无菌DI水将烧瓶装满至10ml标记。混合直至所有组分溶解并均匀分布。

[0188] 1.1.6组合物开发-在盐水+多元醇中的 α -淀粉酶制剂(组合物8-组合物11):

[0189] 聚乙二醇400-1.0%

[0190] 步骤1:向烧瓶中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。向烧瓶中添加40mg的氯化钙和56mg的氯化钠。

[0191] 混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0192] 步骤2:添加100mg的聚乙二醇400(Sigma-Aldrich目录#8074850050)并混合直至溶解。用无菌DI水将烧瓶装满至10ml标记。混合直至所有组分溶解并均匀分布。

[0193] 注意:聚乙二醇400可以被聚乙二醇300和其他合适的多元醇取代。

[0194] 丙二醇1.0%

[0195] 步骤1:向烧瓶中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。向烧瓶中添加40mg的氯化钙和56mg的氯化钠。

[0196] 步骤2:向烧瓶中添加100mg的丙二醇。用无菌DI水将烧瓶装满至10ml标记。混合直至所有组分溶解并均匀分布。

[0197] 聚乙烯醇4% (PVA)

[0198] 步骤1:应提前制备4% PVA溶液(每100ml DI水4g PVA),因为必须将PVA添加到具有磁力搅拌器的轻轻加帽的培养基瓶中的室温DI水中,在连续搅拌的同时温和地加热至90℃,在90℃保持持续1小时,并且恢复至室温。

[0199] 步骤2:向10ml 4% PVA溶液中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0200] 步骤3:将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。混合直至所有组分均匀溶解。

[0201] 1.2组合物评估-用于体外测试生物膜形成抑制的孔板设置

[0202] 使用下文列出的方案制备金黄色葡萄球菌并将其铺板用于生物膜形成方案。

[0203] 1.2.1解冻金黄色葡萄球菌

[0204] 使用在25℃至30℃水浴中轻轻搅拌,将细菌菌株垂直解冻。解冻将很快;大约2-3分钟或直至所有冰晶已经融化。

[0205] 在解冻之后,立即用70%乙醇向下擦拭微型冷冻瓶,并使用无菌接种环用10mL胰蛋白酶大豆肉汤(30g/1000ml DI H₂O)无菌接种需氧细菌的通气的无菌培养管。在37℃在振荡孵育箱中孵育持续24小时。

[0206] 1.2.2制备用于铺板的培养物

[0207] 步骤1.在Photopette上放置新的CuveTip

[0208] 步骤2.打开Photopette并确保蓝牙已连接到iPad。

[0209] 步骤3.打开App并将测量设置为在600nm处收集(为简洁起见,使用ecoli设置)。

[0210] 步骤4.将Photopette在DI水中归零,并用chemwipe清洁吸头(tip)。

[0211] 步骤5.将100ml的TSB柠檬酸盐培养基(TSBC)无菌转移至烧瓶中。

[0212] 步骤6.使用移液管将胰蛋白酶大豆肉汤中的金黄色葡萄球菌金黄亚种(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) (ATCC 29213)的过夜培养物无菌转移至TSB柠檬酸盐培养基(TSBC)中,直到培养物稀释至用Photopette测量的0.02($\sim 2 \times 10^8$ CFU/ml)的A600。

[0213] 步骤7.从罩中的无菌包装中取出无菌96孔板并放置在台子上。

[0214] 步骤8.将8通道移液管设置为100 μ l,并附接无菌吸头。

[0215] 步骤9.将期望数量的孔铺板有100 μ l稀释的培养物。

[0216] 步骤10.盖上孔板并在37℃孵育过夜持续18小时。

[0217] 1.2.3铺板

[0218] 将金黄色葡萄球菌铺板在96组织培养物处理的孔板的所有孔中。在测定生物膜形成之前,孔板应在37℃孵育持续18小时。

[0219] 1.3组合物测试

[0220] 1.3.1测试组合物第1天

[0221] 小心地倾斜板,并通过将移液管尖端插入孔的底角中,从孔中用移液管移除所有液体,以去除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0222] 当使用8通道移液管处理第一行时,启动计时器持续10分钟。每一行应每30秒处理一次,确保温和地释放孔的角中的组合物,以免机械地干扰生物膜。

[0223] 对于第1行:向所有孔中添加50 μ l的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶。

[0224] 对于第2行:向所有孔中添加50 μ l的用1.0%聚乙二醇400配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0225] 对于第3行:向所有孔中添加50 μ l的用2.5%羧甲基纤维素钠配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0226] 对于第4行:向所有孔中添加50 μ l的用1.0%甘油配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0227] 对于第5行:向所有孔中添加50 μ l的用2.0%聚维酮配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0228] 对于第6行:向所有孔中添加50 μ l的用1.0%丙二醇配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0229] 对于第7行:向所有孔中添加50 μ l的用2.7%聚乙烯醇配制的10mg/ml α -淀粉酶。

[0230] 对于第8行:向所有孔中添加50 μ l的具有0.1%葡聚糖70、0.3%羟丙甲纤维素2910的在盐水中的10mg/ml α -淀粉酶。

[0231] 对于第9行:向所有孔中添加50DI水。不处理第11-12行。将板在37℃孵育持续10分钟。

[0232] 1.4生物膜减少的评估

[0233] 在10min之后,应从第1行开始,每30秒逐行移除所有流体。必须在轻轻移液的情况下移除流体,其中板成一定角度,移液管位于角落,以移除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0234] 添加50 μ l的0.1%结晶紫(CV)以对所有孔的粘附细胞进行染色。

[0235] 通过将板浸入DI水浴中小心地冲洗所有孔,以去除所有剩余的结晶紫。

[0236] 干燥孔板并使用板读取器在600nm处测量生物膜的光密度。

[0237] 一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。

[0238] 1.5多种组合物的防腐效果的评估

[0239] 对于在第7、14、21、28和35天的计划检测日,重复1.2和1.3中概述的步骤。对于在第7、14、21、28和35天计划的每一天的测试,应在前一天制备生物膜孔板。

[0240] 一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。所有实验均使用无菌技术和无菌设备在清洁环境中进行。

[0241] 实施例2.眼用防腐剂组合物测试

[0242] 本实施例描述了用于测试来自米曲霉的 α -淀粉酶与眼用防腐剂的组合物的相容性的程序。所测试的这些防腐剂意图阻止微生物生长,而不是延长 α -淀粉酶的保质期。

[0243] 2.1组合物开发-防腐剂对 α -淀粉酶功能的评估

[0244] 本公开内容假设眼睑上的金黄色葡萄球菌生物膜是干眼病的主要原因。 α -淀粉酶先前没有用于从眼睑去除生物膜。本公开内容描述了眼用溶液成分与 α -淀粉酶的多种组合在去除细胞培养物中的生物膜方面的效力的测试和表征,然后在组织上测试这些溶液。本

实验旨在评估眼用防腐剂是否有助于或阻碍 α -淀粉酶在减少金黄色葡萄球菌生物膜中的有效性。在该实施例中评估下文的防腐剂：

[0245] A) BAK通常起到用于溶解细胞壁和细胞膜的去污剂作用,然而尚不清楚它是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。B) 聚季铵盐-1被认为作用于细胞膜,类似地,尚不清楚它是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。C) 稳定化的氧氯复合物被认为经由细胞内脂质和谷胱甘肽的氧化起到防腐剂的作用,类似地,尚不清楚它是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。D) 过硼酸钠被认为通过形成过氧化氢、氧化作用而起作用,然而它是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能未知。E) 依地酸二钠和山梨酸,或依地酸二钠,或乙二胺四乙酸(EDTA)被认为通过与重金属诸如铁或钙结合而起作用。由于 α -淀粉酶使用钙作为辅因子,因此该方案将测试这些防腐剂是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。F) Polixetonium(聚季铵盐-42)不常用作防腐剂,尚不清楚它是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。G) 硼酸盐、山梨醇、丙二醇和锌离子缓冲剂可以经由多种潜在的作用方法起作用,该方案将测试这些防腐剂是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。H) 聚己缩胍被认为通过损害细菌细胞膜活性而起作用,该方案将测试这些防腐剂是否影响 α -淀粉酶的稳定性/功能。

表15

α -淀粉酶+防腐剂组合物	关键组分(酶+眼用防腐剂)
组合物14	α -淀粉酶+0.01% BAK (苯扎氯铵)
组合物15	α -淀粉酶+0.001% Polyquad (聚季铵盐-1)
组合物16	α -淀粉酶+Purite/OcuPure (稳定化的氧氯复合物)
组合物17	α -淀粉酶+GenAqua/Dequest (过硼酸钠)
组合物18	α -淀粉酶+0.1%依地酸二钠二钠和0.1%山梨酸
组合物19	α -淀粉酶+Polixetonium (聚季铵盐-42)
组合物20	α -淀粉酶+SofZia (硼酸盐、山梨醇、丙二醇和锌离子缓冲剂)
组合物21	α -淀粉酶+聚己缩胍(聚六亚甲基双胍)

[0247] 2.1.1组合物开发-具有辅因子的 α -淀粉酶制剂(无防腐剂-对照组合物):

[0248] 步骤1:向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0249] 步骤2:将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。混合直至所有成分溶解并均匀分布。

[0250] 2.1.2组合物开发- α -淀粉酶制剂+苯扎氯铵(组合物14):

[0251] 用于制备10ml的具有0.01%苯扎氯铵的10mg/ml α -淀粉酶溶液的方案:

[0252] 步骤1:向烧瓶中的用DI水稀释至0.01%的10ml苯扎氯铵(Sigma-Aldrich目录#PHR1371)中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0253] 步骤2:将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。

[0254] 2.1.3组合物开发- α -淀粉酶制剂+Polyquad(聚季铵盐-1)(组合物15):

[0255] 用于制备10ml的具有0.001% Polyquad的10mg/ml α -淀粉酶溶液的方案:

[0256] 步骤1:向烧瓶中的2ml的Systane original中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0257] 制备10ml的具有0.01%过硼酸钠的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液。

[0258] 步骤2:溶解在1mg的聚季铵盐-1(Santa Cruise Biochemicals目录#sc-476677)中。将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。

[0259] 2.1.4组合物开发- α -淀粉酶制剂+稳定化的氧氯复合物(组合物16):

[0260] 用于制备10ml的具有稳定化的氧氯络合物的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案:

[0261] 向烧瓶中的10ml Blink Tears润滑滴眼液中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065),所述滴眼液已经包含合适量的稳定化的氧氯复合物。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0262] 2.1.5组合物开发- α -淀粉酶制剂+GenAqua/Dequest(过硼酸钠)(组合物17):

[0263] 用于制备2ml的具有0.01% GenAqua/Dequest(过硼酸钠)的10mg/ml α -淀粉酶的盐水溶液的方案:

[0264] 步骤1:向烧瓶中的DI中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0265] 步骤2:将1mg的过硼酸钠溶解到溶液中。

[0266] 步骤3:溶解在30mg的氯化钙和60mg的氯化钠中。

[0267] 2.1.6组合物开发- α -淀粉酶制剂+0.1%依地酸二钠和0.1%山梨酸(组合物18):

[0268] 用于制备次氯酸钠溶液的方案:

[0269] 步骤1:制备10ml 5%漂白剂(次氯酸钠)溶液。

[0270] 步骤2:向10ml烧瓶中添加6.66ml的可商购的漂白剂7.5%次氯酸钠,并用DI水装满至10ml。

[0271] 2.2组合物评估-用于体外测试来自米曲霉的 α -淀粉酶与眼用防腐剂的相容性的孔板设置

[0272] 使用实施例1(1.2.1)中列出的方案,制备用于铺板金黄色葡萄球菌的板,以用于防腐剂相容性方案测试。简言之,如实施例1中所描述对卷1-10、1-8铺板金黄色葡萄球菌,留下第11-12行用于DI水,以用于分光光度法比较。在测定生物膜形成之前,将孔板在37°C孵育持续18小时。

[0273] 2.3组合物测试

[0274] 1.3.1测试组合物第1天

[0275] 小心地倾斜板,并通过将移液管尖端插入孔的底角中,从孔中用移液管移除所有液体,以去除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0276] 当使用8通道移液管处理第一行时,启动计时器持续10分钟。每一行应每30秒处理一次,确保温和地释放孔的角中的组合物,以免机械地干扰生物膜。

[0277] 对于第1行:向第1行中添加50 μ l的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶。

[0278] 对于第2行:向第2行中添加50 μ l的具有0.01%苯扎氯铵的10mg/ml α -淀粉酶。

[0279] 对于第3行:向第3行中添加50 μ l的具有0.001% Polyquad的10mg/ml α -淀粉酶。

[0280] 对于第4行:向第4行中添加50 μ l的具有0.01%过硼酸钠的10mg/ml α -淀粉酶。

- [0281] 对于第5行:向第5行中添加50 μ l的具有稳定化的氧氯复合物的10mg/ml α -淀粉酶。
- [0282] 对于第6行:向第6行中添加50 μ l的7.5%漂白剂(次氯酸钠)溶液。
- [0283] 对于第7行:向第7行中添加50 μ l DI水。
- [0284] 将板在37 $^{\circ}$ C孵育持续剩余的10分钟。
- [0285] 2.4生物膜减少的评估
- [0286] 在10min之后,应从第1行开始,每30秒逐行移除所有流体。必须在轻轻移液的情况下移除流体,其中板成一定角度,移液管位于角落,以移除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。
- [0287] 添加50 μ l的0.1%结晶紫(CV)以对所有孔的粘附细胞进行染色。
- [0288] 通过将板浸入DI水浴中小心地冲洗所有孔,以去除所有剩余的结晶紫。
- [0289] 干燥孔板并使用板读取器在600nm处测量生物膜的光密度。
- [0290] 一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。
- [0291] 实施例3.生物膜形成
- [0292] 用于人类结膜上皮细胞与金黄色葡萄球菌共培养研究的方案的概述。
- [0293] 使用角膜上皮细胞培养基,将来自ScienCell Research Laboratories目录#6630的人类结膜上皮细胞(HConEpiC)作为单层生长在聚-L-赖氨酸包被的24孔板上。
- [0294] 3.1开始培养:
- [0295] ScienCell原代细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育箱中培养如下:
- [0296] 1.制备聚-L-赖氨酸包被的培养容器(2 μ g/cm²,推荐T-75烧瓶)。为了获得2 μ g/cm²聚-L-赖氨酸包被的培养容器,向T-75烧瓶中添加10ml的无菌水,并且然后添加15 μ l的聚-L-赖氨酸储备溶液(10mg/ml,目录#0413)。将容器留在37 $^{\circ}$ C的孵育箱中过夜(或持续最少一小时)。
- [0297] 2.制备完全培养基。用70%乙醇对培养基瓶和培养基补充管的外表面去污,并将其转移至无菌区。用移液管将补充剂无菌地转移至基础培养基中。用培养基冲洗补充管以恢复全部体积。
- [0298] 3.用无菌水冲洗聚-L-赖氨酸包被的容器两次,并且然后添加20ml的完全培养基。将容器留在无菌区中并继续解冻冷冻保存的细胞。
- [0299] 4.将冷冻小瓶放置在37 $^{\circ}$ C水浴中。握住并轻轻旋转小瓶,直到内容物完全解冻。立即将小瓶从水浴中移除,用70%乙醇向下擦拭,并将其转移至无菌区。
- [0300] 5.小心地移除帽(cap),而不接触内螺纹。将小瓶中的内容物温和地重悬并分配到平衡的聚-L-赖氨酸包被的培养容器中。
- [0301] 注意:不建议在解冻之后稀释和离心细胞,因为这些动作可能对细胞有害。在有利于细胞附着的条件下将细胞铺板在例如聚-L-赖氨酸包被的培养容器中以促进细胞附着也是重要的。
- [0302] 6.更换培养容器的帽或盖(lid),并轻轻摇动容器以使细胞均匀分布。如有必要,松开帽,以允许气体交换。
- [0303] 7.将培养容器返回到孵育箱。
- [0304] 8.在开始后至少16小时内不干扰培养物。第二天更新培养基以去除残余的DMSO和

未附着的细胞。

[0305] 3.2维持培养:

[0306] 1. 在从冷冻保存的细胞建立培养物之后,第二天早上更新补充的培养基。

[0307] 2. 此后每三天更换一次培养基,直到培养物大约70%汇合。

[0308] 3. 一旦培养物达到70%汇合,每隔一天更换培养基,直到培养物大约90%汇合。

[0309] 3.3传代培养:

[0310] 1. 当培养物达到90%汇合时进行传代培养。

[0311] 2. 在传代培养前一天制备聚-L-赖氨酸包被的培养容器 ($2\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。

[0312] 3. 将完全培养基0.05%胰蛋白酶/EDTA溶液(T/E,目录#0183)、T/E中和溶液(TNS,目录#0113)和DPBS(不含 Ca^{++} 和 Mg^{++} ,目录#0303)加温至室温。我们不建议在使用前在 37°C 的水浴中将试剂和培养基加温。

[0313] 4. 用DPBS冲洗细胞。

[0314] 5. 将10ml 0.05% T/E溶液(目录#0183)添加到烧瓶中(在T-75烧瓶的情况下)。轻轻摇动烧瓶以确保T/E溶液完全覆盖细胞。使用显微镜来监测细胞形态的变化。

[0315] 注意:建议使用ScienCell 0.05%T/E溶液,该溶液被优化以使由于过度胰蛋白酶化而导致的细胞损伤最小化,尽管也可以使用其他溶液。如果使用0.25%T/E溶液(目录#0103),则应使用8ml的DPBS和2ml的0.25%T/E溶液。

[0316] 6. 在孵育期间,用5ml的胎牛血清(FBS,目录#0500)制备50ml锥形离心管。

[0317] 7. 一旦细胞完全聚集,将T/E溶液从烧瓶中转移至50ml离心管中(一小部分细胞可能脱离),并在 37°C 孵育烧瓶持续2-3分钟(此时烧瓶中没有溶液)。

[0318] 8. 在孵育结束时,轻敲烧瓶的侧面以使细胞从表面脱落。在显微镜下检查以确保所有细胞脱离。

[0319] 9. 向烧瓶中添加5ml的TNS溶液,并将脱离的细胞转移至50ml离心管中。用另外5ml的TNS冲洗烧瓶以收集残余细胞。

[0320] 10. 通过观察留下的细胞数量,在显微镜下检查烧瓶是否成功收获细胞;应该不到5%。

[0321] 11. 将50ml离心管以1000rpm离心持续5分钟。将细胞温和地重悬于培养基中。

[0322] 12. 在新的聚-L-赖氨酸包被的培养容器中以推荐的细胞密度计数和铺板细胞。推荐5,000个细胞/ cm^2 的接种密度。

[0323] 3.4共培养开发

[0324] 在建立单层人类结膜上皮细胞之后,一层金黄色葡萄球菌金黄亚种(ATCC 29213)将建立在上皮细胞的顶部上。

[0325] 1. 将 $650\mu\text{L}$ 的在胰蛋白酶大豆肉汤中的金黄色葡萄球菌金黄亚种(ATCC 29213)添加到稀释至 A_{600} 为0.01($\sim 1 \times 10^8 \text{CFU}/\text{ml}$)的TSB柠檬酸盐培养基(TSBC)中,至行A-行C的每个孔中,留下行D未处理。

[0326] 2. 盖上孔板并在 37°C 孵育持续4小时。

[0327] 3.5测试

[0328] 在该共培养物中测试 α -淀粉酶组合物,优先地已证明如实施例1中所描述在细胞培养物中去除生物膜的能力的组合物,以研究表征它们对下面的单层人类结膜上皮细胞的

潜在毒性。假设是,通过处理和消除损害人体的金黄色葡萄球菌,来自上皮细胞的炎性应答将在mRNA和蛋白质水平上恢复正常。

[0329] 将1ml的每种测试组合物添加到行A的每个孔中。

[0330] 用1ml阴性对照(盐水)测试行B。

[0331] 用1ml阳性对照(庆大霉素)测试行C。

[0332] 测试组合物应在37℃孵育持续10min。

[0333] 在裂解之前,所有层应洗涤三次。将板用1ml胰蛋白酶轻轻裂解以去除细胞。将裂解的细胞用台盼蓝染色,并在显微镜下评估细胞计数。蓝色细胞的存在指示细胞死亡。评估样品的细胞数量和可见度曲线(visibility curve)。还在攻击前和攻击后收集并冷冻样品,用于mRNA、DNA和蛋白质分析,以用于将来的表达分析。

[0334] 实施例4. 抗生素+ α -淀粉酶对金黄色葡萄球菌生物膜的处理

[0335] 金黄色葡萄球菌产生细胞外荚膜多糖,该细胞外荚膜多糖连接以产生生物膜。米曲霉 α -淀粉酶(E.C.3.2.1.1)催化含有三个或更多个1,4- α -连接的D-葡萄糖单元的多糖中1,4- α -D-葡萄糖苷键的内水解。 α -淀粉酶不具有抗菌性质,但它可以通过破坏生物膜的细胞外多糖键来抑制和减少金黄色葡萄球菌生物膜。抗生素已经被示出在减少生物膜方面具有一些效果,但对已建立的生物膜的效果较差。此外,长期使用抗生素可以导致抗生素抗性细菌。 α -淀粉酶不具有抗菌性质,并且不具有产生抗生素抗性细菌的已知风险。

[0336] 本实施例中描述的 α -淀粉酶的外部施加从未用于减少或防止眼睑上的生物膜形成。本实验旨在表征 α -淀粉酶和 α -淀粉酶组合物与其他抗菌剂或抗微生物剂对孔板中生长持续24小时的金黄色葡萄球菌生物膜的用途。假设, α -淀粉酶的添加将改善所有化合物的生物膜去除。

[0337] 本研究描述了在体外形成的生物膜上测试具有和不具有来自米曲霉的 α -淀粉酶的0.01%次氯酸溶液的组合物。本研究还描述了具有和不具有来自米曲霉的 α -淀粉酶的常见眼用抗生素的组合物的测试。这些抗生素包括:红霉素、莫西沙星和硫酸庆大霉素。本研究使用作为阴性对照的无菌盐水和作为阳性对照的5%漂白剂溶液。

[0338] 4.1组合物开发-在盐水中的 α -淀粉酶制剂:

[0339] α -淀粉酶需要钙离子才能发挥作用。用0.4%氯化钙和0.56%氯化钠制备盐水溶液。将0.4%氯化钙添加到 α -淀粉酶溶液中以确保钙离子的存在。

[0340] 步骤1:制备10ml的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶溶液。向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0341] 步骤2:将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中。混合直至所有成分均匀分布。

[0342] 4.1.2组合物开发-在0.01%次氯酸溶液中的 α -淀粉酶

[0343] 用于制备2ml的在0.01%次氯酸溶液中的10mg/ml α -淀粉酶的溶液的方案:

[0344] 步骤1:向烧瓶中的10ml的在盐水中的0.01%次氯酸(Avenova OTC抗微生物喷雾溶液)中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0345] 步骤2:将40mg的氯化钙溶解到溶液中。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0346] 4.1.3组合物开发-在氧氟沙星溶液中的 α -淀粉酶

[0347] 用于制备2ml的在0.3%氧氟沙星眼用溶液中的10mg/ml α -淀粉酶的方案:

[0348] 简言之:向烧瓶中的1ml的0.5%红霉素眼用溶液中添加20mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065),并且混合直至均匀分布。将8mg的氯化钙溶解到溶液中。

[0349] 4.1.4组合物开发-在0.01%莫西沙星溶液中的 α -淀粉酶

[0350] 用于制备1ml的在0.5%莫西沙星眼用溶液中的10mg/ml α -淀粉酶的方案:

[0351] 简言之:向烧瓶中的1ml的0.5%莫西沙星眼用溶液中添加10mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065),并且混合直至均匀分布。将3mg的氯化钙溶解到溶液中。

[0352] 4.1.5组合物开发-在硫酸庆大霉素中的 α -淀粉酶

[0353] 用于制备2ml的在0.5%硫酸庆大霉素眼用溶液中的10mg/ml α -淀粉酶的方案:

[0354] 简言之:向烧瓶中的1ml的0.5%硫酸庆大霉素眼用溶液中添加20mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065),并且混合直至均匀分布。将8mg的氯化钙溶解到溶液中。

[0355] 4.1.6组合物开发-在漂白剂中的 α -淀粉酶

[0356] 用于制备10ml 5%漂白剂(次氯酸钠)溶液的方案:

[0357] 简言之:向10ml烧瓶中添加6.66ml的可商购的漂白剂7.5%次氯酸钠,并用DI水装满至10ml。

[0358] 4.2孔板设置

[0359] 使用实施例1(1.2.1)中列出的方案,制备用于铺板金黄色葡萄球菌的板,以用于防腐剂相容性方案测试。简言之,如实施例1所描述将金黄色葡萄球菌铺板在96组织培养物处理的孔板的所有孔中。在测定生物膜形成之前,孔板应在37℃孵育持续18小时。

[0360] 4.3测试组合物

[0361] 小心地倾斜板,并通过将移液管尖端插入孔的底角中,从孔中用移液管移除所有液体,以去除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0362] 当使用8通道移液管处理第一行时,启动计时器持续10分钟。每一行应每30秒处理一次,确保温和地释放孔的角中的组合物,以免机械地干扰生物膜。

[0363] 对于第1行:向所有孔中添加50 μ l的在辅因子溶液中的10mg/ml α -淀粉酶。

[0364] 对于第2行:向所有孔中添加50 μ l的在0.01%次氯酸溶液中的10mg/ml α -淀粉酶。

[0365] 对于第3行:向所有孔中添加50 μ l的在盐水中的0.01%次氯酸(Avenova OTC抗微生物喷雾溶液)。

[0366] 对于第4行:向所有孔中添加50 μ l的在0.3%氧氟沙星眼用溶液中的10mg/ml α -淀粉酶。

[0367] 对于第5行:向所有孔中添加50 μ l的0.3%氧氟沙星眼用溶液。

[0368] 对于第6行:向所有孔中添加50 μ l的在0.5%硫酸庆大霉素眼用溶液中的10mg/ml α -淀粉酶。

[0369] 对于第7行:向所有孔中添加50 μ l的0.5%硫酸庆大霉素眼用溶液。

[0370] 对于第8行:向所有孔中添加50 μ l的5%漂白剂(次氯酸钠)溶液。

[0371] 对于第9行:向所有孔中添加50 μ l DI水。

[0372] 不处理第10-12行。将板在37℃孵育持续剩余的10分钟。

[0373] 4.4.对生物膜减少的测试

[0374] 在10min之后,应从第1行开始,每30秒逐行移除所有流体。必须在轻轻移液的情况下移除流体,其中板成一定角度,移液管位于角落,以移除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0375] 添加50μl的0.1%结晶紫(CV)以对所有孔的粘附细胞进行染色。

[0376] 通过将板浸入DI水浴中小心地冲洗所有孔,以去除所有剩余的结晶紫。

[0377] 干燥孔板并使用板读取器在600nm处测量生物膜的光密度。一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。

[0378] 实施例5. 辅因子+α-淀粉酶处理金黄色葡萄球菌生物膜的范围

[0379] 该方案被设计成评估当用于去除金黄色葡萄球菌生物膜时来自米曲霉的α-淀粉酶的辅因子钙的最佳范围。

[0380] Ca^{2+} 已被确定为α-淀粉酶的必要辅因子,然而之前对金黄色葡萄球菌生物膜上的α-淀粉酶进行的研究并没有将 Ca^{2+} 引入组合物中以去除或抑制细胞培养物中的生物膜生长。α-淀粉酶对Ca离子具有两个结合位点。1mg的α-淀粉酶包含 1.075×10^{16} 个酶,并且本公开内容提供其可以消耗至少0.0039mg的 CaCl_2 以提供每个酶两个钙离子。尚不清楚需要多少 Ca^{2+} 来提供用于去除生物膜的最佳功能,并且一些文献表明,过量的钙可能具有负面影响。尽管一些电解质,包括 Ca^{2+} ,天然存在于眼睛中,但本研究被设计成表征来自米曲霉的α-淀粉酶在不同浓度的 Ca^{2+} 辅因子去除细胞培养物中金黄色葡萄球菌生物膜的有效性。

[0381] 人类泪液中的正常电解质浓度(mMol/升)

表16	
电解质	mMol/升
钠(Na)	132
钾	24
HCO_2	32.8
Ca	0.8
Mg	0.61

[0383] 5.1组合物开发

[0384] 5.1.1-制备10ml的10mg/ml α-淀粉酶的DI水溶液

[0385] 向烧瓶中的2ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的α-淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至α-淀粉酶溶解并均匀分布。

[0386] 5.1.2-制备10ml的具有0.05% CaCl_2 0.85%NaCl的10mg/ml α-淀粉酶的DI水溶液。

[0387] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的α-淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至α-淀粉酶溶解并均匀分布。添加5mg CaCl_2 。添加85mg的NaCl。混合直至溶解。

[0388] 5.1.3-制备10ml的具有0.1%CaCl₂ 0.8%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0389] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加10mg的CaCl₂。添加80mg的NaCl。混合直至溶解。

[0390] 5.1.4-制备10ml的具有0.2%CaCl₂ 0.7%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0391] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加20mg的CaCl₂。添加70mg的NaCl。混合直至溶解。

[0392] 5.1.5-制备10ml的具有0.3%CaCl₂ 0.6%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0393] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加30mg的CaCl₂。添加60mg的NaCl。混合直至溶解。

[0394] 5.1.6-制备10ml的具有0.4%CaCl₂ 0.5%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0395] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加40mg的CaCl₂。添加50mg的NaCl。混合直至溶解。

[0396] 5.1.7-制备10ml的具有0.5%CaCl₂ 0.4%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0397] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加50mg的CaCl₂。添加40mg的NaCl。混合直至溶解。

[0398] 5.1.8-制备10ml的具有0.6%CaCl₂ 0.3%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0399] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加60mg的CaCl₂。添加30mg的NaCl。混合直至溶解。

[0400] 5.1.9-制备10ml的具有0.8%CaCl₂ 0.1%NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0401] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich 目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。添加80mg的CaCl₂。添加10mg的NaCl。混合直至溶解。

[0402] 5.2测试组合物

[0403] 小心地倾斜板,并通过将移液管尖端插入孔的底角中,从孔中用移液管移除所有液体,以去除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0404] 当使用8通道移液管处理第一行时,启动计时器持续10分钟。每一行应每30秒处理一次,确保温和地释放孔的角中的组合物,以免机械地干扰生物膜。

[0405] 对于第1行:向第1行中添加50 μ l的在DI水的10mg/ml α -淀粉酶。

[0406] 对于第2行:向第2行中添加50 μ l的具有0.05% CaCl₂ 0.85% NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0407] 对于第3行:向第3行中添加50 μ l的具有0.1% CaCl₂ 0.8% NaCl的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0408] 对于第4行:向第4行中添加50 μ l的具有0.2% CaCl₂ 0.7% NaCl的10mg/ml α -淀

粉酶的DI水溶液。

[0409] 对于第5行:向第5行中添加50 μ l的具有0.3% CaCl_2 0.6% NaCl 的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0410] 对于第6行:向第6行中添加50 μ l的具有0.4% CaCl_2 0.5% NaCl 的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0411] 对于第7行:向第7行中添加50 μ l的具有0.5% CaCl_2 0.4% NaCl 的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0412] 对于第8行:向第8行中添加50 μ l的具有0.6% CaCl_2 0.3% NaCl 的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0413] 对于第9行:向第9行中添加50 μ l的具有0.8% CaCl_2 0.1% NaCl 的10mg/ml α -淀粉酶的DI水溶液。

[0414] 对于第10行:向第10行中添加50 μ l的7.5%漂白剂(次氯酸钠)溶液。

[0415] 对于第11行:向第11行中添加50 μ l DI水。

[0416] 不处理第12行。应将板放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 的孵育箱中持续10min时间段的剩余时间。

[0417] 5.3对生物膜的测试

[0418] 在10min之后,应从第1行开始,每30秒逐行移除所有流体。必须在轻轻移液的情况下移除流体,其中板成一定角度,移液管位于角落,以移除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。

[0419] 添加50 μ l的0.1%结晶紫(CV)以对所有孔的粘附细胞进行染色。

[0420] 通过将板浸入DI水浴中小心地冲洗所有孔,以去除所有剩余的结晶紫。干燥孔板并使用板读取器在600nm处测量生物膜的光密度。

[0421] 一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。

[0422] 实施例6. 包含浓度范围从0.4% CaCl_2 至0.8% CaCl_2 体积的钙辅因子(CaCl_2)的 α -淀粉酶组合物

[0423] 下文的实验总结了在包含来自米曲霉的 α -淀粉酶的多种添加剂的不同组合物的情况下观察到的结果,以确定任何这样的添加剂是否增强、不影响或抑制酶去除细胞培养物中生长的生物膜的能力。使用细胞板读取器在600nm处评估剩余的生物膜密度,被称为光密度600(OD_{600})测量。

[0424] 实施例6.1. 包含钙辅因子(CaCl_2)的 α -淀粉酶组合物

[0425] 钙辅因子优化:

[0426] 钙已被确定为 α -淀粉酶的必需辅因子,然而之前对金黄色葡萄球菌生物膜上的 α -淀粉酶进行的研究并没有将钙引入组合物中以去除或抑制细胞培养物中的生物膜生长。本研究旨在确定需要多少钙来提供去除生物膜的最佳功能。一些文献表明,过量的钙可能具有负面影响。因此,考虑支持 α -淀粉酶活性而不抑制它的 Ca^{2+} 的浓度范围是重要的。

[0427] 一般方法:

[0428] 使用补充有酵母提取物、葡萄糖和柠檬酸钠的TSB肉汤在96孔(Corning Falcon)细胞培养物处理的板中生长金黄色葡萄球菌生物膜,以诱导生物膜形成,并孵育持续18小时。

[0429] 去除非粘附细胞并用不同溶液处理生物膜以测试分解金黄色葡萄球菌生物膜的能力。使用~30U/mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)以10mg/mL生产具有 α -淀粉酶的溶液。

[0430] 在孵育10分钟之后,去除非粘附细胞,并将残余的生物膜用结晶紫染色。使用Byonoy Absorbance 96板读取器在600nm处测量剩余生物膜的密度。

[0431] 图11A是图示出上文描述的实验结果的图表。生物膜的光密度在Y轴上示出。X轴图示出了不同浓度的CaCl₂辅因子和两个对照:去离子水(阴性对照)和漂白剂(用于去除生物膜的阳性对照)。所测试的浓度包括0.05% CaCl₂辅因子、0.1% CaCl₂辅因子、0.2% CaCl₂辅因子、0.3% CaCl₂辅因子、0.4CaCl₂辅因子、0.5% CaCl₂辅因子、0.6% CaCl₂辅因子或0.8% CaCl₂辅因子。

[0432] 下表总结了Tukey多重比较检验分析的结果:

[0433]

表 17					
Tukey 多重比较检验	平均差异	差异的 95.00% CI	低于阈值?	概述	经调整的 P 值
DI 水相对于无辅因子+ α -淀粉酶	0.135	0.08803 至 0.1820	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.05%辅因子+ α -淀粉酶	0.1415	0.09453 至 0.1885	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.1%辅因子+ α -淀粉酶	0.1199	0.07290 至 0.1668	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.2%辅因子+ α -淀粉酶	0.1505	0.1035 至 0.1975	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.3%辅因子+ α -淀粉酶	0.1353	0.08828 至 0.1822	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.4%辅因子+ α -淀粉酶	0.167	0.1200 至 0.2140	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.1584	0.1114 至 0.2053	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.166	0.1190 至 0.2130	是	****	<0.0001
DI 水相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.1681	0.1212 至 0.2151	是	****	<0.0001
DI 水相对于漂白剂	0.1639	0.1169 至 0.2108	是	****	<0.0001
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.05%辅因子+ α -淀粉酶	0.0065	-0.04047 至 0.05347	否	ns	>0.9999
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.1%辅因子+ α -淀粉酶	-0.01513	-0.06210 至 0.03185	否	ns	0.9919
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.2%辅因子+ α -淀粉酶	0.0155	-0.03147 至 0.06247	否	ns	0.9902
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.3%辅因子+ α -淀粉酶	0.00025	-0.04672 至 0.04722	否	ns	>0.9999
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.4%辅因子+ α -淀粉酶	0.032	-0.01497 至 0.07897	否	ns	0.4711
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.02338	-0.02360 至 0.07035	否	ns	0.8548
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.031	-0.01597 至 0.07797	否	ns	0.5192
无辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.03313	-0.01385 至 0.08010	否	ns	0.4187
无辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.02888	-0.01810 至 0.07585	否	ns	0.6227
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.1%辅因子+ α -淀粉酶	-0.02163	-0.06860 至 0.02535	否	ns	0.906
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.2%辅因子+ α -淀粉酶	0.009	-0.03797 至 0.05597	否	ns	>0.9999
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.3%辅因子+ α -淀粉酶	-0.00625	-0.05322 至 0.04072	否	ns	>0.9999
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.4%辅	0.0255	-0.02147 至	否	ns	0.7758

[0434]

因子+ α -淀粉酶		0.07247			
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.01688	-0.03010 至 0.06385	否	ns	0.9816
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.0245	-0.02247 至 0.07147	否	ns	0.8152
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.02663	-0.02035 至 0.07360	否	ns	0.7277
0.05%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.02238	-0.02460 至 0.06935	否	ns	0.8857
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.2%辅因子+ α -淀粉酶	0.03063	-0.01635 至 0.07760	否	ns	0.5374
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.3%辅因子+ α -淀粉酶	0.01538	-0.03160 至 0.06235	否	ns	0.9908
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.4%辅因子+ α -淀粉酶	0.04713	0.0001542 至 0.09410	是	*	0.0485
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.0385	-0.008471 至 0.08547	否	ns	0.2109
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.04613	-0.0008458 至 0.09310	否	ns	0.0587
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.04825	0.001279 至 0.09522	是	*	0.0389
0.1%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.044	-0.002971 至 0.09097	否	ns	0.0866
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.3%辅因子+ α -淀粉酶	-0.01525	-0.06222 至 0.03172	否	ns	0.9914
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.4%辅因子+ α -淀粉酶	0.0165	-0.03047 至 0.06347	否	ns	0.9844
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.007875	-0.03910 至 0.05485	否	ns	>0.9999
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.0155	-0.03147 至 0.06247	否	ns	0.9902
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.01763	-0.02935 至 0.06460	否	ns	0.9749
0.2%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.01338	-0.03360 至 0.06035	否	ns	0.997
0.3%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.4%辅因子+ α -淀粉酶	0.03175	-0.01522 至 0.07872	否	ns	0.4831
0.3%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	0.02313	-0.02385 至 0.07010	否	ns	0.863
0.3%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.03075	-0.01622 至 0.07772	否	ns	0.5313
0.3%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.03288	-0.01410 至 0.07985	否	ns	0.4302
0.3%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.02863	-0.01835 至	否	ns	0.6347

[0435]

		0.07560			
0.4%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.5%辅因子+ α -淀粉酶	-0.008625	-0.05560 至 0.03835	否	ns	>0.9999
0.4%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	-0.001	-0.04797 至 0.04597	否	ns	>0.9999
0.4%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.001125	-0.04585 至 0.04810	否	ns	>0.9999
0.4%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	-0.003125	-0.05010 至 0.04385	否	ns	>0.9999
0.5%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.6%辅因子+ α -淀粉酶	0.007625	-0.03935 至 0.05460	否	ns	>0.9999
0.5%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.00975	-0.03722 至 0.05672	否	ns	0.9998
0.5%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	0.0055	-0.04147 至 0.05247	否	ns	>0.9999
0.6%辅因子+ α -淀粉酶相对于 0.8%辅因子+ α -淀粉酶	0.002125	-0.04485 至 0.04910	否	ns	>0.9999
0.6%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	-0.002125	-0.04910 至 0.04485	否	ns	>0.9999
0.8%辅因子+ α -淀粉酶相对于漂白剂	-0.00425	-0.05122 至 0.04272	否	ns	>0.9999

[0436] 生物膜密度的降低指示酶对生物膜的去除。结果表明,从0.4%至0.8%的CaCl₂浓度持续去除生物膜。参见图11A。图11B是定量每种测试的组合物在10min内去除的生物膜百分比的图表。漂白剂用作图11B中的阳性对照。

[0437] 实施例7. 眼用防腐剂

[0438] 在其中组合物以单独的无菌包装递送的配置中,可以使用无菌过滤和包装来避免添加防腐剂。在其中组合物以多剂量包装递送的情况下,可以存在防腐剂。本实施例描述了被测试并发现不抑制酶有效性的一般防腐剂:

[0439] 一般方法:

[0440] 使用补充有酵母提取物、葡萄糖和柠檬酸钠的TSB肉汤在96孔(Corning Falcon)细胞培养物处理的板中生长金黄色葡萄球菌生物膜,以诱导生物膜形成,并孵育持续18小时。

[0441] 去除非粘附细胞并用不同溶液处理生物膜以测试分解金黄色葡萄球菌生物膜的能力。使用~30U/mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)以10mg/mL生产具有 α -淀粉酶的溶液。

[0442] 在孵育10分钟之后,去除非粘附细胞,并将残余的生物膜用结晶紫染色。使用Byonoy Absorbance 96板读取器在600nm处测量剩余生物膜的密度。

[0443] 图12A是图示出 α -淀粉酶、BAK+ α -淀粉酶、过硼酸钠+ α -淀粉酶的实验结果以及它们与阴性对照(DI水)和阳性对照(漂白剂)的比較的图表。图12A中测试的防腐剂是:防腐剂1:Purite/OcuPure(稳定化的氧氯复合物)-酶有效性没有降低;防腐剂2:Polyquad(聚季铵盐-1)0.001%-酶有效性没有降低。

[0444] 图12B中测试的防腐剂是:防腐剂1:BAK(苯扎氯铵)0.01%-酶有效性没有降低;和防腐剂2:GenAqua/Dequest(过硼酸钠)-酶有效性没有降低。

[0445] 指定浓度的上文提及的测试的组合物被发现不抑制酶活性。

[0446] 所测试的用于治疗干眼症状的另一种防腐剂是0.01%次氯酸。稀次氯酸以百分比范围从0.01%至0.02%用于眼睑清洁剂中。在我们的研究中,0.01%次氯酸不抑制酶对生物膜的去除。采用在处理前立即、30分钟或1小时混合的0.01%次氯酸和 α -淀粉酶加上辅因子的生物膜减少之间没有统计学差异。虽然0.01%次氯酸确实略微减少了生物膜,但当与 α -淀粉酶和辅因子组合时,没有增加的生物膜去除的额外益处。参见图13。

[0447] 实施例8.眼用缓和剂

[0448] 该方案研究了 α -淀粉酶(一种有效抑制和减少金黄色葡萄球菌生物膜的酶)与眼用缓和剂组合的效力。这些缓和剂用于滴眼液中以缓解干眼症的症状,并可能潜在地延长 α -淀粉酶与眼睛上的生物膜的接触。一些缓和剂也可以对酶具有稳定作用。该研究评估了多种缓和剂对 α -淀粉酶活性的影响。

[0449] 考虑了以下缓和剂:

[0450] (a) 纤维素衍生物: (1) 0.2%至2.5%羧甲基纤维素钠; (2) 0.2%至2.5%羟乙基纤维素; (3) 0.2%至2.5%羟丙甲纤维素; (4) 0.2%至2.5%甲基纤维素。

[0451] (b) 当与本节中的另一种聚合物缓和剂一起使用时的0.1%葡聚糖70

[0452] (c) 0.01%明胶。

[0453] (d) 液体多元醇: (1) 0.2%至1%甘油; (2) 0.2%至1%聚乙二醇300; (3) 0.2%至1%聚乙二醇400; (4) 0.2%至1%聚山梨醇酯80; (5) 0.2%至1%丙二醇。

[0454] (e) 0.1%至4%聚乙烯醇。

[0455] (f) 0.1%至2%聚维酮。

[0456] 用~30U/mg的来自米曲霉的10mg/mL α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)以及0.4%CaCl₂和0.5% NaCl制备所有测试的溶液,并用上文实施例中描述的方案进行测试。本研究中测试的浓度如下:

表18	
PEG 400	1%
CMC	2.5%
甘油	1%
PVP	2%
丙二醇	1%
PVA-聚乙烯醇	4%
葡聚糖70, 羟丙甲纤维素	0.1%, 0.3%

[0457] 图14A是图示出多种所测试的缓和剂的分析结果的图表,所述缓和剂包括聚乙二醇400(PEG 400)1%、羧甲基纤维素钠(CMC)2.5%、甘油1%、聚维酮(PVP)2%、丙二醇1%、聚乙烯醇(PVA)4%、葡聚糖700.1%+羟丙甲纤维素0.3%。图14B是图示出多种所测试的缓和剂的分析结果的图表,所述缓和剂包括聚乙烯醇(PVA)、PVA+ α -淀粉酶、羧甲基纤维素钠(CMC)以及羧甲基纤维素钠(CMC)+ α -淀粉酶。如图14A和图14B中示出的,CMC和PVA示出对生物膜的去除的有益效果。基于这些结果,假设PVA可以有助于在制剂的某些配置中使 α -淀粉

酶稳定化。

[0459] 图14C是图示出在36天之后用在4% PVA中稳定化的 α -淀粉酶测试的结果的图表。发现PVA和CMC独立地帮助生物膜的去除,并且还和 α -淀粉酶一起作用以去除生物膜。对于过滤灭菌和缺乏对细菌生长的敏感性,PVA相比于CMC是优选的。PVA提供5.8的pH,这对于酶活化是理想的。文献表明,5-6之间的pH对于来自米曲霉的 α -淀粉酶是理想的。

[0460] PVA溶液是比CMC溶液更好的灭菌过滤候选物。使用2 μ m无菌注射器式过滤器将4% PVA溶液过滤灭菌,并在重复生物膜去除测试之前保持冷藏持续36天。在第36天,4% PVA溶液的表现优于具有辅因子的 α -淀粉酶的新鲜溶液。这指示PVA可以在4 $^{\circ}$ C冷藏的水溶液中使 α -淀粉酶稳定化持续至少36天。

[0461] 实施例9. 抗生素测试

[0462] 该方案研究了来自米曲霉的 α -淀粉酶与通常开处方的眼用抗生素组合的效力,以观察这是否有助于去除生物膜。通常,据信抗生素不会自行穿透生物膜。生物膜还可以允许细菌变得抗生素抗性,因为细菌可以在生物膜内转移DNA。

[0463] 图15是图示出用于金黄色葡萄球菌生物膜减少的眼用抗生素比较的结果的图表。用0.4%CaCl₂和0.56% NaCl作为辅因子以30U/mg配制的10mg/mL来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)与庆大霉素和氧氟沙星用于制剂中。两种抗生素也单独进行了测试。

[0464] 图15中示出的研究结果指示,来自米曲霉的 α -淀粉酶去除生物膜的能力不被局部抗生素抑制或增强。眼用抗生素和 α -淀粉酶的组合可以帮助患有其中细菌被包封在生物膜中的慢性感染的患者。

[0465] 实施例10. 稳定糖

[0466] 先前已经报告使用糖,尤其是蔗糖和海藻糖来增加来自米曲霉的 α -淀粉酶在水溶液中的热稳定性。海藻糖因其对眼睛的上皮细胞的生物保护性质而用于干眼症患者的滴眼液中。在商业滴眼液中已经使用了多达200mM(6.8%)的海藻糖的溶液。该实验以具有和不具有缓和剂羧甲基纤维素和聚乙烯醇的10%溶液测试蔗糖和海藻糖以观察它们是否影响酶减少生物膜的能力。这些制剂对生物膜减少的这种影响在图16上示出。

[0467] 这些数据指示,两种稳定糖对酶减少生物膜的能力没有任何统计学上显著的($\alpha=0.05$)影响。当稳定糖与羧甲基纤维素组合时,酶减少生物膜的能力受到限制。这指示羧甲基纤维素不是与稳定糖海藻糖或蔗糖组合的理想缓和剂。研究指示,稳定糖与PVA组合仍然具有强的去除生物膜的能力。由于海藻糖是用于在眼睛周围使用的理想稳定糖,PVA和海藻糖的组合将在下文的缓冲剂研究中进行检查。海藻糖也作为独立变量在下文中进行了研究。

[0468] 海藻糖

[0469] 用3%、6.8%和8%海藻糖溶液测试 α -淀粉酶分解生物膜的能力。在这些浓度,酶活性没有显著差异($\alpha=0.05$)。6.8%海藻糖是可商购的滴眼液中报告的最高浓度,并且被认为是良好耐受的。可以考虑较高浓度的海藻糖,因为溶液被施加至完整的皮肤而不是眼睛本身。参见图17。

[0470] 实施例11. pH

[0471] 文献示出,来自米曲霉的 α -淀粉酶的最佳活性在5-6的pH之间。泪液具有6.5至7.6

的pH,正常皮肤具有4.7至5.75的pH,并且油性皮肤具有5.7-7的pH。酶促组合物的施加将在眼睑上,而不是在眼睛中。然而,由于接近眼睛,将在最终组合物中使用5.8-6的pH以平衡酶促活性和用户舒适度。在测试中,本公开内容确定4% PVA溶液具有5.8的pH并且2% PVA溶液具有5.9的pH。

[0472] 预期以下缓冲剂用于pH稳定化:

表19			
缓冲系统	组分	pH范围	所使用的浓度范围
柠檬酸盐缓冲剂	柠檬酸($C_6H_8O_7$)	3.0-6.2	10-100 mM
	柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7$)		
磷酸盐缓冲剂	磷酸一钠(H_2NaO_4P)	5.8-8.0	0.1-160 mM
	磷酸氢二钠(HNa_2O_4P)		
Tris-HCl缓冲剂	三(羟甲基)氨基甲烷($C_4H_{11}NO_3$)	7.2-9.0	10-100 mM
	盐酸(HCl)		
硼酸盐缓冲剂	硼酸(BH_3O_3)	7.6-9.1	10-100 mM
	六硼酸钠		

[0474] 进一步分析磷酸盐缓冲剂和柠檬酸盐缓冲剂用于在组合物使用以维持pH为5.8,因为它们是该pH范围内的理想候选物。当用浓度为0.4%的 $CaCl_2$ 测试时,钙与磷酸盐反应并沉淀。如果 $CaCl_2$ 被用作辅因子,则该反应消除了作为候选物的磷酸盐缓冲剂。这表明最佳的眼用缓冲剂候选物作为柠檬酸盐缓冲剂。基于文献,制备溶液并测试其在50mM和100mM的柠檬酸盐缓冲剂浓度去除生物膜的能力。用作酶的热稳定剂的海藻糖以200mM添加,因为文献中报告了其对于在滴眼液中使用是良好耐受的。当柠檬酸盐缓冲剂被直接添加到4% PVA溶液中时,柠檬酸钠形成凝胶并且不会溶解。为了测试具有PVA的柠檬酸盐缓冲剂,将柠檬酸钠和柠檬酸溶解在DI水中,并以50:50的比与4% PVA溶液混合,以制备2% PVA溶液用于测试。使用NaOH和HCl使所有柠檬酸盐缓冲剂溶液达到pH为5.8。图18A和图18B是图示出在具有糖稳定剂和缓和剂的情况下测试50mM-100mM的柠檬酸盐缓冲剂的结果的图表。

[0475] 研究指示,柠檬酸盐缓冲剂与PVA相互作用以抑制组合物在50mM和100mM两者浓度的生物膜去除功能。单独与NaOH和HCl一起使用以使组合物pH达到5.8的柠檬酸盐缓冲剂增强了酶的性能。参见图18A和图18B。酶的最佳性能是在没有柠檬酸盐缓冲剂、在具有或不具有海藻糖的2% PVA或4% PVA的情况下。

[0476] 实施例12. 透明质酸

[0477] 透明质酸和茶树油是洗面奶和眼睑清洁剂中常见的添加剂。在该研究中,将0.3%透明质酸和5%茶树油添加到具有和不具有海藻糖的 α -淀粉酶中,以定量对生物膜去除的影响。图19是图示出测试透明质酸和茶树油对包含 α -淀粉酶的组合物影响的的结果的图表。如图19中示出的,0.3%透明质酸略微增加了酶去除生物膜的能力。茶树油没有显著增强或降低酶的性能。这指示,透明质酸在用于生物膜去除的组合物中可能具有有益效果。在滴眼液制剂中,透明质酸通常与海藻糖组合以获得它们的水合的组合益处。

[0478] 实施例13. 用本公开内容的组合物治疗人类受试者

[0479] 所有图像均来自在指定时间在北卡罗来纳州Raleigh的Watson Dry Eye Center的同一受试者。回顾性地审查图像,以确定眼睑上的生物膜的视觉迹象是否被来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物去除。应注意,从2018年5月23日-2020年11月20日,患者每天两次用在盐水中仅0.01%次氯酸清洗他的眼睛。此后,患者使用来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的新颖组合物。第一组合物由来自米曲霉的粉末状 α -淀粉酶和在盐水中的液体0.01%次氯酸制备,紧接着然后用棉签施加到眼睑。第二组合物包括 Ca^{2+} 并且具有优越的性能。剂量信息写在下文的时间轴上。

[0480] 治疗时间轴-在使用包含以下的组合物之前

[0481] 受试者于2018年5月23日进行了用于治疗干眼症症状和复发性眼部炎症的首次治疗环节。在这一天之前,受试者接受了Azasite和口服抗生素(100mg多西环素/天)的组合,但似乎没有缓解症状。图1A和图1B是在2018年5月23日(时间0)拍摄的描绘罹患睑板腺阻塞、睫毛根部处有光泽的生物膜、睫毛上有光泽的生物膜以及睫毛生长方向错误的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者用Blephex和强脉冲光疗法进行治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。

[0482] 受试者于2018年12月4日接受了后续治疗环节。图2A和图2B是描绘在拍摄图1A和图1B的照片之后大约6个月(时间1),于2018年12月4日受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者接受每日剂量的Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。在该环节中报告症状的最小改善。

[0483] 受试者于2019年6月18日接受了后续治疗环节,每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。图3A和图3B是描绘在拍摄图2A和图2B的照片之后大约6个月(时间2)的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者被开处方每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。如图3A中示出的,生物膜在睫毛的根部处继续生长。

[0484] 受试者于2019年10月15日接受了后续治疗环节,每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))。图4A和图4B是描绘在拍摄图3A和图3B的照片之后大约4个月(时间3)的受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄照片之后,受试者接受1次Blephex和强脉冲光疗法的治疗以用于去除生物膜来治疗炎症。随后,受试者继续用每日使用Avenova(0.01%次氯酸(HOCl))治疗。如图4A和图4B中示出的,有光泽的生物膜保留在睫毛处和眼睑内部,表明酸处理本身不足以去除生物膜。

[0485] 在2020年10月,用1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸制备第一组合物。图5A和图5B是描绘大约在2020年11月2日在几次施加1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸之后受试者的眼睛的两个不同区域的照片。该时间框架大约是在拍摄图4A和图4B的照片之后约1个月(时间4)。在1个月的治疗时间框架内,生物膜在几次低剂量施加之后仍然可见地存在,如图5A和图5B中示出的。

[0486] 受试者在时间4和2021年5月26日(时间5)之间接受了每日剂量的包含1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物,其中受试者经受组合物的常规每日使用。图6A和图6B是描绘在拍摄图5A和图5B的照片之后大约6个月受试者的眼睛的两个不同区域的照片。在拍摄图5A和图5B的照片之后,受试者接受包含1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶

和0.01%次氯酸的组合物的常规每日使用。如图6A和图6B中示出的,生物膜被明显消除,睫毛没有所有生物膜,眼睑中的炎症和发红减少,患者报告干眼症症状的重大改善。

[0487] 在2021年10月5日,大约在常规每日使用包含1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物5个月之后,受试者报告显著改善的症状,并且在Raleigh NC的Watson Dry Eye Center拍摄了新的眼睛图像。如图7A和图7B中示出的,生物膜生长被阻止并且眼睑组织不再发炎。

[0488] 继续监测受试者。在2022年2月3日,在常规每日使用包含1mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸的组合物之后大约4个月(时间7),在受试者的眼睛上的生物膜生长被阻止,参见图8A和图8B。此外,在该时间框架内未观察到炎症。在时间7和大约6个月的时间段(2022年8月4日)之间,对受试者进行了两次/周使用的较高浓度剂量(即10mg/ml的来自米曲霉的 α -淀粉酶和0.01%次氯酸)的耐受性测试。对于较高剂量的10mg/ml α -淀粉酶未观察到不良作用。参见图9A和图9B。

[0489] 实施例14. 用本公开内容的组合物治疗人类受试者

[0490] 在离子水中制备包含大约3% α -淀粉酶、0.06%氯化钠、0.02%次氯酸溶液的组合物,并每两周一次直接施加至呈现升高水平的眼睑生物膜的患者眼睑缘。在6个月的进程内的观察结果指示眼睑缘上的生物膜的显著减少,泪液产生的增加,以及对眼表面应激的迹象减少。试验研究指示,在离子水中包含大约3% α -淀粉酶、1%溶菌酶、0.06%氯化钠和0.02%次氯酸溶液的组合物有类似的改善。试验研究中的组合物在每次使用之前新鲜制备。进一步的组合物开发是研究上文提及的组分与在整个本公开内容中描述的防腐剂、收敛剂、缓和剂、润肤剂、高渗剂和血管收缩剂的组合,以改善组合物的长期稳定性。图10A和图10B是描绘在用包含在0.01%次氯酸中的10mg/ml α -淀粉酶和 Ca^{2+} 的组合物治疗之前和之后眼睛的区域的直接比较的照片。

[0491] 实施例15. 制剂

[0492] 本方案概述了用于测试来自米曲霉的 α -淀粉酶与0.01%次氯酸的组合物的相容性和去除来自金黄色葡萄球菌的生物膜的能力的程序。0.01%次氯酸意图阻止微生物生长,而不是延长 α -淀粉酶的保质期。本实验还将通过在制备组合物之后的不同时间点使用 α -淀粉酶和次氯酸的组合物来测试次氯酸对酶的影响。将在制备组合物之后立即以及在30分钟和1小时时间点测试组合物去除生物膜的能力。该测试将指示在生物膜施加之前将含水次氯酸与干燥 α -淀粉酶组合是否有利。

[0493] 制剂

[0494] 本实验使用现成的眼睑清洁剂Avenova(在盐水中的0.01%次氯酸)。在次氯酸溶液中将添加0.4%氯化钙,以确保所有测试的溶液存在钙离子。

[0495] 制备10ml的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶溶液。

[0496] 向烧瓶中的10ml无菌DI水中添加100mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。

[0497] 将40mg的氯化钙和56mg的氯化钠溶解到溶液中

[0498] 在试验前1小时:

[0499] 制备5ml的具有0.01%次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶溶液

[0500] 向烧瓶中添加5mL的Avenova(0.01%次氯酸)。

- [0501] 将20mg的氯化钙溶解到溶液中。
- [0502] 添加50mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。
- [0503] 在试验前30分钟:
- [0504] 制备5ml的具有0.01%次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶溶液
- [0505] 向烧瓶中添加5mL的Avenova(0.01%次氯酸)。
- [0506] 将20mg的氯化钙溶解到溶液中。
- [0507] 添加50mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。
- [0508] 紧接在铺板之前:
- [0509] 制备5ml的具有0.01%次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶溶液
- [0510] 向烧瓶中添加5mL的Avenova(0.01%次氯酸)。
- [0511] 将20mg的氯化钙溶解到溶液中。
- [0512] 添加50mg的来自米曲霉的 α -淀粉酶(Sigma-Aldrich目录#10065)。混合直至 α -淀粉酶溶解并均匀分布。
- [0513] 测试组合物
- [0514] 小心地倾斜板,并通过将移液管尖端插入孔的底角中,从孔中用移液管移除所有液体,以去除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。
- [0515] 当使用8通道移液管处理第一行时,启动计时器持续10分钟。每一行应每30秒处理一次,确保温和地释放孔的角中的组合物,以免机械地干扰生物膜。
- [0516] 对于第1行:向第1行中添加50 μ l DI水。
- [0517] 对于第2行:向第2行中添加50 μ l的具有辅因子的10mg/ml α -淀粉酶。
- [0518] 对于第3行:向第3行中添加50 μ l的具有辅因子和次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶,放置持续30分钟。
- [0519] 对于第4行:向第4行中添加50 μ l的具有辅因子和次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶,放置持续1小时。
- [0520] 对于第5行:将5ml的10mg/ml α -淀粉酶溶液与次氯酸组合。向第5行中添加50 μ l的具有辅因子和次氯酸的10mg/ml α -淀粉酶。
- [0521] 对于第6行:向第7行中添加50 μ l的0.018%次氯酸溶液。
- [0522] 对于第7行:向第7行中添加50 μ l的7.5%漂白剂(次氯酸钠)溶液。
- [0523] 将板在37℃孵育持续剩余的10分钟。
- [0524] 对生物膜减少的测试
- [0525] 在10min之后,应从第1行开始,每30秒逐行移除所有流体。必须在轻轻移液的情况下移除流体,其中板成一定角度,移液管位于角落,以移除非粘附细胞,而不干扰生长在孔的底部上的生物膜。添加50 μ l的0.1%结晶紫(CV)以对所有孔的粘附细胞进行染色。通过将板浸入DI水浴中小心地冲洗所有孔,以去除所有剩余的结晶紫。干燥孔板并使用板读取器在600nm处测量生物膜的光密度。一旦进行了所有测量,应将孔板转移至漂白剂溶液中进行消毒,并在生物废物箱中处置。
- [0526] 结果

[0527] 结果示出,具有辅因子的 α -淀粉酶和具有辅因子的 α -淀粉酶与任一次氯酸喷雾剂组合跨越所有时间点对生物膜减少没有统计学显著性。这指示0.01%次氯酸不抑制酶对生物膜的去除。虽然0.01%次氯酸确实略微减少了生物膜,但当与 α -淀粉酶和辅因子组合时,没有增加的生物膜去除的额外益处。参见图13。

[0528] 实施例16.酶促面部和眼睑清洁剂

[0529] 本文描述的多种组合物已经被开发为酶促面部和/或眼睑护理(enzymatic facial and/or eyelid treatment)。

[0530] 酶促面部和眼睑清洁装置利用 α -淀粉酶来分解在眼睑上形成的生物膜的细胞外基质。生物膜是粘附到表面的微生物的结构化群落,被自产生的细胞外基质(ECM)包围。ECM主要包含多糖、蛋白质、核酸和脂质。该基质为生物膜提供结构稳定性,保护内部细菌免受外部因素的影响,并帮助生物膜粘附到表面。

[0531] 生物膜是微生物诸如细菌的聚集体,嵌入眼睑上自产生的蛋白质和多糖基质中。这些生物膜可以导致睑缘的炎症和感染,被称为睑缘炎,并且还可以通过破坏泪膜和引起泪液蒸发而导致干眼病。

[0532] 组合物中的 α -淀粉酶同种型起分解生物膜基质中多糖的酶的作用。通过这样做,它使生物膜的结构不稳定,使其更容易从眼睑上移除。随着ECM不稳定,生物膜变得更容易机械去除(例如,通过擦拭)。另外,生物膜内的细菌失去了它们的保护性防护罩(protective shield),使它们更容易受到抗微生物剂或身体免疫应答的影响。

[0533] 总之,来自米曲霉的同种型 α -淀粉酶靶向生物膜的细胞外基质的多糖组分,将其分解并促进生物膜从眼睑上移除。这在管理如睑缘炎和干眼病的状况方面可以是特别有帮助的,在所述状况中,生物膜导致病理。

[0534] 酶促组合物可以通过不同的递送机制,诸如无菌擦拭物、喷雾剂或单剂量或多剂量无菌涂药器使用。在一些情况下,组合物是清洁剂。组合物可以被包装为注入有来源于米曲霉的 α -淀粉酶粉末或 α -淀粉酶溶液的擦拭物、喷雾剂、垫或另一种合适的涂药器。

[0535] 16.1 无菌擦拭物

[0536] 本公开内容的组合物被包装为用所述组合物预饱和的无菌擦拭物。这些擦拭物被单独包装或成套包装。这样的擦拭物可以被进一步包装在容器中或作为与其他试剂一起的试剂盒的一部分。

[0537] 使用包装为无菌擦拭物的组合物的方法:受试者轻轻地闭上其眼睛并使用无菌擦拭物从内角到外角以例如水平笔画(horizontal stroke)清洁眼睑。受试者确保组合物优先地施加至其中生物膜可能积聚的睫毛根部。

[0538] 擦拭物被单独包装用于一次性使用,降低污染风险。擦拭物是便携式的并且便于旅行或外出使用。

[0539] 16.2 喷雾剂

[0540] 酶促组合物可以被配制为瓶内的溶液(例如喷雾剂或滴剂)。

[0541] 使用被包装为喷雾剂的组合物的方法:含有酶促组合物的喷雾瓶可以允许直接施加至眼睑或喷雾到干净的布或棉垫上用于施加。受试者可以闭上眼睛并将溶液直接轻轻喷雾到眼睑上。可选择地,受试者可以将溶液喷雾到干净的布或棉垫上。如果使用布或垫,则从内眼角到外眼角轻轻擦拭眼睑。

[0542] 喷雾瓶易于使用,并且允许快速施加。它们还适合于多种用途,无需与眼睑直接接触,这降低了污染风险。

[0543] 16.3单剂量或多剂量无菌容器:

[0544] 单剂量或多剂量无菌容器用于将酶促溶液受控递送到无菌涂药器诸如擦拭物或海绵上,并且然后施加至眼睑。涂药器可以附接到无菌容器或者单独使用。

[0545] 使用包装在单剂量或多剂量无菌容器中的组合物的方法:受试者闭上眼睛并使用涂药器以沿着睑缘和睫毛施加溶液。受试者小心地用水平笔画清洁眼睑,从内角移动到外角。涂药器支持溶液/凝胶的靶向施加,这对于那些需要更受控的施加或具有敏感性问题的可能是有益的。

[0546] 虽然如结合本发明的优选的实施方案详细描述,通过许多不同形式的实施方案满足了本发明,但是应当理解,本公开内容被认为是本发明的原理的示例,而不意图将本发明限制于本文所示和描述的特定实施方案。在不脱离本发明的精神的情况下,本领域技术人员可以做出许多变化。本发明的范围将由所附权利要求及其等效物来衡量。摘要和标题不应被解释为限制本发明的范围,因为它们的目的是使得适当的权威机构以及普通公众能够快速确定本发明的一般性质。在所附权利要求中,除非使用术语“手段(means)”,否则其中叙述的特征或要素都不应被解释为依据35 U.S.C. §112, ¶6的手段加功能限制(means-plus-function limitation)。

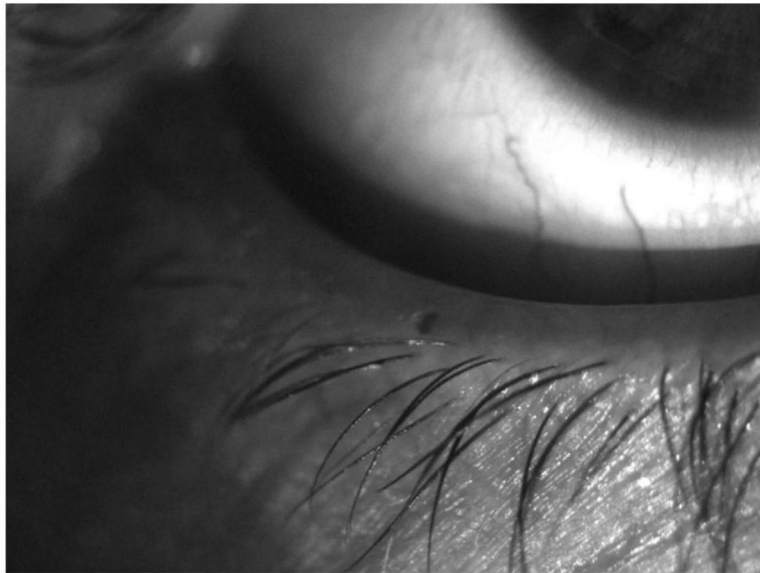


图1A

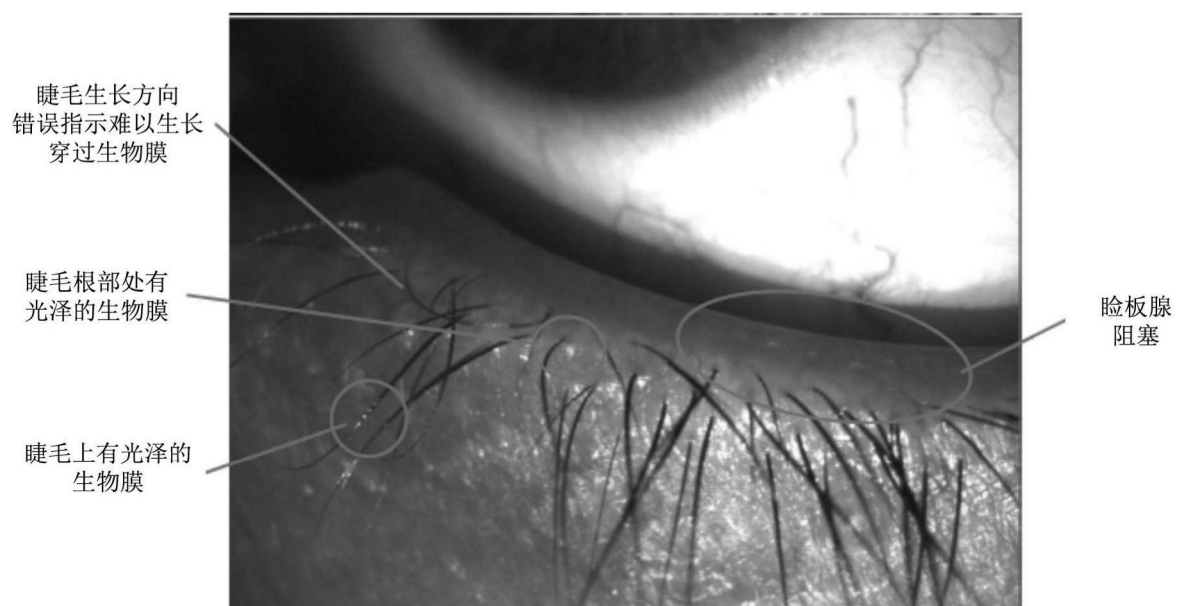
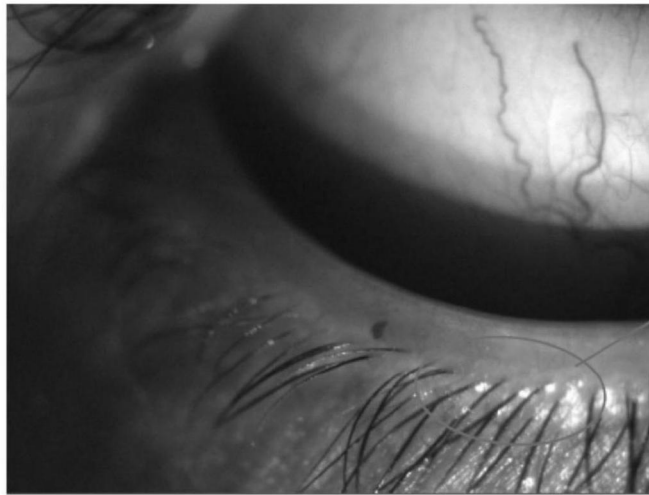


图1B

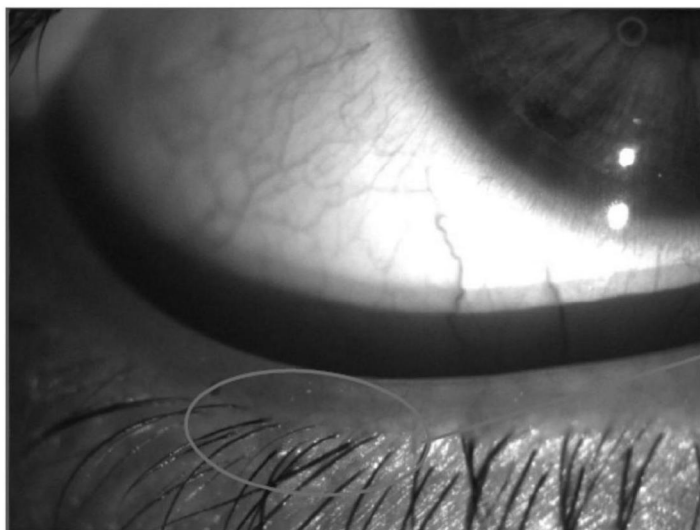


睫毛根部处有
光泽的生物膜
和火山标志

图2A



图2B



生物膜继续在
睫毛根部处
生长

图3A

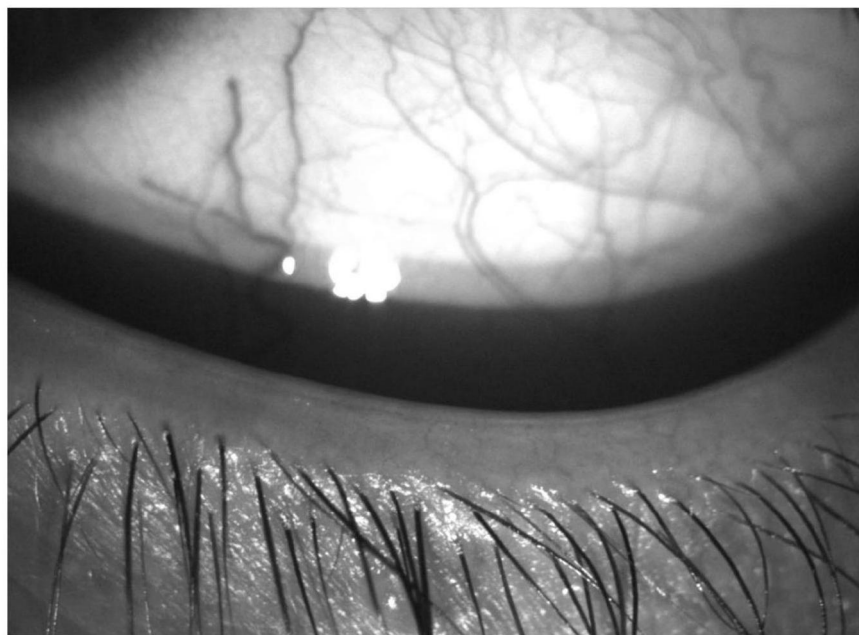


图3B

睫毛根部处有
光泽的生物膜



图4A



图4B



图5A



图5B



图6A

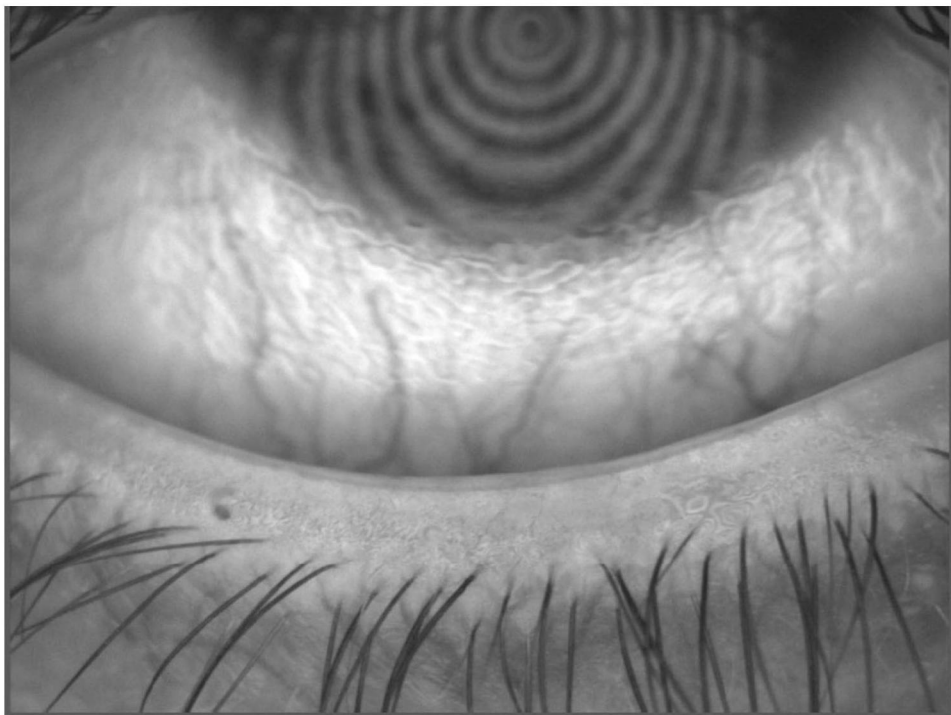


图6B



图7A

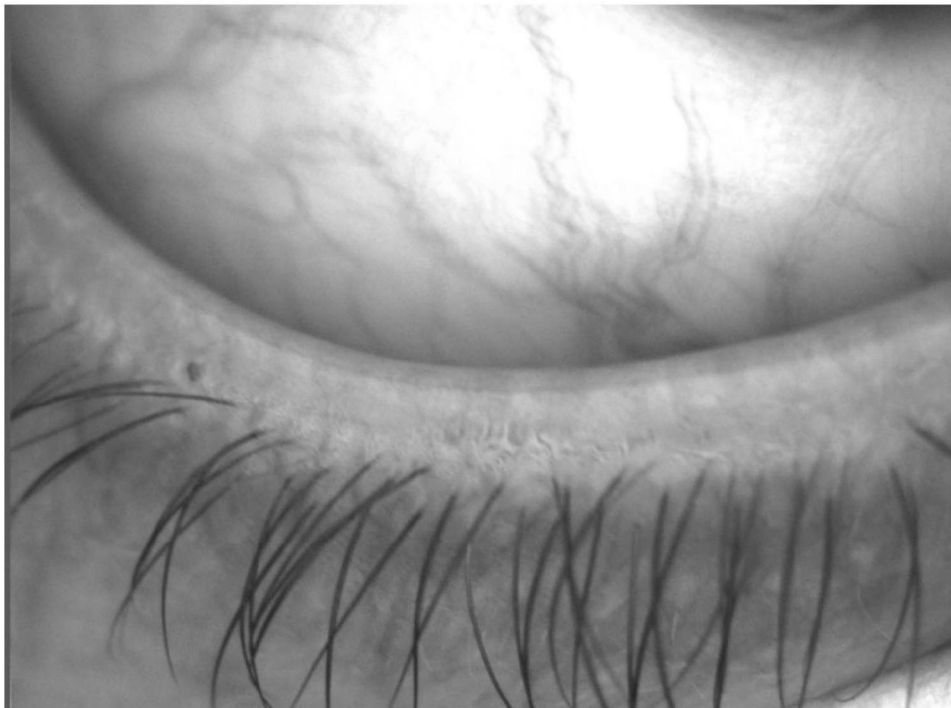


图7B

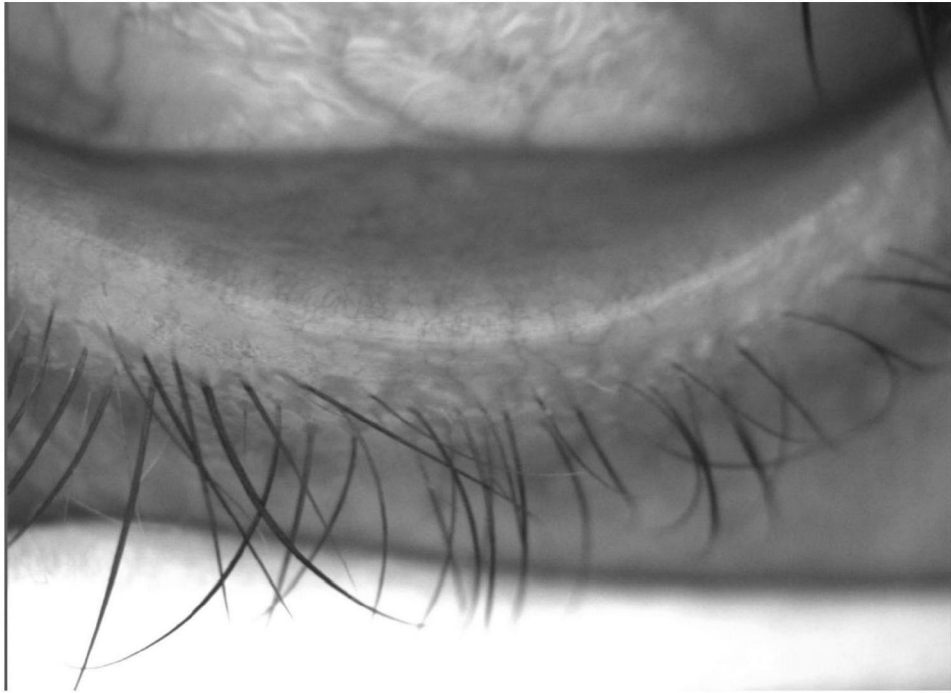


图8A



图8B



图9A



图9B

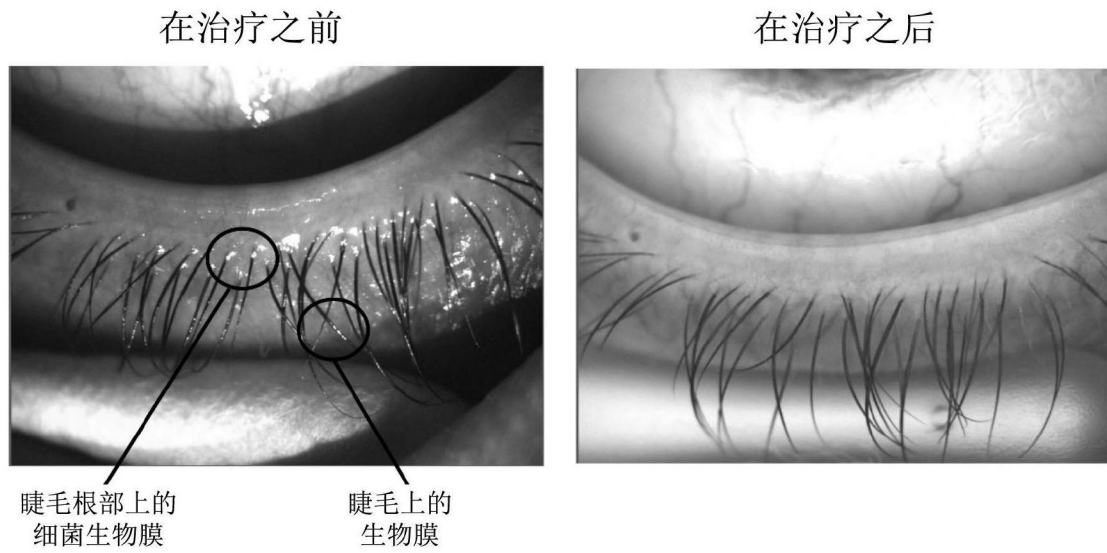


图10A

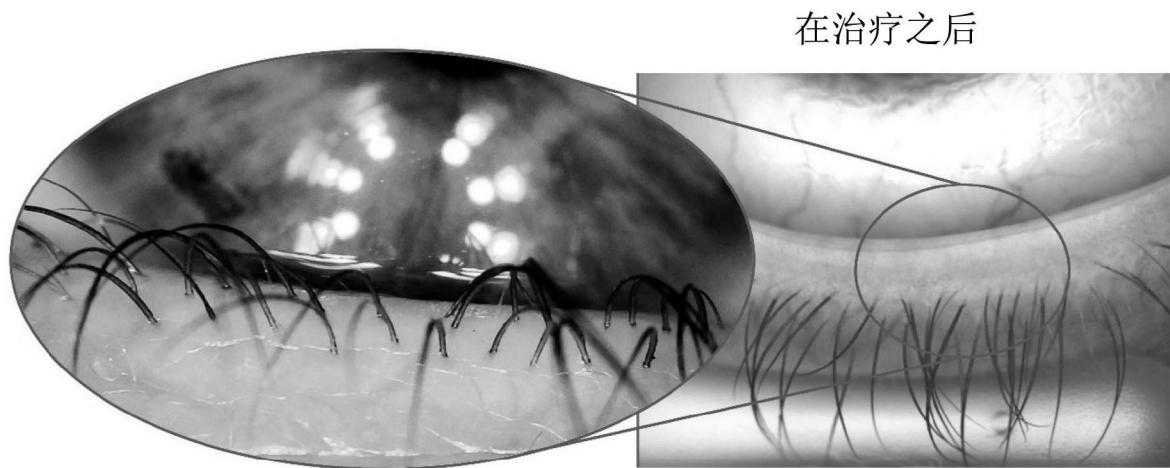


图10B

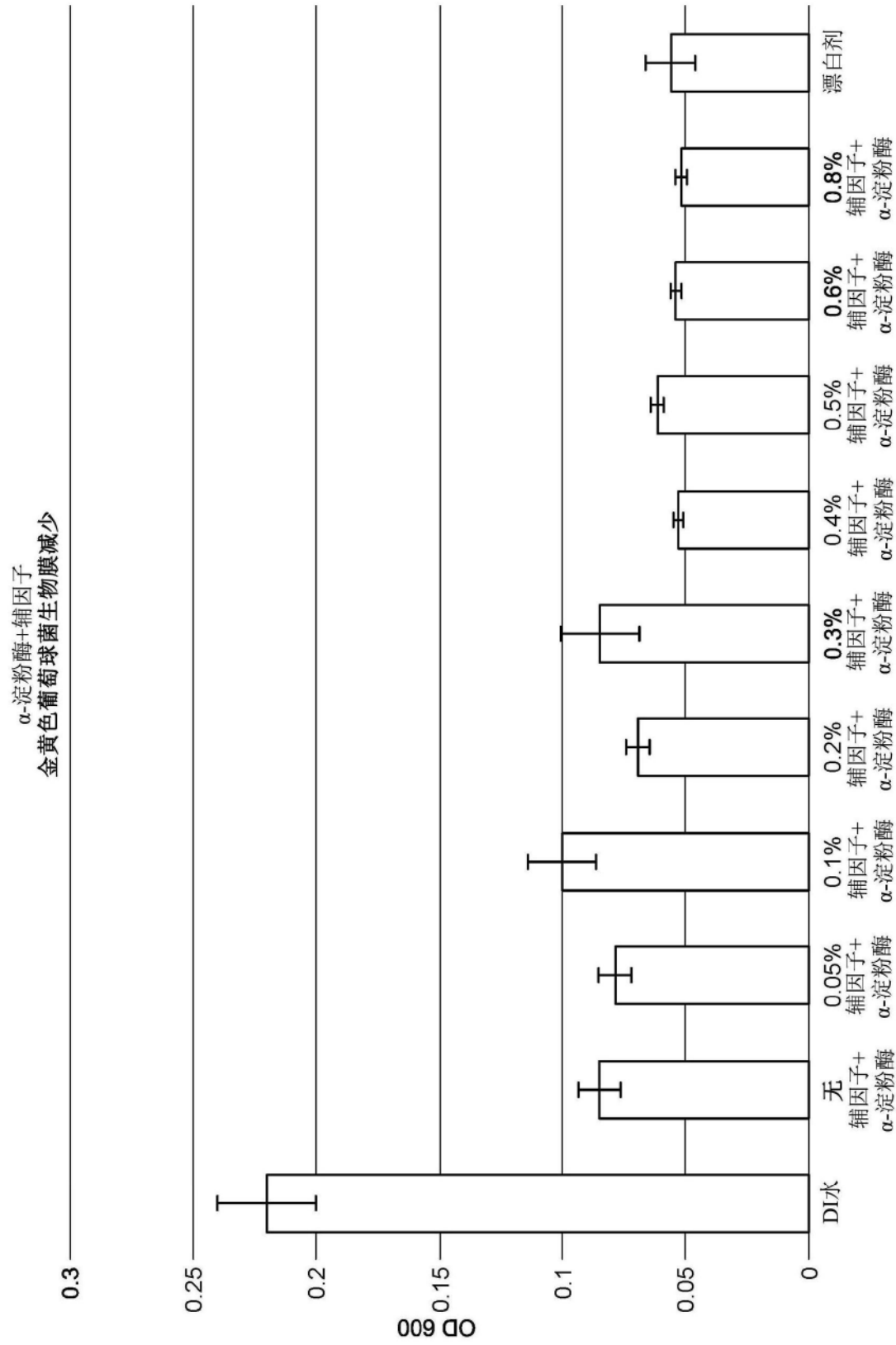


图11A

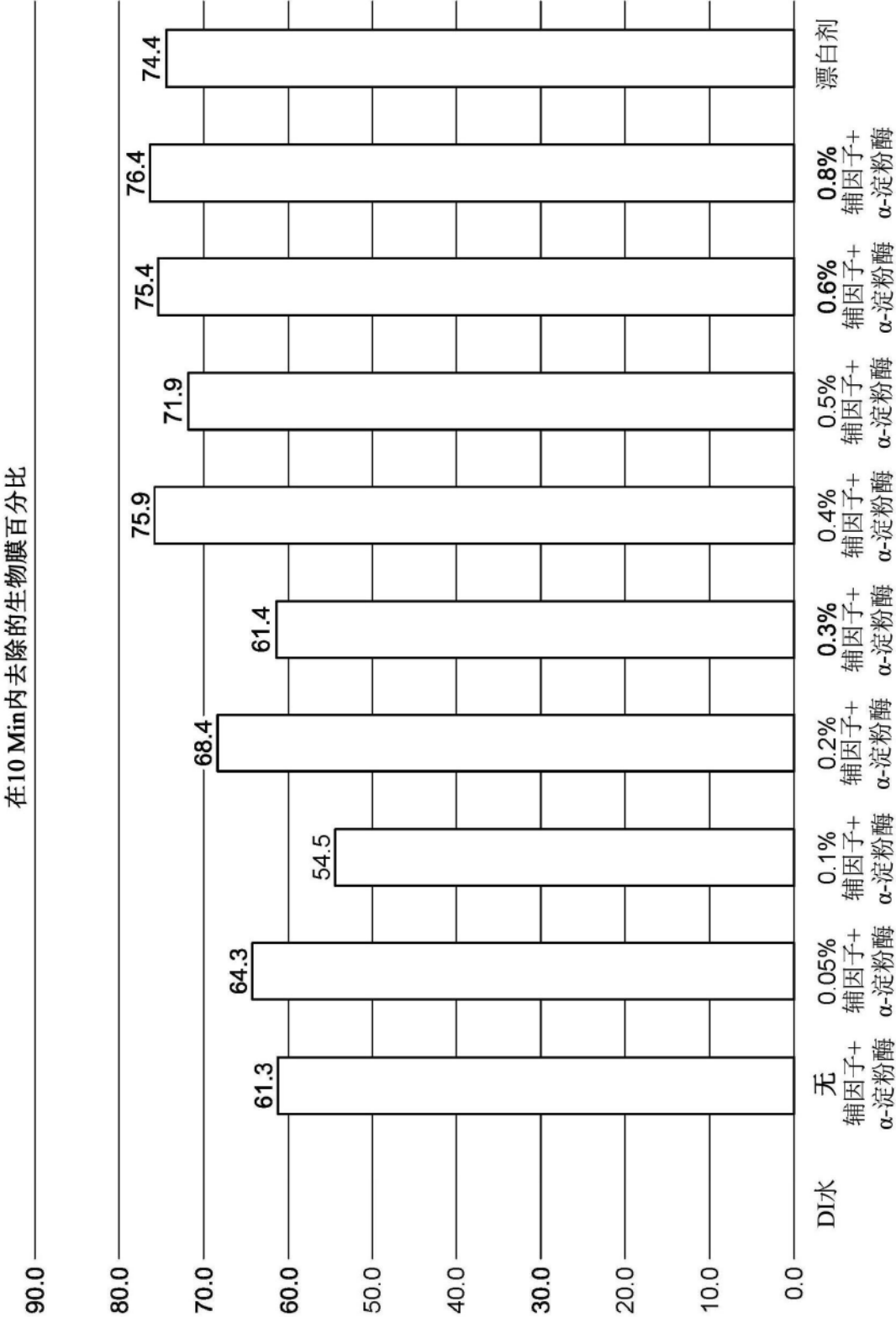


图11B

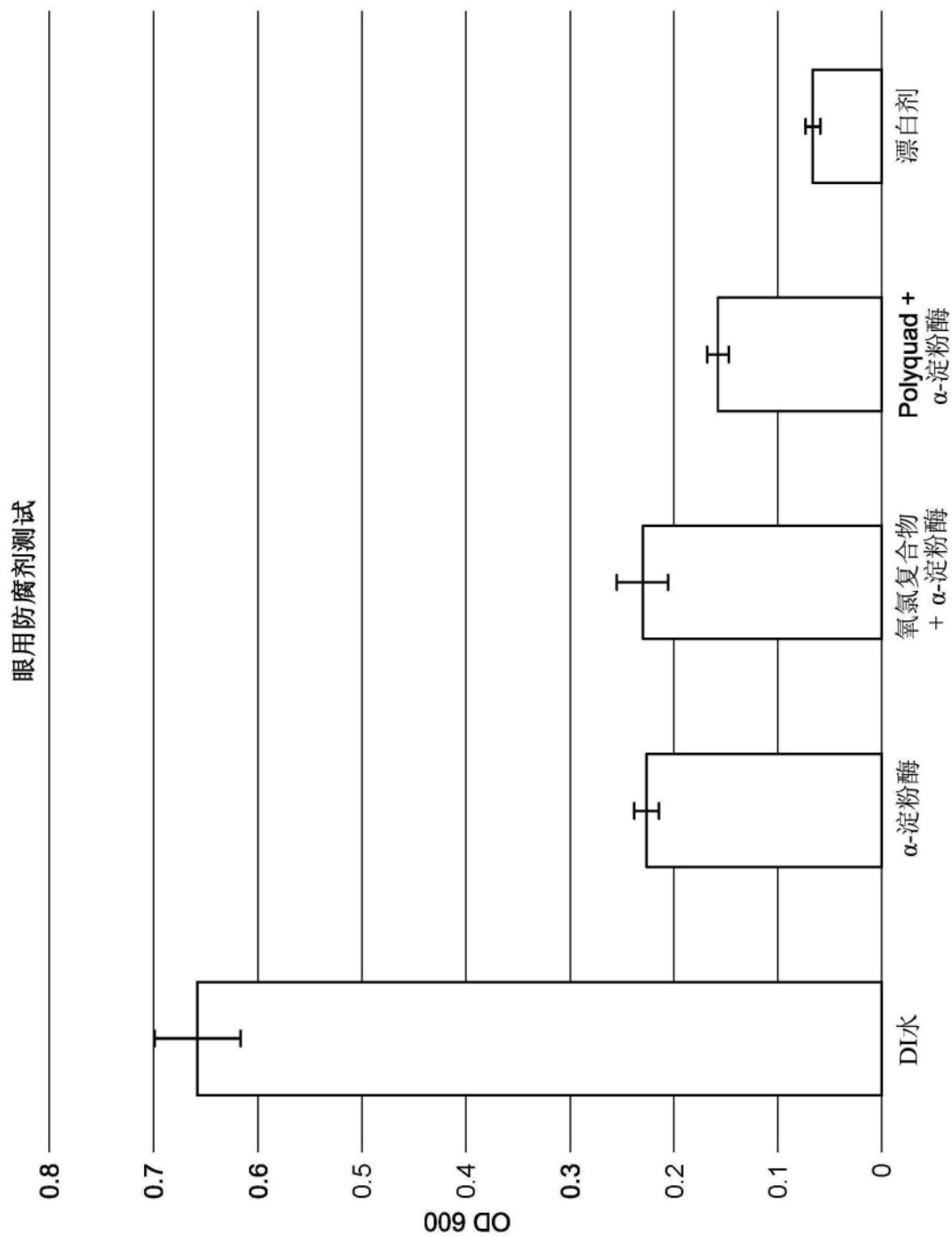


图12A

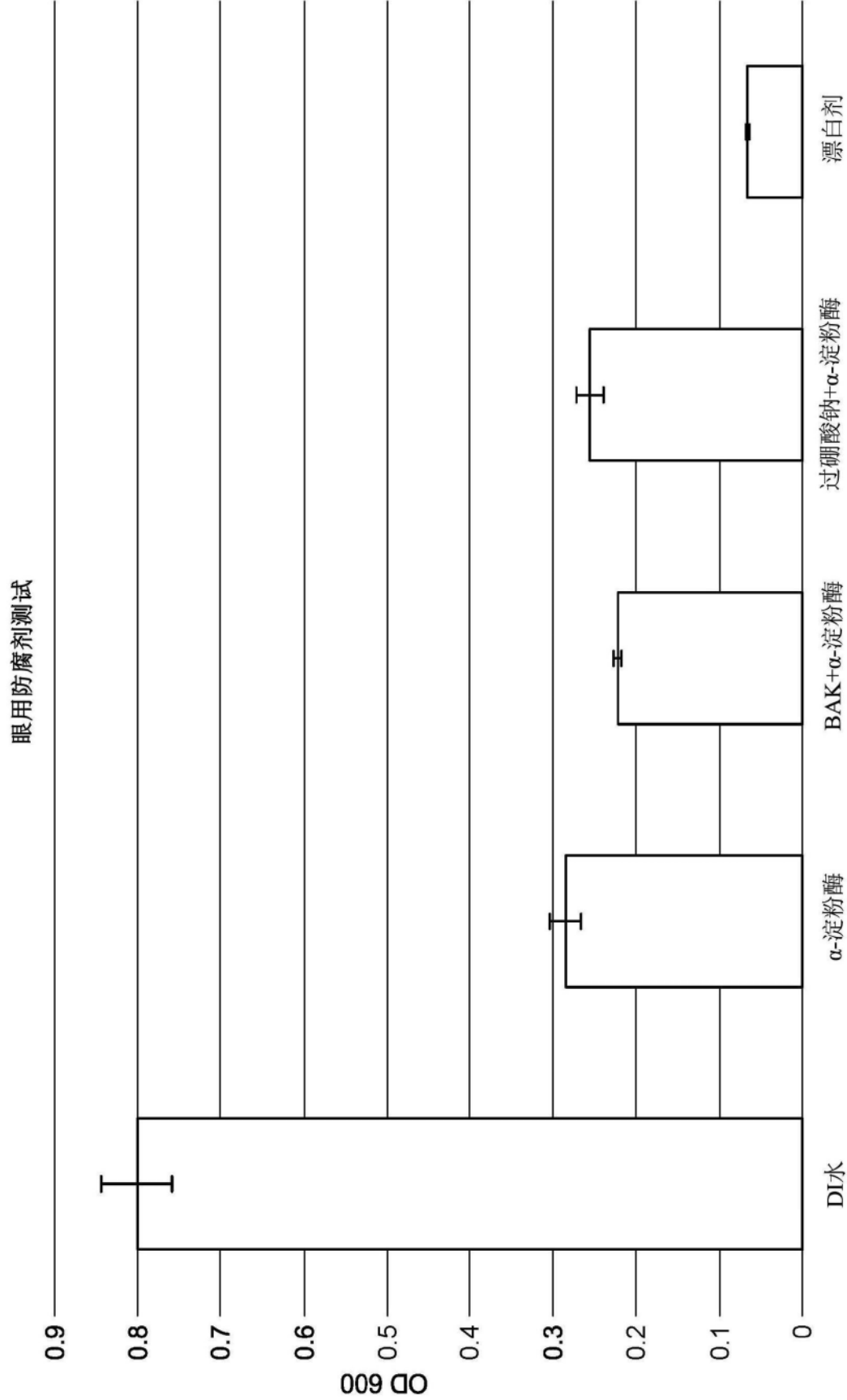


图12B

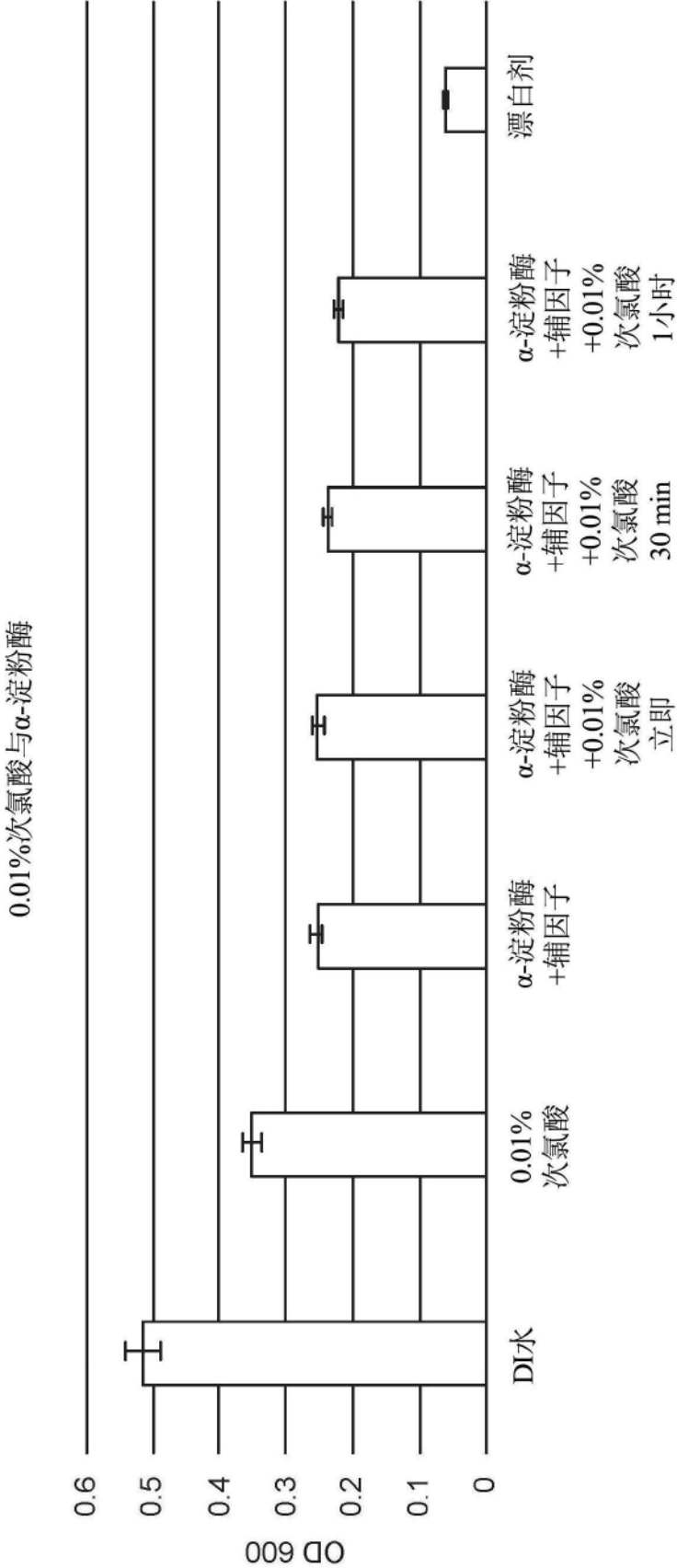


图13

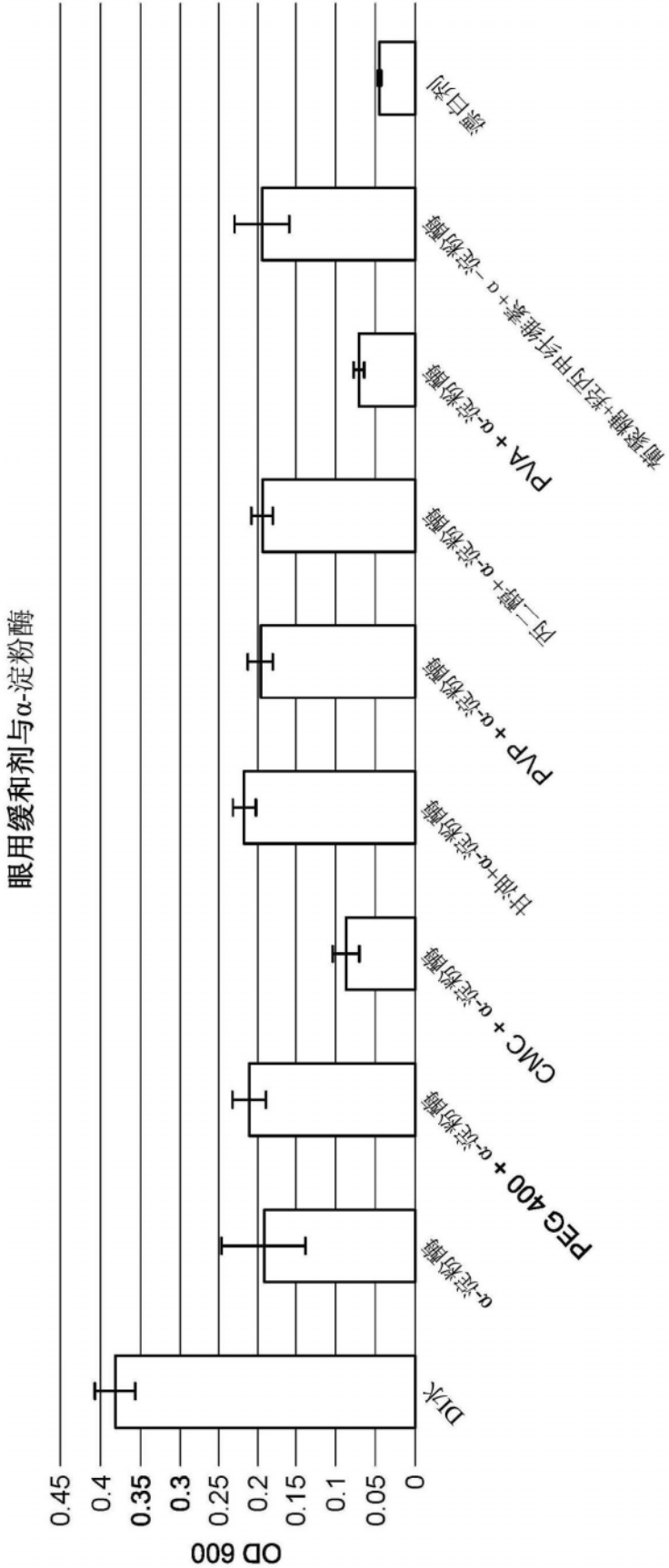


图14A

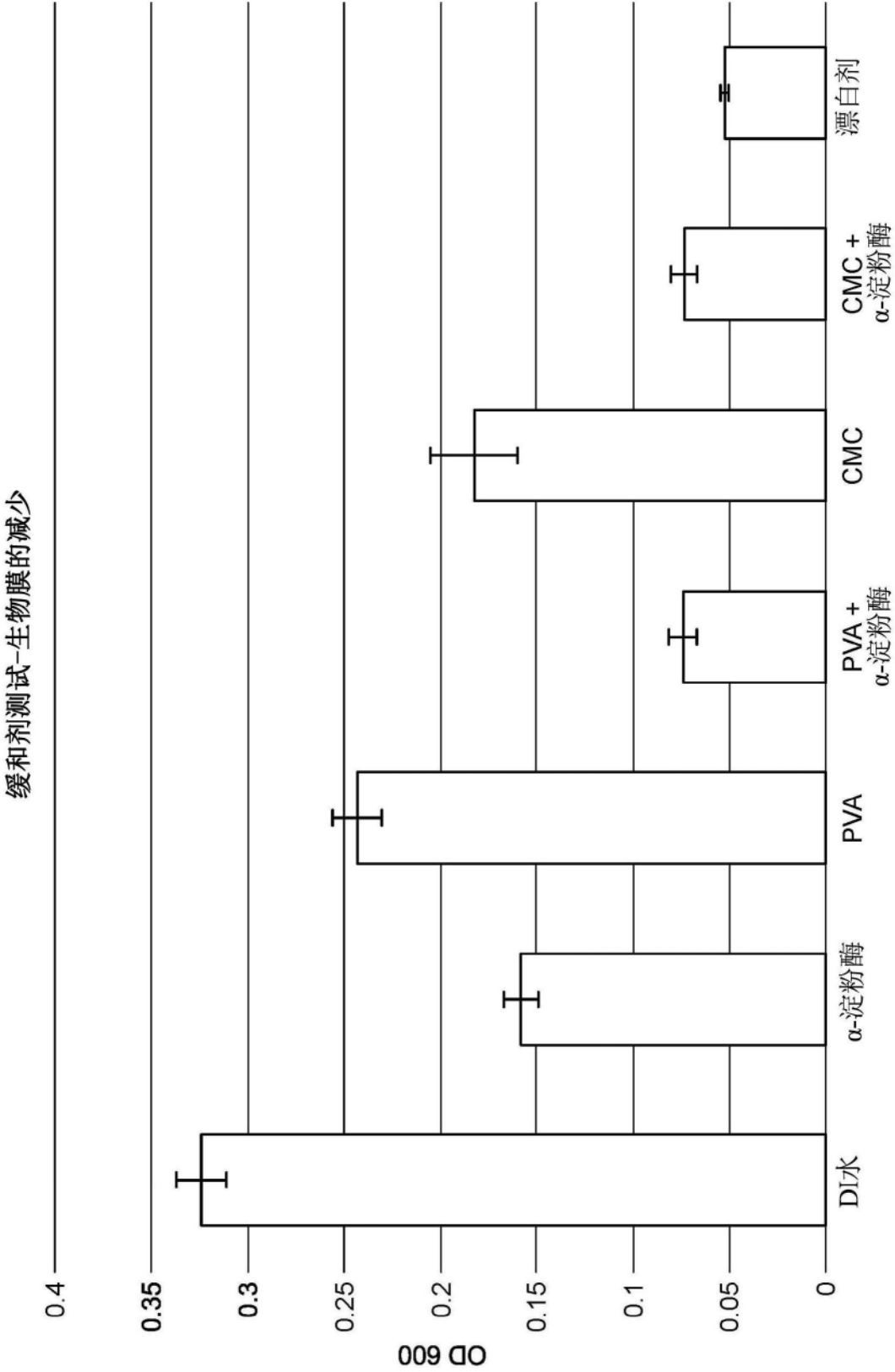


图14B

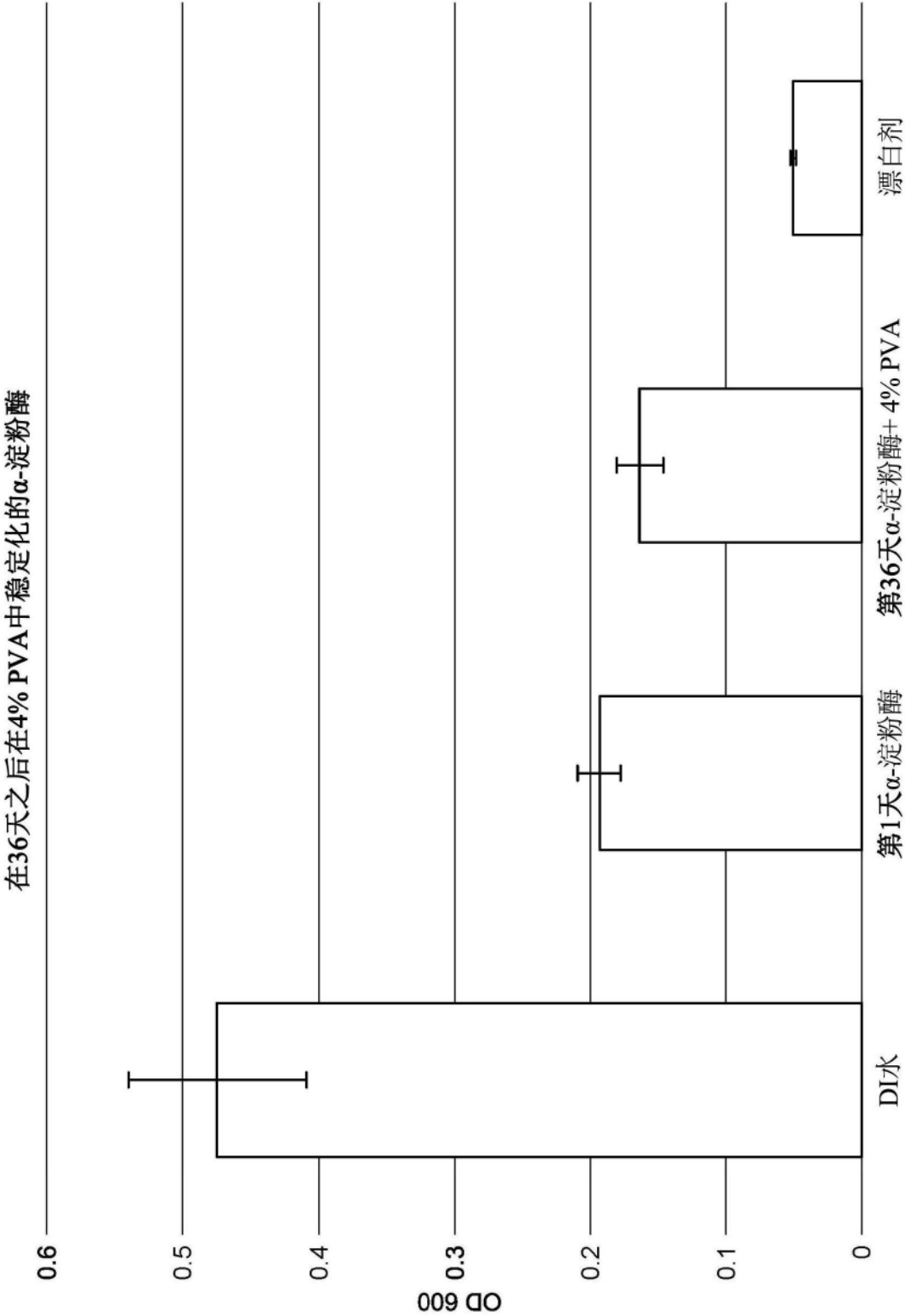


图14C

眼用抗生素比较
金黄色葡萄球菌生物膜减少

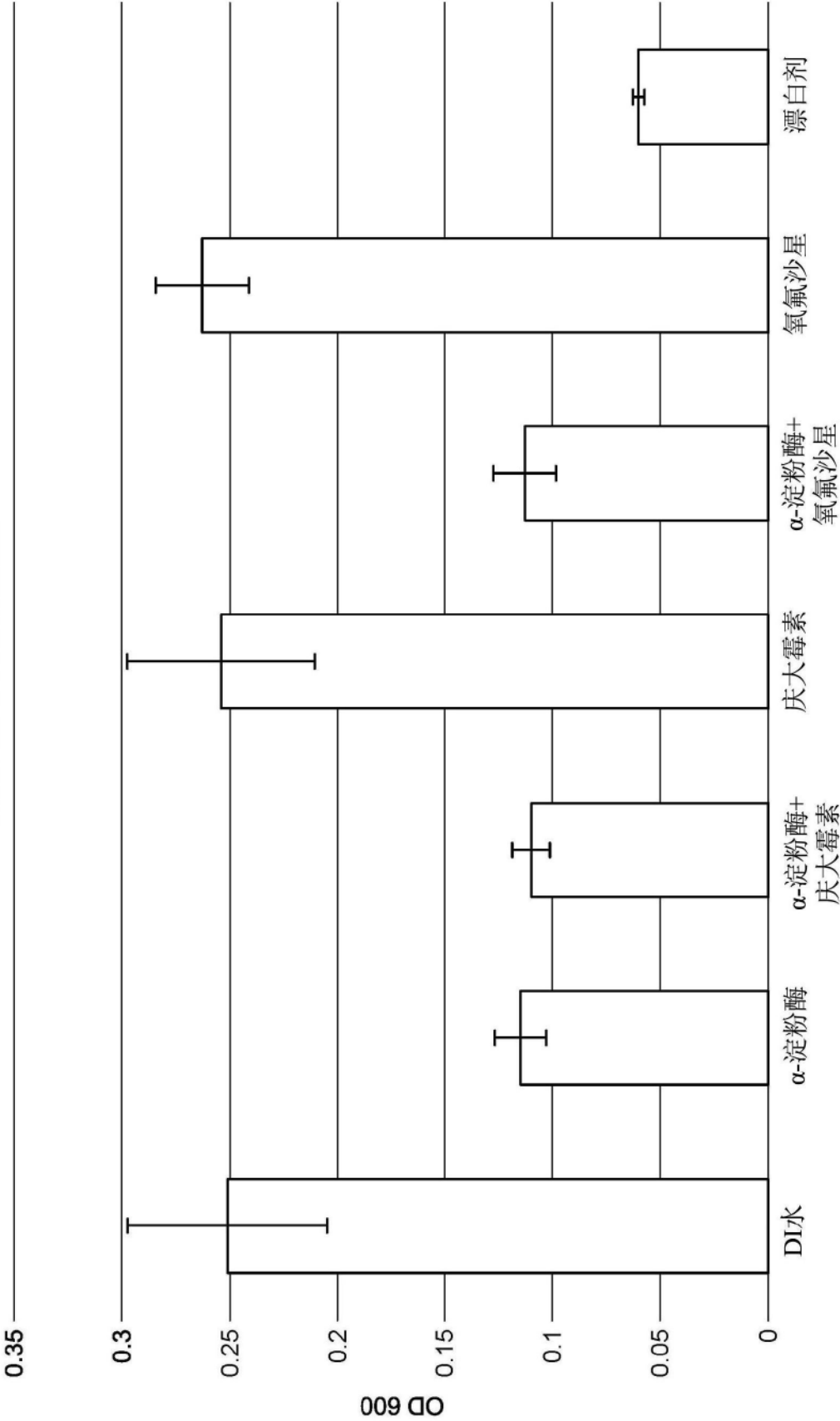


图15

热稳定糖和缓剂生物膜减少

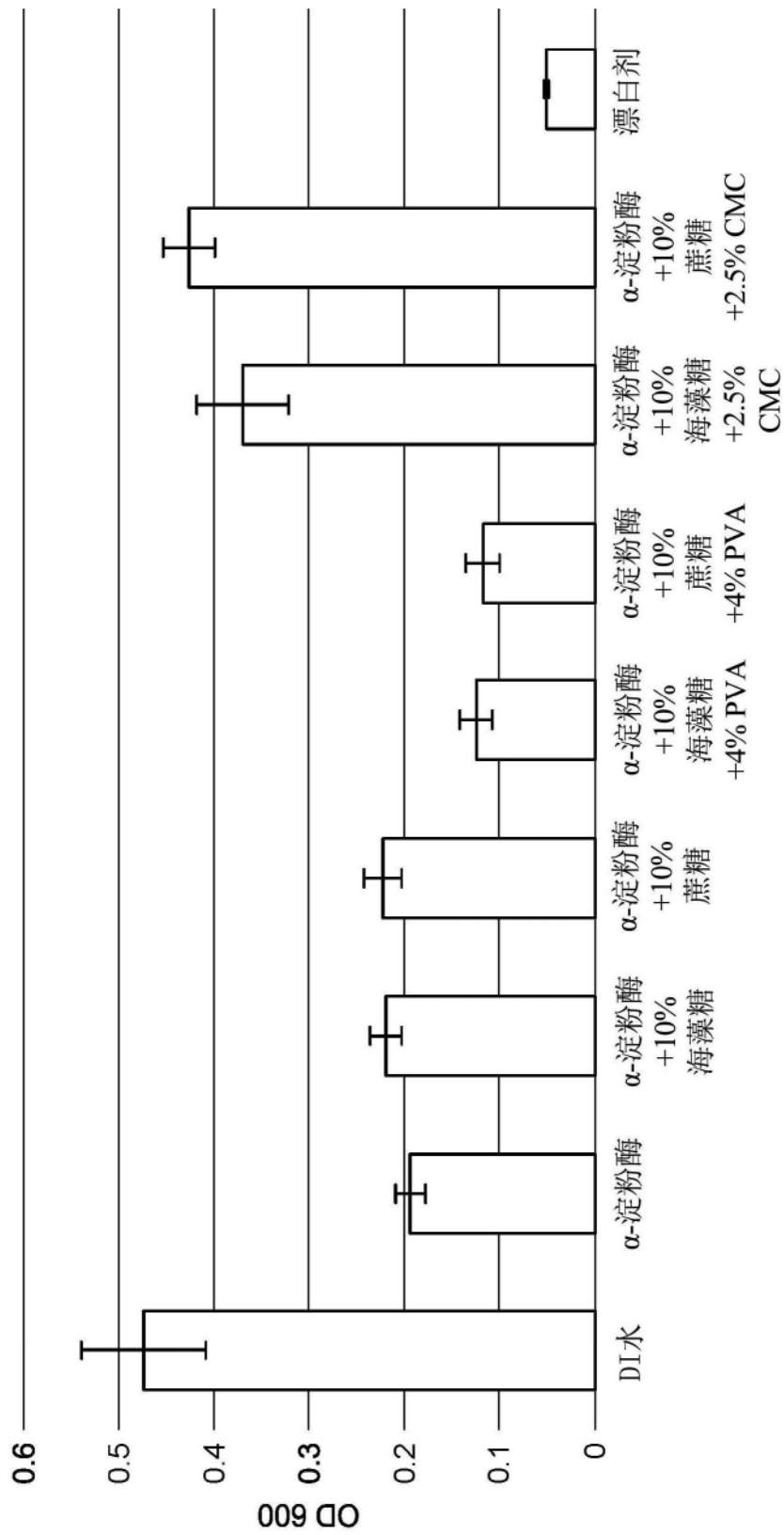


图16

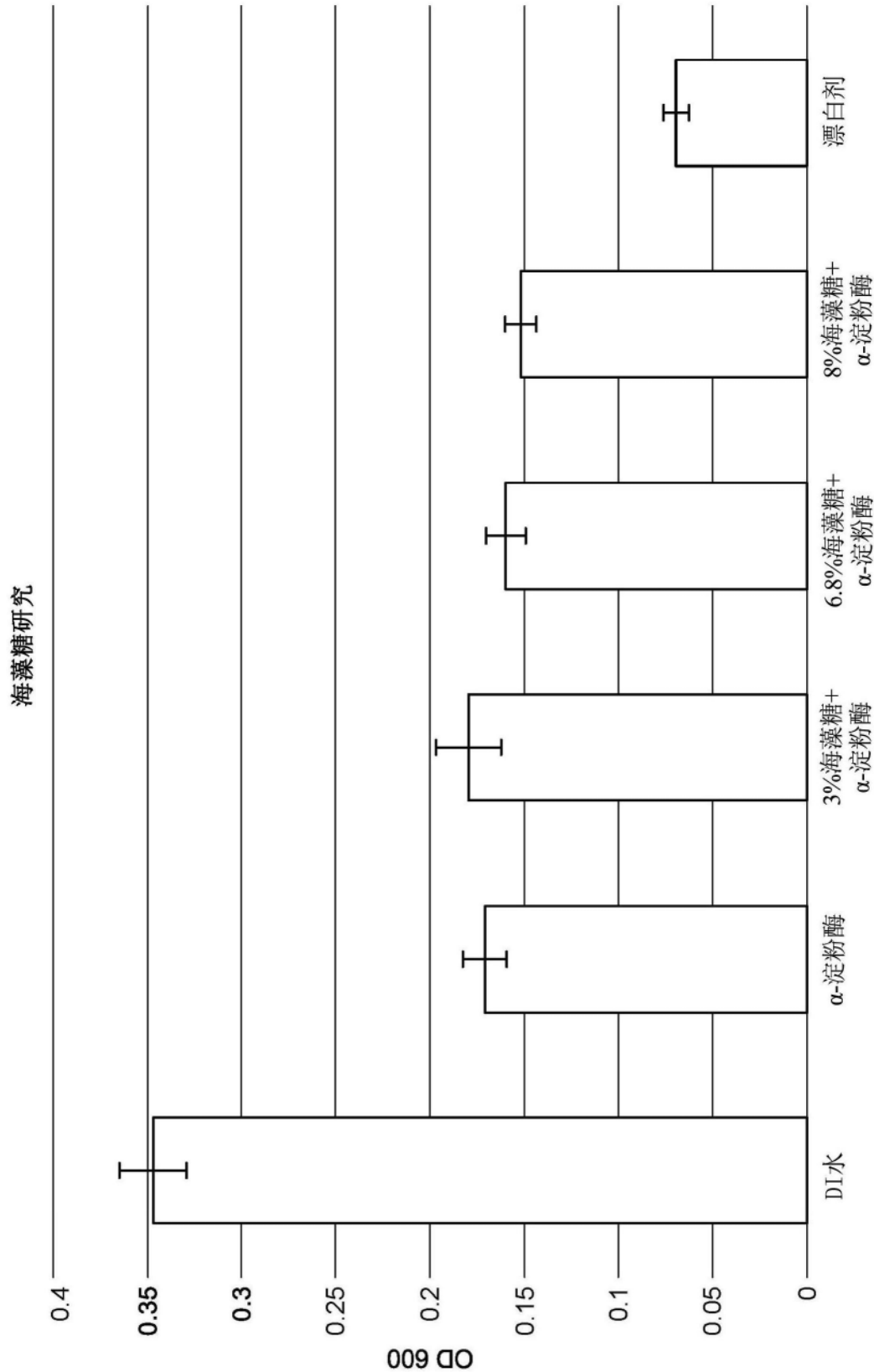


图17

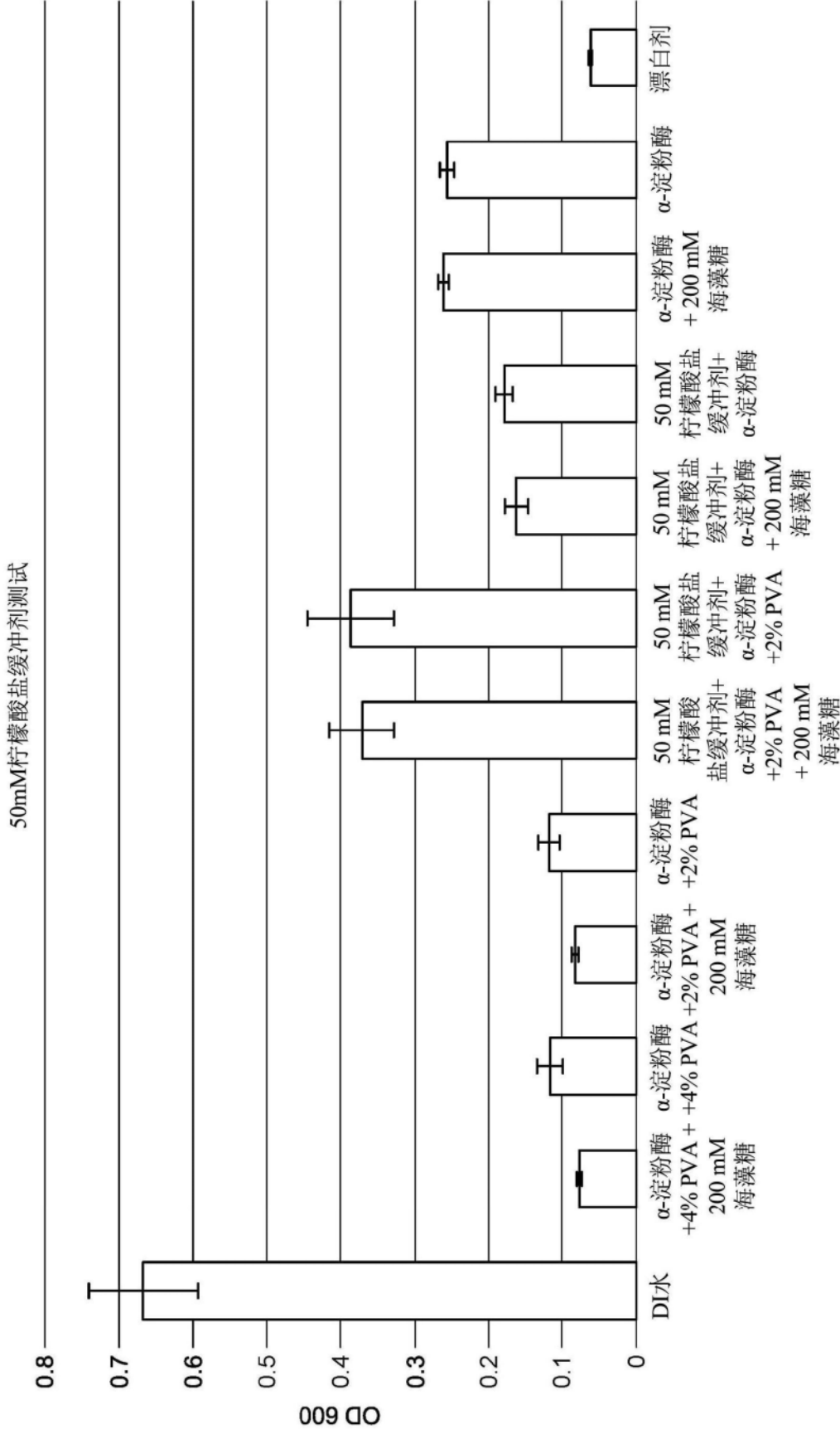


图18A

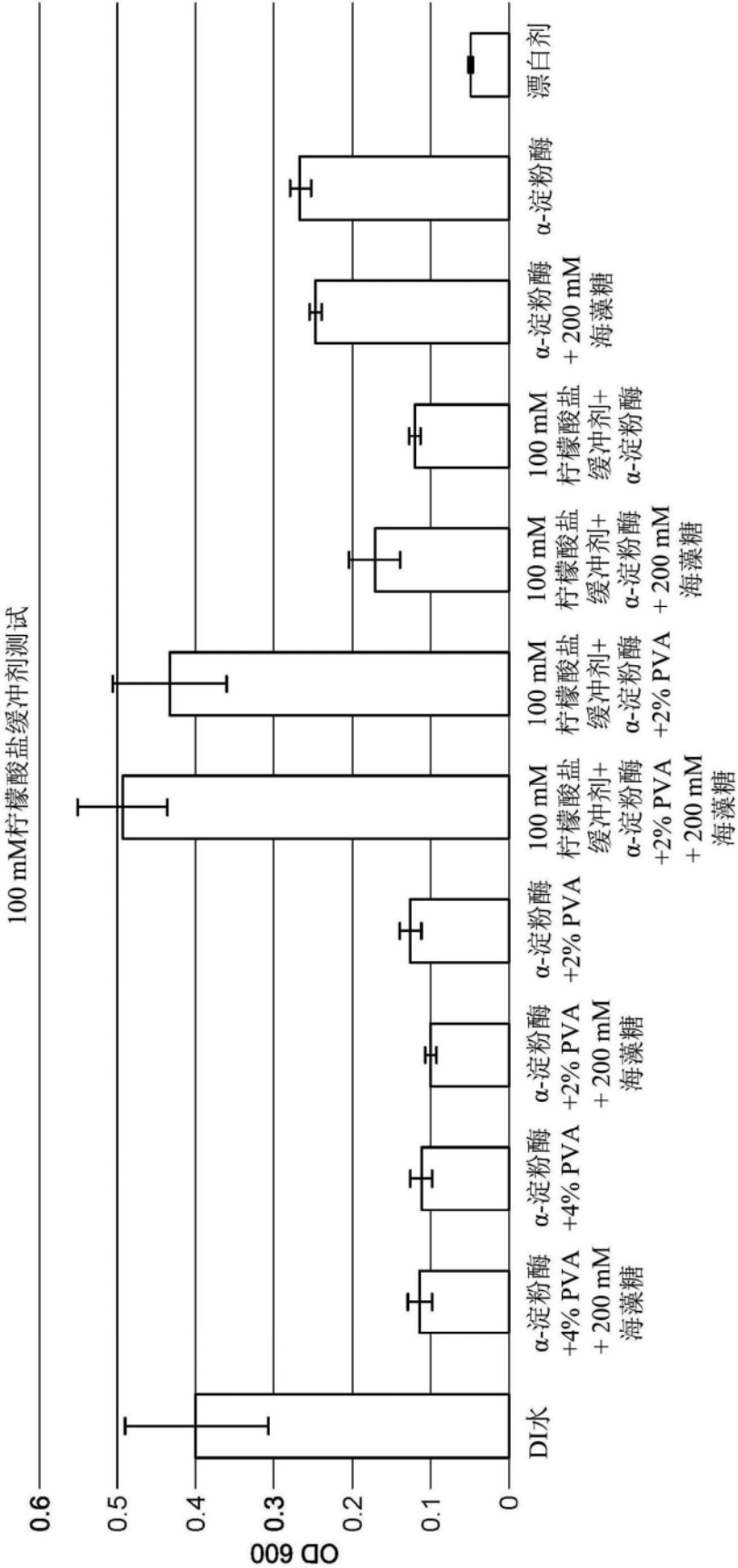


图18B

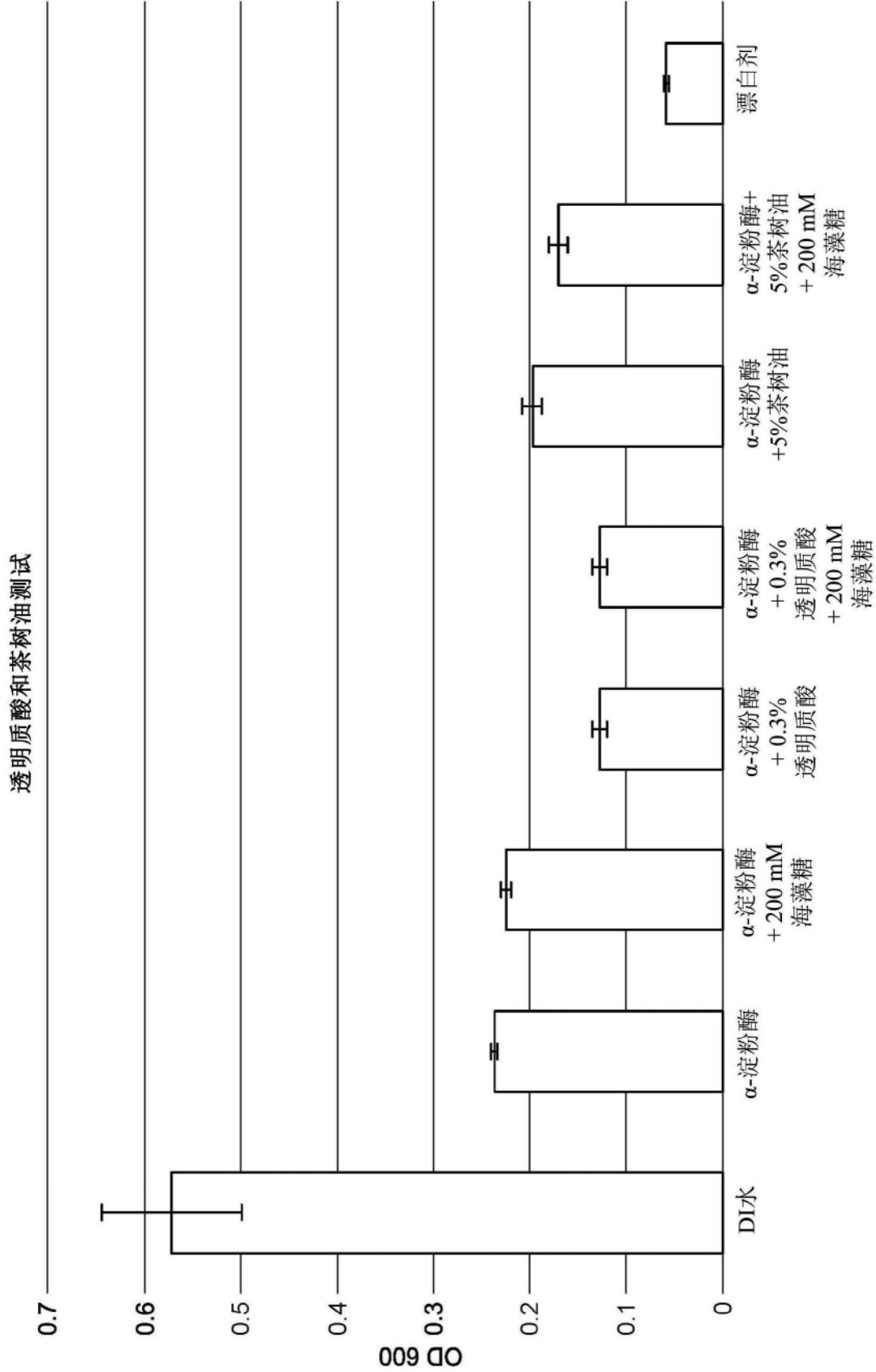


图19