



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475609 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780046178.1

(22)申请日 2017.07.26

(30)优先权数据

62/367,338 2016.07.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2017/054535 2017.07.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/020435 EN 2018.02.01

(71)申请人 史密夫和内修有限公司

地址 美国田纳西州

(72)发明人 石磊 凯瑟琳·范德卡尔

阿列克萨·约万诺维奇

埃里克·罗奇

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

代理人 杨文娟 臧建明

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

A61L 31/08(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

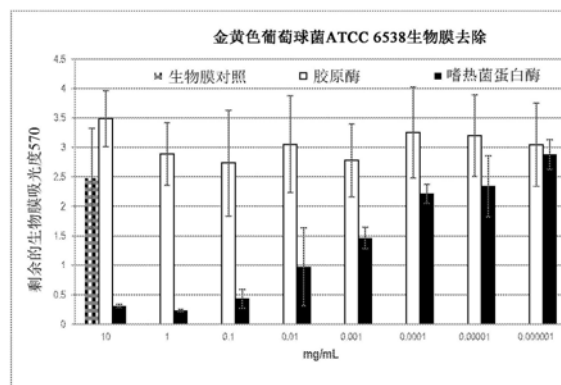
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

使用嗜热菌蛋白酶减少或消除来自表面的细菌生物膜

(57)摘要

公开了用于减少或消除生物和非生物表面上的细菌生物膜的方法、以及使用包含嗜热菌蛋白酶的组合物治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、皮肤损伤、粘膜损伤以及其它生物表面的方法。



1. 一种治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、粘膜损伤或皮肤损伤的方法,所述方法包含向所述伤口、所述粘膜损伤或所述皮肤损伤局部施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物,其中所述细菌生物膜被减少或消除。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阳性细菌生物膜。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阴性细菌生物膜。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述伤口是慢性伤口,并且其中所述慢性伤口是糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡或烧伤。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起所述伤口、所述粘膜损伤或所述皮肤损伤上的所述细菌生物膜减少或消除的量。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度为0.0001mg/mL至10mg/mL。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含抗菌剂。

8. 一种减少或消除生物表面上的细菌生物膜的方法,所述方法包含向所述生物表面施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述生物表面是慢性伤口,并且其中所述慢性伤口是糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡或烧伤。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中所述生物表面是皮肤损伤、粘膜损伤、内脏器官、体腔、口腔、骨组织、肌肉组织、神经组织、眼组织、泌尿道组织、肺组织、气管组织、窦组织、耳组织、牙齿组织、牙龈组织、鼻组织、血管组织、心脏组织、上皮组织、上皮损伤、阴道组织或腹膜组织。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阳性细菌生物膜。

12. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阴性细菌生物膜。

13. 根据权利要求8至12中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起所述生物表面上的所述细菌生物膜减少或消除的量。

14. 根据权利要求8至13中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度为0.0001mg/mL至10mg/mL。

15. 一种减少或消除非生物表面上的细菌生物膜的方法,所述方法包含向所述非生物表面施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述非生物表面是医疗装置的表面。

17. 一种制品,其包含涂有包含嗜热菌蛋白酶的组合物表面。

18. 根据权利要求17所述的制品,其中在用所述组合物涂布之前,在所述制品的所述表面上不存在生物膜。

19. 根据权利要求17所述的制品,其中在用所述组合物涂布所述表面之前,在所述制品的所述表面上存在生物膜。

20. 一种处理制品表面以防止在所述表面上形成生物膜或降低在所述表面上形成生物膜的可能性的方法,所述方法包含用包含嗜热菌蛋白酶的组合物涂布所述表面。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述制品是医疗装置。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述制品是电纺聚合物纤维或纳米纤维,并且其中所述包含嗜热菌蛋白酶的组合物共价连接或吸附到所述电纺聚合物纤维或纳米纤维上。

使用嗜热菌蛋白酶减少或消除来自表面的细菌生物膜

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年7月27日提交的美国临时专利申请第62/367,338号的权益。所引用申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及用于减少或消除表面上的细菌生物膜的方法和组合物。所述组合物包括嗜热菌蛋白酶作为活性成分以减少或消除细菌生物膜。

背景技术

[0004] 细菌生物膜是附着在表面上的细菌群。生物膜中的细菌通常嵌入细胞外聚合物物质(EPS)的自生基质中,所述自生基质将细菌保持在一起成团块并将细菌团块牢固地附着到下面的表面上。细菌生物膜EPS通常被称为粘液,是通常由细胞外DNA、蛋白质、多糖和各种生物聚合物构成的聚合聚集体。生物膜可以在生物或非生物表面上形成,并且可以在工业和临床环境中普遍存在。

[0005] 有证据表明,生物膜对人类健康构成重大威胁。生物膜造成体内超过80%的微生物感染(“《微生物生物膜研究(Research on Microbial Biofilms)》”,国立卫生研究院(National Institutes of Health),PA编号:PA-03-047,2002年12月20日)。生物膜涉及例如以下的健康状况:泌尿道感染、膀胱炎、肺部感染、皮肤感染、粘膜感染、窦感染、耳部感染、痤疮、龋齿、牙周炎、医院感染、开放性伤口和慢性伤口。另外,生物膜可以在例如以下的医疗装置上形成:泌尿道假体;泌尿道导管;腹膜导管、腹膜透析导管、用于血液透析和用于长期施用化学治疗剂的留置导管(希克曼导管(Hickman catheter));心脏植入物,如起搏器、人工心脏瓣膜、心室辅助装置以及合成血管移植物和支架;假体;经皮缝合线;以及气管和呼吸机插管。

[0006] 在生物膜中生长的细菌表现出对抗生素和抗菌剂的耐受性增加,并且非常难以显著减少或消除。生物膜内的细菌比不在生物膜内的细菌对抗细菌化合物的耐受性提高(高达1000倍),即使这些同样的细菌在浮游条件下生长时也会对这些药剂敏感(“《微生物生物膜研究》”,国立卫生研究院,PA编号:PA-03-047,2002年12月20日)。在生物膜中生长的细菌在生理上也不同于在浮游条件下生长的相同细菌。生物膜中的细菌根据它们所处的生物膜中的位置分层成不同的代谢状态,且因此与其自由生活的对应物相比显示出不同的表型。生物膜中细菌的抗微生物耐受性的另一个理论是EPS的保护作用。EPS可以被视为“网状物”或网状结构,其可以物理地防止外来物质(例如,抗菌剂)到达细菌。由于EPS、改变的代谢状态和获得性耐药性因子,生物膜对抗菌剂和抗生素具有多因素耐受性。此外,大多数抗菌剂调配物是水基调配物,由于水分子的高表面张力,使得抗菌活性物质更难以渗透生物膜网状结构。

[0007] 伤口、粘膜损伤和皮肤损伤特别容易受到细菌感染。从微生物学角度来看,正常的完整皮肤的主要功能是控制生活在皮肤表面的微生物群体,并防止潜在的病原体定殖和侵

入下方的组织。皮下组织的暴露,例如伤口、粘膜损伤或皮肤损伤,提供了有利于微生物定殖和增殖的潮湿、温暖和有营养的环境。由于伤口定殖主要是多微生物的,涉及许多可能致病的微生物,因此任何伤口、粘膜损伤或皮肤损伤都有被感染的风险。

[0008] 伤口通常有多个愈合障碍。伤口愈合和感染受到细菌在伤口环境中创造稳定、繁荣的群落的能力与宿主控制细菌群落的能力之间的关系的影响。由于细菌迅速能够形成自己的保护性微环境,即生物膜,在它们附着于表面后,随着生物膜群落的成熟,宿主控制这些生物体的能力可能会降低,最终影响伤口愈合的能力。愈合延迟的伤口,即慢性伤口,在生物膜形成方面特别受关注。虽然生物膜不存在于所有细菌感染中,但一些细菌感染中生物膜与慢性伤口相关联(Mertz,2003,《伤口(Wounds)》,15:1-9)。例如糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡和烧伤的伤口是可能成为慢性伤口的伤口实例。慢性伤口中的细菌生物膜通常不能通过宿主的免疫系统解决,并且这些生物膜对全身和局部抗菌/抗生素剂具有增加的耐受性。因此,慢性伤口中的细菌生物膜感染非常难以显著减少或消除。

[0009] 伤口、粘膜损伤和皮肤损伤中的致病力尤其强的生物体是革兰氏阳性细菌(gram-positive bacteria),例如葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)、链球菌属(*streptococcus* spp.)和肠球菌属(*enterococci* spp.)。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),包括如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药菌株的生物膜在伤口、皮肤损伤和粘膜损伤中变得越来越成问题。这些生物体,特别是MRSA,可以存在于前鼻孔中并导致鼻腔损伤,这些损伤也可能扩散到身体的其它部位,从而导致这些部位的皮肤损伤和粘膜损伤。革兰氏阴性细菌(gram-negative bacteria)铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)也是伤口中致病力尤其强的生物体(Bjarnsholt,2008,《伤口修复和再生(Wound Repair and Regeneration)》;和Jacobsen,2011,《国际伤口杂志(International Wound Journal)》)。

[0010] 近年来,已经进行了许多努力来使用各种抗生素和抗菌剂来治疗粘膜损伤、皮肤损伤和慢性伤口,其中许多被细菌生物膜感染或污染。这些药剂具有不同的化学化合物,且尤其包括如万古霉素(vancomycin)的肽和如莫匹罗星(mupirocin)、碘化合物和银/银离子的抗菌剂。然而,许多细菌对这些化合物的耐药性越来越强。

[0011] 因此,需要安全且有效的组合物,其可以减少或消除伤口、粘膜损伤和皮肤损伤中以及其它生物和非生物表面上的细菌生物膜。

发明内容

[0012] 本发明提供了本领域中与细菌生物膜有关的上述限制和缺陷的解决方案。具体地说,所述解决方案以使用嗜热菌蛋白酶和包含嗜热菌蛋白酶的组合物为前提,以减少或消除包括生物和非生物表面在内的表面上的细菌生物膜。在本发明的一个方面中,公开了通过向表面施用嗜热菌蛋白酶或包含嗜热菌蛋白酶的组合物来治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、粘膜损伤、皮肤损伤和/或其它生物表面的方法。在另一方面中,公开了通过向表面施用嗜热菌蛋白酶或包含嗜热菌蛋白酶的组合物来防止、减少或消除非生物表面上的细菌生物膜的方法。在另一方面中,公开了包含嗜热菌蛋白酶的组合物,其可用于减少或消除存在于生物和非生物表面上的细菌生物膜。

[0013] 在本发明的上下文中还公开了实施例1至51。实施例1是一种治疗被细菌生物膜感

染或污染的伤口、粘膜损伤或皮肤损伤的方法,所述方法包含向所述伤口、所述粘膜损伤或所述皮肤损伤局部施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物,其中所述细菌生物膜被减少或消除。实施例2是根据实施例1所述的方法,其中所述组合物进一步包含载体。实施例3是根据实施例1至2中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阳性细菌生物膜。实施例4是根据实施例3所述的方法,其中所述革兰氏阳性细菌生物膜是葡萄球菌属。实施例5是根据实施例4所述的方法,其中所述葡萄球菌属是金黄色葡萄球菌。实施例6是根据实施例5所述的方法,其中所述葡萄球菌属是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。实施例7是根据实施例1至2中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阴性细菌生物膜。实施例8是根据实施例7所述的方法,其中所述革兰氏阴性细菌生物膜是假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。实施例9是根据实施例8所述的方法,其中所述假单胞菌属是铜绿假单胞菌。实施例10是根据实施例1至9中任一项所述的方法,其中所述伤口是慢性伤口。实施例11是根据实施例10所述的方法,其中所述慢性伤口是糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡或烧伤。实施例12是根据实施例1至9中任一项所述的方法,其中所述皮肤损伤或所述粘膜损伤是水疱、溃疡、磨损、疣、脓肿、擦伤或感染。实施例13是根据实施例1至12中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起所述伤口、所述粘膜损伤或所述皮肤损伤上的所述细菌生物膜减少或消除的量。实施例14是根据实施例1至13中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度为至少0.00001mg/mL、至少0.0001mg/mL、至少0.001mg/mL、至少0.01mg/mL、至少0.1mg/mL、至少1.0mg/mL、或至少10mg/mL。实施例15是根据实施例2至14中任一项所述的方法,其中所述载体是洗剂、溶液、悬浮液、液体、乳液、乳膏、凝胶、软膏、糊剂、气溶胶喷雾、气溶胶泡沫、非气溶胶喷雾、非气溶胶泡沫、薄膜或薄片。实施例16是根据实施例15所述的方法,其中所述载体是药学上可接受的载体。实施例17是根据实施例1至16中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含抗菌剂。实施例18是一种减少或消除生物表面上的细菌生物膜的方法,所述方法包含向所述生物表面施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物。实施例19是根据实施例21所述的方法,其中所述组合物进一步包含载体。实施例20是根据实施例18至19中任一项所述的方法,其中所述生物表面是伤口。实施例21是根据实施例20所述的方法,其中所述伤口是慢性伤口。实施例22是根据实施例21所述的方法,其中所述慢性伤口是糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡或烧伤。实施例23是根据实施例18至19中任一项所述的方法,其中所述生物表面是皮肤损伤或粘膜损伤。实施例24是根据实施例23所述的方法,其中所述皮肤损伤或所述粘膜损伤是水疱、溃疡、磨损、疣、脓肿、擦伤或感染。实施例25是根据实施例18至19中任一项所述的方法,其中所述生物表面是内脏器官、体腔、口腔、骨组织、肌肉组织、神经组织、眼组织、泌尿道组织、肺组织、气管组织、窦组织、耳组织、牙齿组织、牙龈组织、鼻组织、血管组织、心脏组织、上皮组织、上皮损伤、阴道组织或腹膜组织。实施例26是根据实施例18至25中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阳性细菌生物膜。实施例27是根据实施例26所述的方法,其中所述革兰氏阳性细菌生物膜是葡萄球菌属。实施例28是根据实施例27所述的方法,其中所述葡萄球菌属是金黄色葡萄球菌。实施例29是根据实施例28所述的方法,其中所述葡萄球菌属是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。实施例30是根据实施例18至25中任一项所述的方法,其中所述细菌生物膜是革兰氏阴性细菌生物膜。实施例31是根据实施例30所述的方法,其中所述革兰氏阴性细菌生物膜是假单胞菌属。实

实施例32是根据实施例31所述的方法,其中所述假单胞菌属是铜绿假单胞菌。实施例33是根据实施例18至32中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起所述生物表面上的所述细菌生物膜减少或消除的量。实施例34是根据实施例18至33中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度为至少0.00001mg/mL。实施例35是根据实施例19至34中任一项所述的方法,其中所述载体是药物载体。实施例36是根据实施例35所述的方法,其中所述药物载体是洗剂、溶液、悬浮液、液体、乳液、乳膏、凝胶、软膏、糊剂、气溶胶喷雾、气溶胶泡沫、非气溶胶喷雾、非气溶胶泡沫、薄膜或薄片。实施例37是一种减少或消除非生物表面上的细菌生物膜的方法,所述方法包含向所述非生物表面施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物。实施例38是根据实施例37所述的方法,其中所述组合物进一步包含适合于施用到非生物表面上的载体。实施例39是根据实施例37或38所述的方法,其中所述非生物表面是医疗装置的表面。实施例40是根据实施例39所述的方法,其中所述医疗装置是泌尿道假体、泌尿道导管、腹膜导管、腹膜透析导管、用于血液透析的留置导管、用于施用化学治疗剂的留置导管、心脏植入物、起搏器、人工心脏瓣膜、心室辅助装置、合成血管移植物、合成血管支架、假体、经皮缝合线、气管插管或呼吸机插管。实施例41是根据实施例37至40中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起所述非生物表面上的所述细菌生物膜减少或消除的量。实施例42是根据实施例37至41中任一项所述的方法,其中嗜热菌蛋白酶的浓度为至少0.00001mg/mL。实施例43是一种制品,其包含涂有包含嗜热菌蛋白酶的组合物的表面。实施例44是根据实施例43所述的制品,其中所述制品是医疗装置。实施例45是根据实施例44所述的制品,其中所述医疗装置是泌尿道假体、泌尿道导管、腹膜导管、腹膜透析导管、用于血液透析的留置导管、用于施用化学治疗剂的留置导管、心脏植入物、起搏器、人工心脏瓣膜、心室辅助装置、合成血管移植物、合成血管支架、假体、经皮缝合线、气管插管或呼吸机插管。实施例46是根据实施例43至45中任一项所述的制品,其中在用所述组合物涂布之前,在所述制品的所述表面上不存在生物膜。实施例47是根据实施例43至45中任一项所述的制品,其中在用所述组合物涂布所述表面之前,在所述制品的所述表面上存在生物膜。实施例48是一种处理制品表面以防止在所述表面上形成生物膜或降低在所述表面上形成生物膜的可能性的方法,所述方法包含用包含嗜热菌蛋白酶的组合物涂布所述表面。实施例49是根据实施例48所述的方法,其中所述制品是医疗装置。实施例50是根据实施例49所述的方法,其中所述医疗装置是泌尿道假体、泌尿道导管、腹膜导管、腹膜透析导管、用于血液透析的留置导管、用于施用化学治疗剂的留置导管、心脏植入物、起搏器、人工心脏瓣膜、心室辅助装置、合成血管移植物、合成血管支架、假体、经皮缝合线、气管插管或呼吸机插管。实施例51是根据实施例48所述的方法,其中所述制品是电纺聚合物纤维或纳米纤维,并且其中所述包含嗜热菌蛋白酶的组合物共价连接或吸附到所述电纺聚合物纤维或纳米纤维上。

[0014] 除非另有说明,否则本文中显示的百分比值是重量/重量并且与总组合物的重量有关。举例来说,100克材料中的10克组分是10重量%的组分。

[0015] 在细菌生物膜的情形下,术语“减少(reduce/reduced/reducing/reduction)”意指生物膜中的细菌计数减少。

[0016] 在治疗生物表面上的细菌生物膜或治疗粘膜损伤、伤口或皮肤损伤的情形下,术语“治疗(treat/treated/treatment/treating)”意指细菌生物膜的任何可测量的减少或完全消除和/或粘膜损伤、伤口或皮肤损伤的治疗性改善。

[0017] 在治疗细菌生物膜或治疗伤口、粘膜损伤或皮肤损伤的情形下,术语“有效”意指足以实现期望的、预期的或意欲的结果,包括治疗性改善。

[0018] 在细菌生物膜的情形下,术语“消除(eliminate/eliminated/eliminating/elimination)”意指完全根除生物膜中存在的细菌。

[0019] 在细菌生物膜的情形下,术语“防止(prevent/prevented/preventing)”意指在已经涂有本发明组合物的表面,例如生物或非生物表面上,细菌生物膜形成的可能性降低或被完全防止。

[0020] 本文所用的术语“伤口”是指皮肤或粘膜的外部伤口,且包括慢性和急性伤口。

[0021] 本文所用的术语“损伤”是指身体组织上因受伤或疾病而受损害的区域。

[0022] 术语“约”或“大约”定义为接近本领域普通技术人员理解的,并且在一个非限制性实施例中,所述术语定义为10%以内,优选5%以内,更优选在1%以内,最优选在0.5%以内。

[0023] 词语“包含(comprising)”(和任何形式的包含,如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”、“具有(having)”(和任何形式的具有,如“具有(have)”和“具有(has)”、“包括(including)”(和任何形式的包括,如“包括(includes)”和“包括(include)”或“含有(containing)”(和任何形式的含有,如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是内含性的或开放式的,且不排除其它未列举的要素或方法步骤。

[0024] 当与“包含”、“具有”、“包括”或“含有”(或这些词语的任何变化形式)一起使用时,使用“一个(a/an)”一词可能意指“一个”,但其也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或超过一个”的含义一致。

[0025] 所述组合物及其使用方法可以“包含”整个说明书中公开的任何成分或步骤,“基本上由整个说明书中公开的任何成分或步骤组成”或“由整个说明书中公开的任何成分或步骤组成”。

[0026] 预期本说明书中讨论的任何实施例可以关于本发明的任何方法或组合物实施,且反之亦然。此外,本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0027] 根据以下具体实施方式,本发明的其它目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解,具体实施方式和具体实例虽然表明了本发明的具体实施例,但是仅以说明的方式给出,因为本领域技术人员根据此具体实施方式将显而易知在本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

附图说明

[0028] 图1.示出了当与胶原酶和对照相比时嗜热菌蛋白酶在体外对金黄色葡萄球菌细菌生物膜的影响的图。

具体实施方式

[0029] 本发明涉及用于减少、消除或防止细菌生物膜和/或在表面上生长此类生物膜的方法和组合物。具体地说,本发明提供了包含嗜热菌蛋白酶的组合物,其显示出对抗细菌生物膜的活性,以及将这些组合物施用于被细菌生物膜感染或污染的生物和非生物表面的方法,从而有效地减少或消除细菌生物膜。另外,可以用此类组合物处理易于形成生物膜的表

面(例如,医疗装置)以防止生物膜形成。在一个方面中,本发明涉及用于治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、皮肤损伤、粘膜损伤以及其它生物表面的方法和组合物。在另一个方面中,本发明涉及用于减少、消除或防止细菌生物膜和/或在如医疗装置的非生物表面上生长此类生物膜的方法和组合物。不受理论束缚,嗜热菌蛋白酶可破坏和/或消化细菌生物膜的细胞外聚物质(EPS)基质,从而减少、消除和/或防止生物膜生长或形成。嗜热菌蛋白酶也可以对细菌表现出杀细菌活性。

[0030] I. 组合物

[0031] 本发明的组合物包含嗜热菌蛋白酶。嗜热菌蛋白酶是一种热稳定的金属蛋白酶,通过发酵过程从称为嗜热解脲芽孢杆菌(*Bacillus thermoproteolyticus rokko*)的细菌物种制成,其在疏水性残基亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸和甲硫氨酸的N端切割。Amano Japan是嗜热菌蛋白酶的制造商和供应商。嗜热菌蛋白酶可以被分离和/或纯化。嗜热菌蛋白酶的CAS编号为9073-78-3。

[0032] 当组合物施用于表面时,组合物中嗜热菌蛋白酶的浓度是引起表面上细菌生物膜减少或消除的量。在各种实施例中,本发明组合物中嗜热菌蛋白酶的浓度可以是至少0.00001mg/mL,或至少0.0001mg/mL,或至少0.001mg/mL,或至少0.01mg/mL,或至少0.1mg/mL,或至少1.0mg/mL,或至少10mg/mL,或0.00001mg/mL至10mg/mL,或0.0001mg/mL至10mg/mL,或0.001mg/mL至10mg/mL,或0.01mg/mL至10mg/mL,或0.1mg/mL至10mg/mL,或1.0mg/mL至10mg/mL,或0.00001mg/mL至1.0mg/mL或0.0001mg/mL至1.0mg/mL,或0.001mg/mL至1.0mg/mL,或0.01mg/mL至1.0mg/mL,或0.1mg/mL至1.0mg/mL,或0.00001mg/mL至0.1mg/mL或0.0001mg/mL至0.1mg/mL,或0.001mg/mL至0.1mg/mL,或0.01mg/mL至0.1mg/mL,或0.00001mg/mL至0.01mg/mL,或0.0001mg/mL至0.01mg/mL,或0.001mg/mL至0.01mg/mL,或0.00001mg/mL至0.001mg/mL,或0.0001mg/mL至0.001mg/mL,或0.00001mg/mL至0.001mg/mL,或者可以是0.00001mg/mL,或0.0001mg/mL,或0.001mg/mL,或0.01mg/mL,或0.1mg/mL,或1.0mg/mL,或10mg/mL。

[0033] 本发明的组合物可包含可接受的载体,例如适合施用到生物表面上的载体,所述生物表面包括伤口、粘膜、皮肤、器官和其它生物组织;或适合施用到非生物表面的载体,所述非生物表面包括医疗装置。载体可以是药学上可接受的载体。载体可以是适于局部递送和治疗的载体。载体的非限制性实例包括洗剂、溶液、悬浮液、液体、乳液、乳膏、凝胶、软膏、糊剂、气溶胶喷雾、气溶胶泡沫、非气溶胶喷雾、非气溶胶泡沫、薄膜、粉末和薄片。组合物可以浸渍在纱布、绷带或其它伤口敷料材料中。适用于局部治疗皮肤、粘膜和伤口的载体的非限制性实例包括以引用的方式并入本文中的美国专利6,399,092中公开的那些载体,其是包含超吸收性聚合物、抗微生物剂和泊洛沙姆(poloxamer)和/或多元醇的无水亲水载体。适用于局部治疗皮肤、粘膜和伤口的载体是以引用的方式并入本文中的美国公开2016/0008293中公开的载体,其为水含量小于15%w/w的可溶性凝胶形成膜组合物,其包含水溶性纤维素醚、亲水性流变改性剂和蛋白水解酶,其中所述凝胶形成膜在与水或其它水性介质接触时能够形成水凝胶。适用于局部治疗皮肤、粘膜和伤口的载体是以引用的方式并入本文中的美国公开2013/0045196中公开的载体,其是包含分散相和连续相的组合物,所述分散相包含液体亲水性多元醇和蛋白水解酶,而所述连续相包含疏水性基质。适用于局部治疗皮肤、粘膜和伤口的载体是以引用的方式并入本文中的美国公开2015/0283217中公开

的载体,其是包含亲水性胶凝剂的水凝胶组合物,所述亲水性胶凝剂包括非离子纤维素醚和嗜热菌蛋白酶。适用于局部治疗皮肤、粘膜和伤口的载体是以引用的方式并入本文中的美国专利7,785,584中公开的载体,其是喷涂组合物,其包含:包含烷氧基化脂肪醇和磷酸单酯和磷酸二酯的阴离子型表面活性剂乳化剂;至少一种伤口愈合剂、润肤剂、保湿剂、防腐剂或抗微生物剂;以及蛋白水解酶。

[0034] 合适载体的其它非限制性实例包括基于矿脂的软膏、基于聚乙二醇的软膏和凝胶、基于泊洛沙姆的软膏和凝胶、无水组合物、水基组合物、疏水组合物和/或亲水组合物。

[0035] 本发明的组合物可进一步包含适用于组合物施用到生物表面或非生物表面上的功能性成分。非限制性实例包括吸收剂、超吸收剂、抗菌剂、抗氧化剂、粘合剂、缓冲剂、填充剂、螯合剂、着色剂、杀生物剂、除臭剂、乳液稳定剂、成膜剂、香料成分、保湿剂、溶解剂、酶促剂、遮光剂、氧化剂、pH调节剂、增塑剂、防腐剂、还原剂、润肤皮肤调理剂、保湿皮肤调理剂、保湿剂、表面活性剂、乳化剂、清洁剂、发泡剂、水溶助长剂、溶剂、悬浮剂、粘度控制剂(流变改性剂)、增粘剂(增稠剂)和/或推进剂。以引用的方式并入本文中的McCutcheon的第1卷《乳化剂与清洁剂(Emulsifiers&Detergents)》和第2卷《功能材料(Functional Materials)》,2001中公开了合适的功能性成分的清单和专论。

[0036] 本发明的组合物还进一步包含药物活性成分、美容活性成分、愈创剂、伤口愈合剂、抗生素、抗真菌剂、防腐剂、清洁剂和抗菌剂。所述组合物可以是无菌的或用防腐剂保存的。

[0037] 各种抗菌剂适用于本发明。合适的抗菌剂包括银化合物,例如以下非限制性实例:元素银、银纳米粒子、银沸石、磺胺嘧啶银、离子化银和银盐、例如氯化银和硝酸银。其它合适的抗菌剂包括碘化合物,例如以下非限制性实例:碘、碘酊、卢戈碘溶液(Lugol's iodine solution)、碘化物、碘外用溶液、与烷基芳氧基聚乙烯的磷酸酯络合的碘、碘喹啉、十一烷基碘-碘、壬基苯氧基聚乙醇-碘络合物;以及碘伏,如聚维酮-碘(PVP-碘)、聚乙烯醇-碘、聚乙烯基噁唑烷酮-碘、聚乙烯基咪唑-碘、聚乙烯基吗啉酮-碘、和聚乙烯基己内酰胺-碘、壬基苯酚乙氧基化物-碘、可溶性淀粉-碘、 β -环糊精-碘、聚氧乙烯聚氧丙烯缩合物-碘、乙氧基化直链醇-碘和卡地姆-碘(cadexomer-iodine)。合适的抗菌剂的其它非限制性实例包括:氯己定(chlorhexidine)和其盐,二盐酸盐、二乙酸盐和二葡萄糖酸盐;季铵化合物,如苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride)、甲基苯扎氯铵、西他氯铵(cetalkonium chloride)、氯化十六烷基吡啶、西曲氯铵(cetrimonium)、西曲溴铵(cetrimide)、多法氯铵(dofanium chloride)、溴化四乙基铵、二癸基二甲基氯化铵和度米芬(domiphen bromide);含氯化合物,如次氯酸钠、次氯酸钙和二氧化氯;过氧化氢;苯甲酸和其盐;过氧化苯甲酰;苯甲醇;双吡啶硫酮盐;硼酸;樟脑甲醇;樟脑酚;氯丁醇;卤卡班(cloflucarban);氨苯砒(dapsone);脱氢乙酸和其盐;乙醇;六氯酚;海西汀(hexitidine);己基间苯二酚;羟基苯甲酸和其盐;异丙醇;醋酸磺胺米隆(mafenide acetate);吡啶硫酮镁;红汞(merbromin);氯酚汞(mercufenol chloride);对羟基苯甲酸甲酯;甲硝唑(metronidazole)和其衍生物;莫匹罗星和其盐;呋喃西林(nitrofurazone);正丙醇;有机过氧化物;对氯间二甲苯酚;苯酚;苯氧乙醇;苯醇;苯乙醇;硫化硒;氧氯化钠;磺乙酰胺钠;山梨酸和其盐;硫;四氯水杨酰苯胺;麝香草酚;三溴沙仑(tribromsalan);三氯卡班(triclocarbon);三氯生(triclosan);以及吡啶硫酮锌。抗菌肽和抗生素也是合

适的抗菌剂。在一些实施例中,本发明的组合物进一步包含一种或多种抗菌剂。在其它实施例中,本发明的组合物进一步包含一种或多种抗生素剂。在其它非限制性实施例中,本发明的组合物可以不包括任何上述抗菌剂和/或抗生素剂,使得嗜热菌蛋白酶是处理生物膜的主要或唯一活性物质。

[0038] 本发明的组合物可以按任何合适的包装配置包装。非限制性实例包括瓶、乳液泵、摇瓶(toddle)、管、罐、非气溶胶泵喷雾器、气溶胶容器、小袋和/或小包。包装可以配置成用于单次使用或多次使用的施用。

[0039] A. 制造

[0040] 本发明的组合物可以通过本领域已知的用于制造药物和局部产品以及设计用于施用到非生物表面例如医疗装置的产品的方法和设备来制造。这些方法包括但不限于使用机械混合器,包括LIGHTNIN螺旋桨混合器;COWLES溶解器;SILVERSON分散器;反向旋转侧刮混合器;均质器和分散器,包括线上或罐内转子-定子均质器;和轧机,包括3辊轧机、软膏轧机或转子-定子轧机。也可以使用具有旋转侧刮混合器加罐内均质器的“一体化(all-in-one)”真空混合系统。此类混合器包括但不限于OLSA混合器,FRYMA-KORUMA混合器和LEE TRI-MIX TURBO-SHEAR罐。从小型实验室规模批次到全规模生产批次都可以制造本发明的组合物。

[0041] II. 细菌生物膜

[0042] 本发明的组合物适用于减少革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌生物膜中的细菌和/或消除它们。所述组合物还可用于防止在如医疗装置的表面上形成此类生物膜。革兰氏阳性细菌的非限制性实例包括葡萄球菌属,如金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*);链球菌属,如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*);芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*);单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*);肠球菌属;和乳酸菌,如植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。革兰氏阴性细菌的非限制性实例包括假单胞菌属,如铜绿假单胞菌;和大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

[0043] A. 体外生物膜模型

[0044] 体外生物膜模型用于评估本发明调配物对细菌生物膜的生物膜功效。将细菌点在搁置在血琼脂平板上的过滤器上的胶原基质上,并孵育以允许生物膜形成。所述模型模拟体内伤口生物膜,因为营养物从生物膜下方提供,而局部治疗在上面的空气界面处施用。这种体外模型和方法公开在海报展示中,即Van der Kar等人在2010年4月18日于佛罗里达州奥兰多(Orlando,FL)的2010年伤口愈合协会年会(2010Wound Healing Society Annual Meeting)的海报BRC09展示的《使用两种伤口病原体筛选调配物的通用体外生物膜模型(A Versatile In Vitro Biofilm Model Using Two Wound Pathogens to Screen Formulations)》,且其以引用的方式并入本文中。其它体外生物膜模型和方法公开在以下出版物中:《利福平通过表皮葡萄球菌生物膜的渗透(Penetration of Rifampin through *Staphylococcus epidermidis* Biofilms)》,Zheng等人,《抗微生物剂和化学疗法(Antimicrobial Agents and Chemotherapy)》,2002年3月,第900页-第903页;《氧限制有助于生物膜中铜绿假单胞菌的抗生素耐受性(Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms)》,Borriello等人,

《抗微生物剂和化学疗法》,2004年7月,第2659页-第2664页;以及《铜绿假单胞菌生物膜中的异质性包括在抗生素耐受亚群中的核糖体冬眠因子的表达以及在代谢活性群体中的缺氧诱导的应激反应(Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population)》,Williamson等人,《细菌学杂志(Journal of Bacteriology)》,2012年2月,第2062页-第2073页,所有这些出版物都以引用的方式并入本文中。

[0045] III. 使用和处理方法

[0046] 本发明的组合物可用于减少生物和非生物表面上的细菌生物膜中的细菌和/或消除生物和非生物表面上的细菌生物膜,并且还可用于治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、皮肤损伤、粘膜损伤和其它生物表面。所述组合物还可用于防止在易于生长或形成生物膜的表面(例如,医疗装置的表面)上生长或形成生物膜。公开了治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口、粘膜损伤、皮肤损伤或其它生物表面的方法,所述方法包含向伤口、粘膜损伤、皮肤损伤或生物表面施用包含嗜热菌蛋白酶的组合物,其中所述细菌生物膜被减少或消除。随后在用所述组合物处理后,可以向伤口、粘膜损伤、皮肤损伤或生物表面施用包含药物活性成分、美容活性成分、愈创剂、伤口愈合剂、抗生素、抗真菌剂、防腐剂、清洁剂和/或抗菌剂的其它组合物,以用于进一步处理。

[0047] A. 生物表面

[0048] 通过将组合物施用于生物表面,本发明的组合物可用于减少或消除生物表面上的细菌生物膜。生物表面的非限制性实例包括伤口(包括慢性和急性伤口)、皮肤损伤、皮肤、粘膜、粘膜损伤、内脏器官、体腔、口腔、骨组织、肌肉组织、神经组织、眼组织、泌尿道组织、肺和气管组织、窦组织、耳组织、牙齿组织、牙龈组织、鼻组织、血管组织、心脏组织、上皮和上皮损伤、以及腹膜组织。慢性伤口的非限制性实例包括糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡和烧伤。急性伤口的非限制性实例包括切口和手术伤口。皮肤损伤和粘膜损伤的非限制性实例包括水疱、溃疡、磨损、疣、脓肿、擦伤以及皮肤和粘膜感染,如葡萄球菌或MRSA感染。皮肤损伤和粘膜损伤的实例公开在以引用的方式并入本文中的“《皮肤损伤描述(Description of Skin Lesions)》”,MacNeal,Robert J.,《在线默克诊疗手册专业版(the on-line Merck Manual Professional Version)》,2013年3月,<http://www.merckmanuals.com/professional/dermatologic-disorders/approach-to-the-dermatologic-patient/description-of-skin-lesions>。皮肤损伤可出现在表皮、嘴唇、耳道、头皮、角质层、甲床或生殖器上。粘膜损伤可出现在口腔粘膜、鼻粘膜、阴茎和阴道粘膜或肛门上。

[0049] B. 伤口的局部治疗

[0050] 通过将组合物局部施用于伤口,本发明的组合物可用于治疗被细菌生物膜感染或污染的伤口,包括慢性伤口和急性伤口。慢性伤口的非限制性实例包括糖尿病足溃疡、静脉溃疡、动脉溃疡、褥疮性溃疡、淤滞性溃疡、压迫性溃疡和烧伤。急性伤口的非限制性实例包括切口和手术伤口。在一些实施例中,伤口包括焦痂和/或坏死组织并且需要清创。在各种实施例中,除了减少或消除伤口中存在的细菌生物膜之外,所述组合物还具有双重功能并进一步清创需要清创的伤口。在其它实施例中,伤口不包括焦痂和/或坏死组织,并且不需

要清创。

[0051] C. 皮肤损伤和粘膜损伤的局部治疗

[0052] 通过将组合物局部施用于皮肤损伤或粘膜损伤,本发明的组合物可用于治疗被细菌生物膜感染或污染的皮肤损伤或粘膜损伤。皮肤损伤和粘膜损伤的非限制性实例包括水疱、溃疡、擦伤、疣、脓肿、擦伤以及皮肤和粘膜感染,如葡萄球菌或MRSA感染。皮肤损伤可出现在表皮、嘴唇、耳道、头皮、角质层、甲床或生殖器上。粘膜损伤可出现在口腔粘膜、鼻粘膜、阴茎和阴道粘膜或肛门上。在一些实施例中,粘膜损伤或皮肤损伤包括焦痂和/或坏死组织并且需要清创。在各种实施例中,除了减少或消除损伤中存在的细菌生物膜之外,所述组合物还具有双重功能并进一步清创需要清创的损伤。在其它实施例中,粘膜损伤或皮肤损伤不包括焦痂和/或坏死组织,并且不需要清创。

[0053] D. 其它生物表面的治疗

[0054] 通过将组合物施用于生物表面,本发明的组合物可用于治疗被细菌生物膜感染或污染的其它生物表面。其它生物表面的非限制性实例包括内脏器官、体腔、口腔、骨组织、肌肉组织、神经组织、眼组织、泌尿道组织、肺组织、气管组织、窦组织、耳组织、牙齿组织、牙龈组织、鼻组织、血管组织、心脏组织、上皮组织、上皮损伤、阴道组织和/或腹膜组织。

[0055] E. 非生物表面

[0056] 通过将组合物施用于非生物表面,本发明的组合物可用于减少或消除非生物表面上的细菌生物膜,所述非生物表面如制品,如医疗装置的表面。所述组合物还可用于防止生物膜在这些非生物表面上生长或形成。这些表面由于暴露于人体组织和/或伤口而易于生长或形成生物膜。医疗装置的非限制性实例包括泌尿道假体;泌尿道导管;腹膜导管、腹膜透析导管、用于血液透析和用于长期施用化学治疗剂的留置导管(希克曼导管);心脏植入物,如起搏器、人工心脏瓣膜、心室辅助装置以及合成血管移植物和支架;假体;经皮缝合线;以及气管和呼吸机插管。

[0057] 包括医疗装置在内的制品的表面可涂布本发明的组合物,以防止在制品表面上形成细菌生物膜。其它合适的制品包括电纺聚合物纤维和/或纳米纤维,如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)电纺纤维。在一些实施例中,在涂布之前,表面上不存在细菌生物膜。在其它实施例中,在涂布之前,表面上存在细菌生物膜。可以使用本领域中已知的用嗜热菌蛋白酶涂布制品的各种方法,例如喷雾或浸渍。另外的涂布方法还可包括将嗜热菌蛋白酶共价连接或吸附到非生物表面,包括电纺聚合物纤维和/或纳米纤维的表面。将蛋白质和酶共价连接或吸附到电纺聚合物纤维和/或纳米纤维上的方法公开于Ahn等人,《在严格条件下的电纺聚合物纳米纤维上的稳固胰蛋白酶涂层和其用于蛋白质消化的用途(Robust trypsin coating on electrospun polymer nanofibers in rigorous conditions and its uses for protein digestion)》,《生物技术与生物工程(Biotechnol. Bioeng.)》2010年12月;107: 917-923,和Polini等人,《用于生物工程应用的胶原蛋白功能化电纺聚合物纤维(Collagen-functionalised electrospun polymer fibers for bioengineering applications)》,《软物质(Soft Matter)》,2010年2月,6,1668-1674,这两篇文献均以引用的方式并入本文中。在一个实施例中,公开了一种处理制品表面以防止在所述表面上形成生物膜或降低在所述表面上形成生物膜的可能性的方法,所述方法包含用包含嗜热菌蛋白酶的组合物涂布所述表面。在另一个实施例中,所述制品是电纺聚合物纤维或纳米纤维,并

且所述包含嗜热菌蛋白酶的组合物共价连接或吸附到所述电纺聚合物纤维或纳米纤维上。

[0058] 实例

[0059] 实例1:用嗜热菌蛋白酶和胶原酶进行的体外生物膜研究

[0060] 进行体外分析以证明嗜热菌蛋白酶的细菌生物膜减少能力。在这一分析中,将金黄色葡萄球菌ATCC 6538悬浮在补充有0.25%葡萄糖的胰蛋白酶大豆肉汤的生长培养基中,以形成最佳的细菌生物膜。将悬浮液转移至无菌96孔培养板的孔中,并在37℃下孵育22小时,其中更换一次培养基。形成细菌生物膜后,将生长培养基更换为以不同浓度溶解在生长培养基中的嗜热菌蛋白酶溶液和以相同浓度溶解在生长培养基中的胶原酶溶液(酶浓度为0.000001mg/mL、0.00001mg/mL、0.0001mg/mL、0.001mg/mL、0.01mg/mL、0.1mg/mL、1.0mg/mL和10mg/mL)。16小时后,通过吸出酶溶液(酶+生长培养基)并彻底洗涤培养板,然后用结晶紫染色并记录570nm下的吸光度来定量剩余的附着细菌。还测试了不含酶的对照。结晶紫染色了剩余的附着细菌。与对照相比吸光度降低表明附着细菌减少,意味着存在的细菌生物膜减少。图1提供了这些数据的概述。如图1中所示,嗜热菌蛋白酶在0.00001mg/mL-10mg/mL的浓度下能有效减少细菌生物膜,并且在这些浓度下,在减少细菌生物膜方面比胶原酶更为有效。这一发现令人惊讶的本质是基于一般知识,即蛋白酶在减少或消除细菌生物膜方面并不被认为是非常有效的。

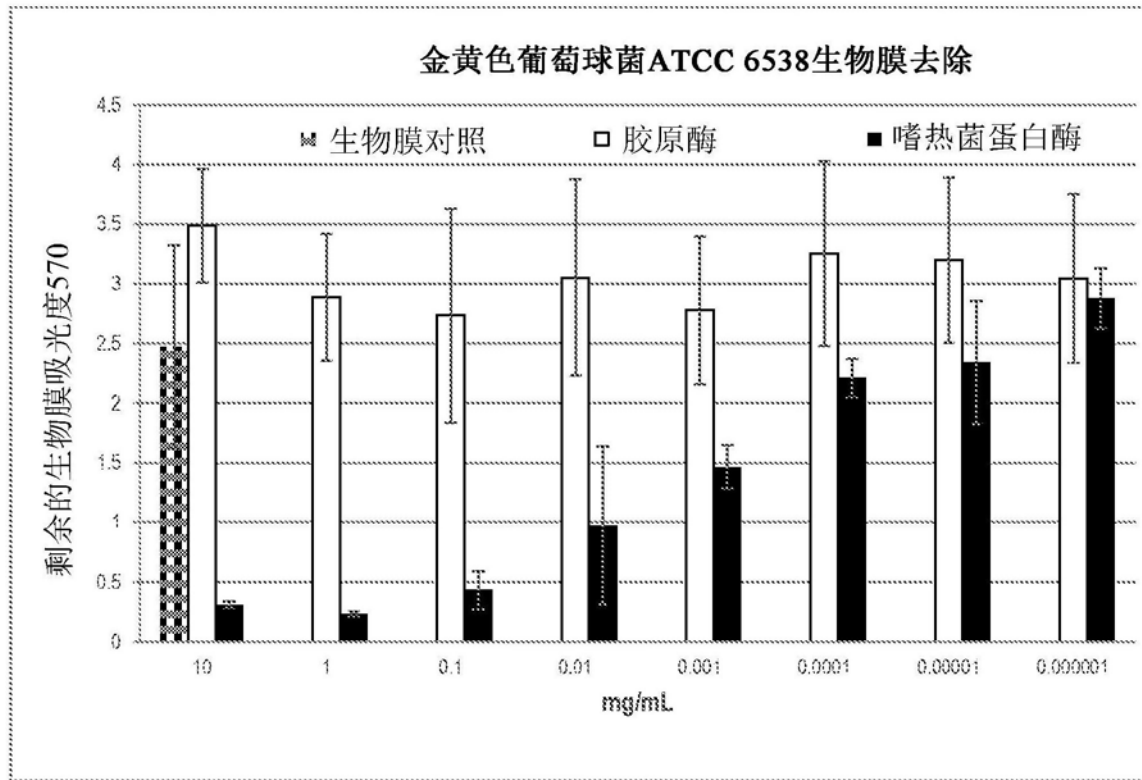


图1