



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/48 (2020.01); A61P 31/04 (2020.01); C12N 9/6427 (2020.01)

(21)(22) Заявка: 2018106490, 22.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2016

Дата регистрации:
06.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.07.2015 EP 15178209.1

(43) Дата публикации заявки: 26.08.2019 Бюл. № 24

(45) Опубликовано: 06.07.2020 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 26.02.2018

(86) Заявка РСТ:
EP 2016/067570 (22.07.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/017027 (02.02.2017)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ГУДМУНДСДОТТИР Агюста (IS),
ШЕВИНГ Рейнир (IS)

(73) Патентообладатель(и):

ЭНЗИМАТИКА АБ (SE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: GUDMUNDSDOTTIR A. et al.
"Potential use of atlantic cod trypsin in
biomedicine" // Biomed research international,
2013, p.1-11, doi: 10.1155/2013/749078.
TADAYUKI IWASE et al. "Staphylococcus
epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus
biofilm formation and nasal colonization" //
Nature, 2010, Vol.465, p.346-349.

(54) КОМБИНИРОВАННЫЕ ВИДЫ ТЕРАПИИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии и медицинской микробиологии. Предложены комбинированная терапия при лечении бактериальной биопленки, содержащей Streptococcus mitis и/или Streptococcus pneumoniae, которая включает использование полипептида с сериновой протеазой и один или более антибиотиков, выбранных из тетрациклина, цефотаксима, ванкомицина, эритромицина и оксациллина. Полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, выбранной из

трипсинов и химотрипсинов, и его применение для приготовления лекарственного средства. Предложен способ разрушения, ингибирования или предотвращения роста бактериальной биопленки in vitro, включающий воздействие на биопленку комбинированной терапии. Изобретения обеспечивают лечение и предотвращение инфекций, ассоциированных с ростом бактериальной биопленки. 4 н. и 9 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/48 (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)*C12N 9/76* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/48 (2020.01); A61P 31/04 (2020.01); C12N 9/6427 (2020.01)(21)(22) Application: **2018106490, 22.07.2016**(24) Effective date for property rights:
22.07.2016Registration date:
06.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:
24.07.2015 EP 15178209.1(43) Application published: **26.08.2019 Bull. № 24**(45) Date of publication: **06.07.2020 Bull. № 19**(85) Commencement of national phase: **26.02.2018**(86) PCT application:
EP 2016/067570 (22.07.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/017027 (02.02.2017)Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**GUDMUNDSDOTTIR, Agusta (IS),
SCHEVING, Reynir (IS)**

(73) Proprietor(s):

ENZYMATICA AB (SE)(54) **COMBINED THERAPIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medical microbiology.

SUBSTANCE: disclosed are a combined therapy in treating a bacterial biofilm containing *Streptococcus mitis* and/or *Streptococcus pneumoniae*, which involves using a polypeptide with a serine protease and one or more antibiotics selected from tetracycline, cefotaxime, vancomycin, erythromycin and oxacillin. A polypeptide having serine protease activity selected from trypsins

and chymotrypsins, and its use for preparing a medicinal agent. Disclosed is a method for destruction, inhibition or prevention of bacterial biofilm growth in vitro, involving a combination therapy on a biofilm.

EFFECT: inventions provide treatment and prevention of infections associated with growth of bacterial biofilm.

13 cl, 8 dwg, 2 ex

Область техники

Данное изобретение относится к комбинированным видам терапии, применяемым с целью лечебного воздействия и предотвращения образования бактериальных биопленок, таких как те, которые обнаруживаются при рецидивах инфекции верхних и нижних дыхательных путей.

Уровень техники

Биопленки представляют собой гетерогенные комплексные трехмерные матрицы, которые содержат популяцию микробных клеток, заключенных во внеклеточный матрикс (ВКМ). Биопленки - это не просто пассивный набор клеток, а структурно и динамически сложные биологические системы, которые образуют локальные экосистемы. По всей видимости, микробные клетки в популяции биопленки взаимодействуют и выполняют специальные функции. Путем взаимодействия и формирования защитного ВКМ биопленка обеспечивает микроорганизмам защищенный способ роста, который позволяет им колонизировать различные среды. Рост, обеспечиваемый биопленками, позволяет бактериям противодействовать иммунной системе хозяина, а также антибиотикам и подобным бактериостатическим и бактерицидным агентам. Таким образом, формирование биопленки позволяет бактериям в популяции проявлять резистентность к антибиотикам. Бактерии, растущие в биопленках, сложнее поддаются разрушению, чем их планктонные, т.е. свободно существующие, аналоги (см. del Pozo & Patel, 2007, Clin. Pharmacol. Ther. 82:204-9 и Stewart & Costerton, 2001, Lancet 358:135-8).

Биопленки могут состоять из моно- или полибактериальных популяций, прилипающих практически к любой биологической или небиологической поверхности. В таких многоклеточных популяциях клетки прилипают друг к другу. Большинство видов бактерий, а также археобактерии, простейшие, грибы и водоросли обладают способностью прилипать к поверхностям и друг к другу и формировать биопленочные структуры. Формирование биопленок обычно начинается с прикрепления свободно плавающих микроорганизмов к поверхности. При изменении экспрессии многочисленных генов, планктонная клетка подвергается фенотипическому сдвигу и переходит из режима свободного существования в режим роста биопленки. Первые клетки-колониисты сначала прилипают к поверхности посредством слабой обратимой адгезии, которая может стать сильнее благодаря формированию структур адгезии клеток, таких как пили. Сразу после начала колонизации, биопленка растет посредством сочетания деления клеток и появления и связывания новых бактерий. Первые клетки-колониисты способствуют приходу других клеток, обеспечивая более разнообразные адгезионные участки, и начинают строить матрицу, которая удерживает биопленку вместе.

Биопленки могут формироваться в самых разных условиях, например, в природе, в домашних, промышленных и клинических условиях, где они проявляют различные эффекты, которые могут быть положительными или отрицательными, в зависимости от контекста.

В условиях клиники биопленки образуют стойкие резервуары бактерий на поверхностях. Биопленки могут встречаться как непосредственно на поверхности тела пациента, так и косвенно на поверхности объектов ближайшего окружения пациента. Биопленки, которые присутствуют непосредственно на поверхности тела пациента, как правило, ассоциированы с рецидивирующими инфекциями, в то время как передача бактерий пациенту из объектов ближайшего окружения ассоциирована как с первичными, так и рецидивирующими инфекциями. Примерами биопленки в условиях

клиники являются биопленки на катетерах и других видах трубок, а также на имплантатах, таких как клапаны сердца и протезы суставов.

В промышленных условиях биопленки могут быть как определяющими, так и вредными. Например, в последних разработках эффективных микробных биореакторов, для генерации электричества применяются электроды, колонизированные биопленкой. Биопленки также были изучены как возможные биологические продуценты соединений, например, целлюлозы.

В международной патентной заявке WO 00/78332 описано применение сериновых протеаз рыб, включая трипсины и химотрипсин, полученные из трески, например, атлантической трески, для лечения и/или профилактики различных заболеваний и нарушений. Это, например, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, вызванные вирусами, бактериями и грибами, и заболевания, в патогенез которых вовлечен механизм связывания рецептора.

Augustin et al. (2004) и Gudmundsdottir et al. (2013) обсуждают возможность применения ферментов для удаления биопленок. Однако применение только ферментов недостаточно для разрушения бактерий, поскольку через некоторое время и в подходящей среде бактерии могут снова присоединяться к поверхности или любой близлежащей поверхности и восстанавливать биопленку (Augustin et al., 2004; Gudmundsdottir et al., 2013).

Продemonстрировано, что трипсин из трески облегчает удаление омертвевшей кожи путем процедуры удаления омертвевших частей и тем самым способствует нормальному процессу восстановления кожи. Основная проблема применения гидрофильных морских ферментов, таких как трипсин трески и другие сериновые протеазы, получаемые из объектов холодной окружающей среды, заключается в том, что такие ферменты чувствительны к инактивации теплом и поэтому относительно нестабильны при комнатной температуре (Stefansson et al., 2010). Применение трипсина трески в косметической промышленности, изделиях медицинского назначения и фармацевтических препаратах зависит от возможности повышения стабильности фермента.

Обнаружено, что биопленки вовлечены в патогенез самых разнообразных микробных инфекций в организме, что, согласно одной из оценок, составляет 80% всех инфекций (см. "Research on microbial biofilms (PA-03-047)", NIH, National Heart, Lung, and Blood Institute, 2002-12-20). Инфекционные процессы, в которые вовлечены биопленки, включают в себя такие общие патологии, как инфекции мочевых путей, инфекции катетера, инфекции среднего уха, обволакивание контактных линз, и менее распространенные процессы, но обуславливающие более высокую смертность, такие как эндокардит, инфекции при муковисцидозе, а также инфекции постоянных имплантированных изделий медицинского назначения, таких как протезы суставов и клапаны сердца.

Представляет интерес тот факт, что микроорганизмы, такие как бактерии, которые прикрепляются к поверхности и растут в виде биопленки, менее уязвимы для обычных антибиотиков. Сниженная восприимчивость к антибиотикам способствует сохранению биопленочных инфекций, таких как инфекции, ассоциированные с имплантированными изделиями медицинского назначения. Защитные механизмы, наблюдаемые при функционировании биопленок, по-видимому, отличаются от тех, которые отвечают за резистентность к антибиотикам. Предполагается, что в биопленках многослойную защиту обеспечивает слабое проникновение антибиотиков, ограничение наличия питательных веществ, медленный рост, адаптивные реакции на стресс и формирование

"спящих" клеток-персистеров.

Кроме того, культуры биопленки, как правило, являются высокорезистентными относительно их эрадикации с помощью химиотерапии без развития генотипической резистентности. Следовательно, количество существующих вариантов лечения ограничено, а разработка новых противомикробных агентов с антибиопленочной активностью приобретает все большее значение.

Следовательно, существует потребность в новых способах разрушения, ингибирования или предотвращения роста бактериальных биопленок (как в клинических, так и в неклинических условиях).

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предлагается комбинированная терапия для применения с целью воздействия на бактериальную биопленку у субъекта, включающая в себя (а) полипептид с активностью сериновой протеазы, и (b) одно или более соединений антибиотика.

Термин "комбинированная терапия" означает любую форму одновременного или параллельного лечения двумя или более терапевтическими агентами. Таким образом, такие виды терапии включают в себя раздельное введение полипептида и соединений антибиотика, а также предоставление одной композиции, содержащей оба терапевтических агента, смешанных вместе.

Термин "лечение" означает применение комбинированных терапевтических агентов как с лечебной, так и с профилактической целью. В отношении применения с лечебной целью, специалистам в данной области техники будет понятно, что комбинированная терапия может полностью удалить существующую бактериальную биопленку или может обеспечить частичный эффект (например, уменьшение размера бактериальной популяции, составляющей биопленку, и/или замедление роста бактериальной популяции, составляющей биопленку). Аналогично, в отношении применения с профилактической целью, комбинированная терапия может полностью предотвратить образование биопленки или может обеспечить только частичный эффект, такой как снижение вероятности и/или тяжести инфекции, вызванной бактериальной биопленкой.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения субъект является человеком. Кроме того, комбинированные виды терапии по настоящему изобретению могут также быть пригодны в ветеринарии, например, при воздействии на бактериальные биопленки у домашних и/или сельскохозяйственных животных (включая собак, кошек, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец и т.п.).

Антибиотики и сериновые протеазы (такие как трипсины) по отдельности не способны эффективно влиять на биопленочные инфекции. Несмотря на то, что антибиотики могут применяться для лечения системных и локальных бактериальных инфекций с разной эффективностью, такие соединения не могут легко проникать во внеклеточный матрикс биопленок и поэтому характеризуются ограниченной эффективностью при уничтожении бактерий в биопленках. Поэтому антибиотики не могут полностью осуществлять эрадикацию инфекций, обусловленных биопленками.

Сериновые протеазы (такие как трипсины) могут растворять внеклеточный матрикс бактерий и также способны выделять бактерии, прилипающие к биологическому или неорганическому материалу, и предотвращать их немедленное повторное присоединение. Тем не менее, бактерии не погибают при воздействии трипсином и со временем смогут восстановить свою способность прикрепляться к поверхностям.

Таким образом, при введении по отдельности, сериновые протеазы или антибиотики не способны полностью осуществлять эрадикацию биопленочных инфекций.

Настоящее изобретение связано с неожиданным открытием синергического эффекта на бактериальные биопленки, наблюдаемого в случаях, когда сериновые протеазы (такие как трипсины) и обычные соединения антибиотика вводят в комбинации.

Неожиданно было обнаружено, что эта выбранная комбинация активных агентов способна разрушать как внеклеточный матрикс, так и бактерии в биопленках синергетическим образом. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что, нарушая внеклеточный матрикс биопленок, сериновая протеаза позволяет антибиотикам проникать глубже в биопленку и достигать бактериальных клеток, которые находятся в ней. Это позволяет антибиотику проявлять свое влияние на бактерии, которое в противном случае ослабляется из-за барьерных эффектов внеклеточной матрицы.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что описанные в настоящем документе комбинированные виды терапии можно применять для разрушения, ингибирования или предотвращения роста микробной биопленки в любой среде, в которой могут быть обнаружены такие биопленки. Таким образом, биопленка может быть связана либо с инертной подложкой, либо с живой подложкой.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка связана с живой подложкой. Например, биопленка может расти или быть восприимчивой к росту на поверхности тела человека или животного.

Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются комбинированные виды терапии, как определено выше, для применения в лечении или профилактике патологического состояния, ассоциированного с наличием или ростом биопленки.

Например, комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения или профилактики нарушения или патологического состояния, ассоциированного с ростом микробной биопленки, в одной из следующих областей, расположенных внутри организма:

- дыхательные пути (например, рецидивирующие бактериальные инфекции верхних и/или нижних дыхательных путей);
- мочевыводящие пути (например, цистит);
- синусы (например, хронический синусит);
- ухо (например, инфекции среднего уха);
- сердце (например, эндокардит);
- простата (например, хронический бактериальный простатит);
- кости (например, остеомиелит);
- легкие (например, инфекции при муковисцидозе, такие как пневмония);
- почки (например, инфекции при камнях в почках и при перитонеальном диализе);
- и/или
- кожа.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка связана с инертной подложкой. Таким образом, биопленка может расти или быть восприимчивой к росту на поверхности изделия медицинского назначения, имплантированного или иным образом вставленного в организм человека или животного.

Например, комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения или профилактики инфекции, ассоциированной с ростом микробной биопленки, на одной из следующих внутренних поверхностей, расположенных внутри организма:

- катетер (например, для внутрисосудистых или мочевых путей);
- стент (например, коронарный стент);

- шунт (например, цереброспинальный шунт);
- интубационная или трахеотомическая трубка;
- медицинские изделия, применяемые в офтальмологии (например, контактные линзы, склеральные зажимы и внутриглазные линзы);
- 5 - протез сустава (т.е. артропластика и имплантация других ортопедических изделий).
- искусственный клапан сердца; и/или
- имплантат молочной железы.

Таким образом, следует понимать, что комбинированные виды терапии, описанные в настоящем документе, особенно пригодны для лечения и профилактики

10 внутрибольничных инфекций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка содержит или состоит из грамположительных и/или грамположительных бактерий.

Таким образом, бактерии могут быть грамотрицательными бактериями, такими как те, которые выбраны из группы, состоящей из стафилококков или стрептококков.

15 Например, бактерии могут представлять собой стафилококки, такие как *Staphylococcus aureus* (например, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, MRSA). В альтернативном варианте бактерии могут представлять собой стрептококки, такие как *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sanguis*.

Бактерии также могут быть грамотрицательными бактериями, такими как *Legionella*.

20 В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка содержит бактерии, независимо выбранные из группы, состоящей из *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenza*, метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, чувствительного к метициллину *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*,

25 *Legionella pneumophila*, *Clostridium difficile*, и любых их комбинаций.

Таким образом, указанная биопленка может содержать бактерии, независимо выбранные из *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также *Haemophilus influenza* или их комбинаций.

Например, биопленка может содержать или состоять из стрептококков, таких как

30 *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae*.

Комбинированные виды терапии по настоящему изобретению вводят субъекту в фармацевтически эффективной дозе. В данном контексте термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" или "терапевтически эффективное" относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический

35 эффект при данном патологическом состоянии и схеме введения (например, разрушение, уменьшение размера или замедление роста бактериальной биопленки). Это предопределенное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемой добавкой и разбавителем, т.е. носителем или несущей средой для введения. Кроме того, предполагается, что этот

40 термин означает количество, достаточное для уменьшения и, наиболее предпочтительно, предотвращения клинически значимой недостаточности активности, функции и ответа хозяина. В альтернативном варианте терапевтически эффективное количество является достаточным, чтобы вызвать улучшение клинически значимого патологического состояния в организме хозяина. Как понятно специалистам в данной области техники,

45 количество соединения может варьироваться в зависимости от его специфической активности. Пригодные количества доз могут содержать заранее определенное количество активной композиции, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым разбавителем. В способах и

применении для изготовления композиций по настоящему изобретению предлагается терапевтически эффективное количество активного компонента. Терапевтически эффективное количество может быть определено обычным квалифицированным специалистом в области медицины или ветеринарии на основании данных пациента, таких как возраст, вес, пол, патологическое состояние, осложнения, другие заболевания и т.д., как хорошо известно в определенной области. Введение фармацевтически эффективной дозы может быть осуществлено как путем однократного введения в виде индивидуальной одной дозы, так и нескольких меньших доз, а также путем множественного введения разделенных доз с определенными интервалами. В альтернативном варианте дозу можно вводить в виде непрерывной инфузии в течение длительного периода.

Первым важным компонентом комбинированных видов терапии по настоящему изобретению является полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы.

Термин "полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы" включает как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе каталитические полипептиды, способные расщеплять пептидные связи в белках, в которых серин служит нуклеофильной аминокислотой, в активном месте полипептида (как определено в ЕС номер 3.4.21). Активность сериновой протеазы может быть химотрипсиноподобной (т.е. активность трипсина, химотрипсина и эластазы) или субтилизинподобной.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, проявляет активность трипсина. Например, полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может представлять собой встречающийся в природе трипсин, как эукариотического, так и прокариотического происхождения, или мутантную версию такого трипсина. В частности, в настоящее изобретение включены трипсины, адаптированные к холоду, такие как трипсин из атлантической трески (*Gadus morhua*), атлантического и тихоокеанского лосося (например, *Salmo salar* и виды *Oncorhynchus*) и аляскинского минтая (*Theragra chalcogramma*), а также их мутированные формы (как описано ниже).

Три основных изофермента трипсина были охарактеризованы у атлантической трески и обозначенные как трипсин I, II и III (см. публикацию Ásgeirsson et al., 1989, Eur. J. Biochem. 180: 85-94, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Например, см. номер доступа в GenBank ACO90397.

Кроме того, атлантическая треска экспрессирует два основных изозима химотрипсина, обозначаемых как химотрипсин A и B (см. публикацию Ásgeirsson & Bjarnason, 1991, Comp. Biochem. Physiol. B 998: 327-335, описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Например, см. номер доступа в GenBank CAA55242.1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 70% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью трипсина I, полученного из атлантической трески (*Gadus morhua*), т.е. SEQ ID NO: 1:

16

I

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGEHHR

VNEG

79

I

TEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMCTV

SG

141

I

WGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQGDS

5 GGPV

200

I

VCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY

[SEQ ID NO: 1]

10 (в которой аминокислотная последовательность и нумерация соответствуют записи "2EEK" в базе данных белковых структур [PDB])

Как и многие протеазы, трипсин I, полученный из атлантической трески, продуцируется как неактивный предшественник или зимоген, содержащий последовательность пропептида (или "активации"), которая отщепляется для
15 образования зрелого активного трипсина. Исходный продукт экспрессии для трипсина также содержит сигнальную последовательность, которая удаляется после экспрессии.

Последовательность зимогена для трипсина I, полученного из атлантической трески, включая сигнальную последовательность, приведена ниже как SEQ ID NO: 2 (и соответствует номеру доступа в базе данных Uniprot P16049-1):

20 10 20 30 40 50

MKSLIFVLLL GAVFAEEDKI VGGYECTKHS QAHQVSLNSG YHFCGGSLVS

60 70 80 90 100

KDWVVSAAHC YKSVLRVRLG EHHIRVNEGT EQYISSSSVI RHPNYSSYNI

110 120 130 140 150

25 NNDIMLIKLT KPATLNQYVH AVALPTECAA DATMCTVSGW GNTMSSVADG

160 170 180 190 200

DKLQCLSLPI LSHADCANSY PGMITQSMFC AGYLEGGKDS CQGDSSGGPVV

210 220 230 240

CNGVLQGVVS WGYGCAERDH PGVYAKVCVL SGWVRDTMAN Y

30 [SEQ ID NO: 2]

в которой:

Сигнальный пептид = аминокислоты с 1 по 13 (подчеркнуты)

Пропептид = аминокислоты с 14 по 19 (полужирный курсив)

Зрелый трипсин = аминокислоты с 20 по 241

35 В данном контексте термин "аминокислота" включает в себя стандартные двадцать генетически кодированных аминокислот и их соответствующие стереоизомеры в "d"-форме (по сравнению с естественной "l"-формой), омега-аминокислоты и другие встречающиеся в природе аминокислоты, нестандартные аминокислоты (например, α , α -дизамещенные аминокислоты, N-алкил-аминокислоты, и т.д.) и химически
40 дериватизированные аминокислоты (см. ниже).

Когда аминокислота конкретно перечисляется, например, "аланин" или "Ala" или "A", этот термин относится как к l-аланину, так и к d-аланину, если явно не указано иное. Другие нестандартные аминокислоты также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по настоящему изобретению, если желаемое
45 функциональное свойство у полипептида сохраняется. Для указанных полипептидов каждый кодированный аминокислотный остаток, где это необходимо, представлен однобуквенным обозначением, соответствующим тривиальному названию обычной аминокислоты.

Согласно конвенции, аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, описываются в направлении от N-конца до С-конца.

Как правило, полипептиды, применяемые в композициях по настоящему изобретению, содержат или состоят из L-аминокислот.

5 Полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения
10 полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может содержать или состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Однако полипептид может альтернативно содержать или состоять из аминокислотной последовательности, которая является мутантом или вариантом SEQ ID NO: 1. Под термином "вариант" понимают, что полипептид не характеризуется 100% идентичностью
15 аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, т.е. одна или более аминокислот SEQ ID NO: 1 должны быть мутированы. Например, полипептид может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 50% идентичностью с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 1, более предпочтительно по меньшей мере 60%, 70% или 80% или 85% или 90% идентичностью
20 с указанной последовательности и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с указанной аминокислотной последовательностью. Таким образом, аминокислота в указанном положении может быть удалена, замещена или может быть местом вставки/добавления одной или более аминокислот. Специалистам в данной области техники будет понятно, что замены
25 могут быть консервативными или неконсервативными.

Процент идентичности можно определять, например, с помощью программы LALIGN (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357, описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки) на сайте обеспечения ExPASy: (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html), используя в качестве параметров вариант
30 глобального выравнивания, матрицу замен BLOSUM62, штраф на открытие гэпа -14, штраф за продолжение гэпа -4. В альтернативном варианте процентную идентичность последовательности между двумя полипептидами можно определить с помощью соответствующих компьютерных программ, например программы GAP, разработанной Группой генетического программирования (Genetic Computing Group) Университета
35 штата Висконсин, при этом следует понимать, что процентную идентичность вычисляют по отношению к полипептидам, последовательность которых была выровнена оптимально.

В альтернативном варианте выравнивание осуществляют с помощью программы Clustal W (как описано в публикации Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22: 4673-4680,
40 которая включена в настоящее описание посредством ссылки). Применяемые параметры могут быть следующими:

- Параметры быстрого парного выравнивания: размер участка максимального совпадения (K-кратность (слова)); 1, размер окна; 5, штраф за гэпы; 3, количество верхних диагоналей; 5. Метод подсчета: x процент.
- 45 - Множественные параметры выравнивания: штраф за открытие гэпа; 10, штраф за продолжение гэпа; 0,05.
- Матрица замен: BLOSUM.

В альтернативном варианте для определения локальных выравниваний

последовательностей можно применять программу BESTFIT.

Таким образом, полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может быть вариантом SEQ ID NO: 1, таким как варианты, описанные в международной патентной заявке № PCT/GB2015/051006 (публикация №. WO 2015/150799) в Enzymatica AB.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептид, имеющий активность сериновой протеазы, может альтернативно содержать или состоять из фрагмента любой из вышеуказанных определенных аминокислотных последовательностей, где фрагмент проявляет антибактериальную активность.

Термин "фрагмент" включает по меньшей мере 5 смежных аминокислот любой из вышеуказанных аминокислотных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь ими, SEQ ID NO: 1 или 2. Например, фрагмент может содержать по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 или более смежных аминокислот любой из вышеуказанных аминокислотных последовательностей.

Способы идентификации фрагментов вышеописанных полипептидов сериновой протеазы, которые сохраняют антимикробную (т.е. антибактериальную) активность хорошо известны в данной области техники. Например, ряд различных фрагментов можно генерировать с помощью известных рекомбинантных методик с применением методов экспрессии, описанных в WO 2015/150799, а затем приводить в контакт *in vitro* с репрезентативными микроорганизмами (такими как бактериальные штаммы, вирусы и/или грибковые штаммы) с целью определения, какой из фрагментов ингибирует (частично или полностью) рост и/или пролиферацию указанных микроорганизмов.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, содержит или состоит из аминокислотной последовательности встречающейся в природе сериновой протеазы. Таким образом, полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может состоять из аминокислотной последовательности встречающегося в природе трипсина, либо эукариотического, либо прокариотического происхождения. В частности, в настоящее изобретение включены трипсины, адаптированные к холоду, такие как трипсин из атлантической трески (*Gadus morhua*), атлантического и тихоокеанского лосося (например, *Salmo salar* и виды *Oncorhynchus*) и аляскинского минтая (*Theragra chalcogramma*). Например, полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, может содержать или состоять из аминокислоты SEQ ID NO: 1.

Такие встречающиеся в природе сериновые протеазы можно выделить из исходного организма (например, атлантической трески) или можно экспрессировать рекомбинантно.

Таким образом, специалистам в данной области техники будет понятно, что такие встречающиеся в природе полипептиды, обладающие активностью сериновой протеазы, по настоящему изобретению должны быть представлены в форме, отличной от той, в которой они встречаются в природе. Например, полипептид по настоящему изобретению может состоять из аминокислотной последовательности встречающегося в природе эукариотического трипсина, но не содержит гликозилирующих фрагментов, присутствующих на белке, поскольку он экспрессируется в природных условиях.

Полипептидный компонент может быть составлен в различных концентрациях в зависимости от эффективности/токсичности применяемой сериновой протеазы. Предпочтительно композиция содержит активный агент в концентрации по меньшей мере 0,001 мкМ, например, по меньшей мере 0,01 мкМ, по меньшей мере 0,1 мкМ, по

меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 500 мкМ. В целях удобства состав содержит активный агент в концентрации до 1 мМ, например до 500 мкМ, до 100 мкМ, до 10 мкМ, до 1 мкМ, до 0,1 мкМ или до 0,01 мкМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, присутствует в составе в концентрации от 0,001 до 10 мкМ. Таким образом, терапевтическая композиция может содержать количество полипептида, достаточное для уничтожения или замедления роста бактерий в популяции биопленки.

В одном варианте осуществления этого аспекта активность полипептида, обладающего активностью сериновой протеазы (например, трипсина трески), составляет от 0,001 Ед/г до 32 Ед/г.

Еще одним важным компонентом комбинаций терапии по настоящему изобретению является одно или более соединений антибиотика.

Можно применять любое известное соединение антибиотика. Например, одно или более соединений антибиотика можно выбрать из группы, состоящей из амоксициллина, ампициллина, азитромицина, карбапенемов, цефотаксима, цефтриаксона, цефуроксима, цефалоспоринов, хлорамфеникола, ципрофлоксацина, клиндамицина, далацина, дальфопристина, даптомицина, доксициклина, эртапенема, эритромицина, фторхинолонов, меропенемов, метронидазола, миноциклина, моксифлоксацина, нафциллина, оксациллина, пенициллина, хинупристина, рифампина, сульфаметоксазола, тейкопланина, тетрациклина, триметоприма, ванкомицина, бацитрацина и полимиксина В или их смеси.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения одно или более соединений антибиотика являются/выбраны из группы, состоящей из тетрациклина, цефотаксима, ванкомицина, эритромицина и оксациллина.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что комбинации терапевтических средств по настоящему изобретению могут содержать одно соединение антибиотика или множество соединений антибиотика.

Концентрация антибиотиков, применяемых в комбинированных видах терапии по настоящему изобретению, будет зависеть от конкретного применяемого антибиотика и характеристики и/или местоположения биопленки, подлежащей воздействию, в соответствии с общими знаниями в данной области. Как правило, антибиотик готовят в концентрации от 0,1 до 5% (по массе), например, от 0,1 до 1% (по массе).

Во втором аспекте настоящего изобретения, связанном с этим, предлагается полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы для применения с целью воздействия на бактериальную биопленку у субъекта, при этом полипептид предназначен для применения в комбинации с одним или более соединениями антибиотика.

В третьем аспекте настоящего изобретения, связанном с этим, предлагается полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, для приготовления лекарственного средства с целью воздействия на бактериальную биопленку у субъекта, при этом полипептид предназначен для применения в комбинации с одним или более соединениями антибиотика.

Примеры пригодных полипептидов, обладающих активностью сериновой протеазы, и соединений антибиотика для применения согласно второму и третьему аспектам настоящего изобретения подробно описаны выше.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (а) полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, и (б) одно или более соединений антибиотика вместе с фармацевтически приемлемым

буфером, вспомогательным веществом, разбавителем или носителем.

Примеры пригодных полипептидов, обладающих активностью сериновой протеазы, и соединений антибиотика для применения согласно четвертому аспекту настоящего изобретения подробно описаны выше.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, находится в концентрации по меньшей мере 0,001 мкМ, например, по меньшей мере 0,01 мкМ, по меньшей мере 0,1 мкМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 500 мкМ. В целях удобства композиция содержит активный агент в концентрации до 1
10 мМ, например до 500 мкМ, до 100 мкМ, до 10 мкМ, до 1 мкМ, до 0,1 мкМ или до 0,01 мкМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, присутствует в композиции в концентрации от 0,001 до 10 мкМ.

В случае применения трипсина, получаемого из трески, его концентрация в
15 композициях по настоящему изобретению составляет от 0,001 Ед/г до 32 Ед/г (т.е. измеряется в единицах активности на грамм конечной композиции).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения одно или более соединений антибиотика присутствует/присутствуют в концентрации от 0,1 до 5 масс.%, например от 0,1 до 2 масс.%, от 0,5 до 1,5 масс.% и предпочтительно 1 масс.%

20 Фармацевтические композиции можно получить с помощью способа, известного в данной области техники, который обеспечивает достаточную устойчивость к хранению и пригодность композиции для введения людям и животным. Например, терапевтические композиции могут быть лиофилизированы, например, с помощью сушки
вымораживанием, сушки распылением, охлаждения распылением или при образовании
25 частиц из комплекса сверхважных частиц.

Под термином "фармацевтически приемлемый" подразумевают нетоксичный материал, который не снижает эффективность трипсиновой активности полипептида по настоящему изобретению. Такие фармацевтически приемлемые буферы, носители или вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники (см.
30 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) и справочник фармацевтических вспомогательных веществ, 3-е издание, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000), описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

Термин "буфер" означает водный раствор, содержащий кислотно-основную смесь
35 для стабилизации pH. Примерами буферов являются Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, фосфат, карбонат, ацетат, цитрат, гликолят, лактат, борат, ACES, ADA, тартрат, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, какодилат, CHES, DIPSO, EPPS, этаноламин, глицин, HEPPSO, имидазол, имидазолелактиновая кислота, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO и TES.

40 Термин "разбавитель" предназначен для обозначения водного или неводного раствора с целью разбавления пептида в терапевтическом препарате. Разбавитель может представлять собой один или более из следующих элементов: солевой раствор, вода, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, этанол или масла (такими как сафлоровое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло или кунжутное масло).

45 "Вспомогательное вещество" может представлять собой один или более из следующих элементов: углеводы, полимеры, липиды и минералы. Примеры углеводов включают в себя лактозу, глюкозу, сахарозу, маннит и циклодекстрины, которые добавляют к композиции, например, для облегчения лиофилизации. Примерами полимеров являются

крахмал, простые эфиры целлюлозы, карбоксиметилцеллюлоза целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, этилгидроксиэтилцеллюлоза, альгинаты, карагенаны, гиалуроновая кислота и их производные, полиакриловая кислота, полисульфонат, полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, сополимеры
 5 полиэтиленоксида/полипропиленоксида, поливиниловый спирт/поливинилацетат различной степени гидролиза, а также поливинилпирролидон с различной молекулярной массой, которые добавляются к композиции, например, для контроля вязкости, для достижения биоадгезии или для защиты липида от химического и протеолитического расщепления. Примерами липидов являются жирные кислоты, фосфолипиды, моно-,
 10 ди- и триглицериды, церамиды, сфинголипиды и гликолипиды, все из которых имеют различную длину ацильной цепи и насыщенность, яичный лецитин, соевый лецитин, гидрогенизированное яйцо и соевый лецитин, которые добавляются к композициям с той же целью, что и полимеры. Примерами минералов являются тальк, оксид магния, оксид цинка и оксид титана, которые добавляются в композицию для получения
 15 преимуществ, таких как уменьшение накопления жидкости или получение желательных свойств пигмента.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид может быть предложен вместе со стабилизатором, таким как хлорид кальция.

Кроме того, в композиции по настоящему изобретению могут быть включены
 20 абсорбенты ультрафиолетовых лучей (например, N, N-диметил ПАВА октиловый эфир, октилметилциннамат, бутилметоксибензоилметан, моно-2-этил ди-р-метоксикоричной кислоты, глицерил капроновой кислоты, 2-гидрокси-4-метокси бензофенон, 2-гидрокси-4-метокси бензофенон сульфонат-5-натрия), низшие спирты (например, этиловый спирт, изопропиловый спирт), консерванты (например, метилпарабен, этилпарабен,
 25 пропилпарабен, бутилпарабен, феноксиэтанол), бактерициды (например, хлоргексидин, гидрохлорид, трихлоркарбанилид, триклозан, пиритион цинка), серебро (например, элементарное серебро, оксид серебра, нитрат серебра, сульфадiazин серебра, наночастицы серебра), красящие агенты (например, красители, пигменты), ароматизаторы (например, ментол, камфора, тимол, эвкалиптол), порошки, отдушки
 30 (например, эфирные масла, отдушки животного происхождения, синтетические отдушки), витамины (например, витамин А и его производные, витамин Е и его производные, витамин С и его производные, пантотеновая кислота, витамин Н, витамин В и его производные), мочевины, водорастворимые полимеры (например, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиполимер, ксантановая камедь,
 35 гиалуроновая кислота), буферные агенты (например, глутамат натрия, аргинин, аспарагиновая кислота, лимонная кислота, цитрат натрия, молочная кислота, лактат натрия), антибиотик, противогрибковые, противовирусные и противопаразитарные препараты.

Полипептиды, обладающие активностью сериновой протеазы, могут быть включены
 40 в любой тип терапевтической композиции, известной в данной области техники и являющейся пригодной для доставки полипептидных агентов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полипептид и соединение (соединения) антибиотика можно просто растворить в воде, солевом растворе, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, этаноле или маслах (таких как сафлоровое масло,
 45 кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло или кунжутное масло), трагантовой камеди и/или различных буферах. Например, когда полипептид предназначен для перорального введения (например, для распыления во рту), терапевтическая композиция может содержать полипептид, растворенный в воде,

глицерине и ментоле. Типовой препарат в форме спрея для полости рта продается в Скандинавии как ColdZyme® (от компании Enzymatica AB, г. Лунд, Швеция).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается протеазный полипептид и соединение (соединения) антибиотика, как описано выше, в осмотически активном растворе. Например, полипептид и соединение (соединения) антибиотика могут быть приготовлены в глицероле или глицерине. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что такие осмотически активные растворы облегчают перемещение жидкости изнутри микробных клеток во внеклеточную среду. Считается, что это, в свою очередь, способствует терапевтическому действию полипептидов по настоящему изобретению, в результате чего создается тонкий активный барьер, который ингибирует (по меньшей мере частично) поглощение микробных клеток, таких как бактерии и вирусы эпителиальными клетками хозяина, например, в ротоглотке.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтические композиции по настоящему изобретению могут быть в форме липосомы, в которой полипептид и соединение (соединения) антибиотика объединены, в дополнение к другим фармацевтически приемлемым носителям с амфипатическими агентами, такими как липиды, которые находятся в агрегированных формах в виде мицелл, нерастворимых монослоев и жидких кристаллов. Пригодные липиды для липосомальной композиции включают, без ограничения, моноглицериды, диглицериды, сульфатиды, лизолецитин, фосфолипиды, сапонин, желчные кислоты и тому подобное. Пригодные липиды также включают в себя липиды, модифицированные поли(этиленгликолем) в полярной головке молекулы, для продления времени циркуляции в кровотоке. Со способами получения таких липосомальных композиций можно ознакомиться, например, в патенте США 4235871, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Терапевтические композиции по настоящему изобретению могут также находиться в форме биоразлагаемых микросфер. Алифатические полиэфиры, такие как поли(молочная кислота) (PLA), поли(гликолевая кислота) (PGA), сополимеры PLA и PGA (PLGA) или поли(капролактон) (PCL) и полиангидриды, широко применяются в качестве биоразлагаемых полимеров при изготовлении микросфер. Препараты таких микросфер можно найти в патенте США 5854551 и EP 0 213 303, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтические композиции по настоящему изобретению представлены в виде полимерных гелей, в которых полимеры, такие как крахмал, простые эфиры целлюлозы, целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, альгинаты, карагенан, гиалуроновая кислота и их производные, полиакриловая кислота, поливинилимидазол, полисульфонат, полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, сополимеры полиэтиленоксида/полипропиленоксида, поливиниловый спирт/поливинилацетат с разной степенью гидролиза и поливинилпирролидон применяют для сгущения раствора, содержащего пептид. Полимеры могут также содержать желатин или коллаген.

Следует понимать, что терапевтические композиции по настоящему изобретению могут включать в себя ионы и определенное значение pH для потенцирования действия полипептидов. Кроме того, композиции могут быть подвергнуты обычным процессам обработки, таким как стерилизация, и/или могут содержать обычные адъюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, буферы, наполнители, и т.д.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

терапевтическая композиция содержит полипептид и соединение (соединения) антибиотика в трис-фосфатном буфере вместе с одним или более веществами, выбранными из группы, состоящей из ЭДТК, ксилита, сорбита, пропиленгликоля и глицерола.

5 Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить любым пригодным способом, известным специалистам в данной области техники. Таким образом, возможные пути введения включают в себя ингаляционный, буккальный, парентеральный (внутривенный, подкожный, интратекальный и внутримышечный), топический, окулярный, назальный, легочный, парентеральный, вагинальный и
10 ректальный пути. Также возможно введение из имплантатов.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтические композиции вводят парентерально, например, внутривенно, интрацеребровентрикулярно, внутрисуставно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально, интравентрикулярно, интраспинально, интракраниально,
15 внутримышечно или подкожно или их можно вводить с помощью инфузий. Указанные композиции удобно применять в виде стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или глюкозы для того, чтобы получить раствор, являющийся изотоничным по отношению к крови. Водные растворы должны быть соответствующим образом забуференными
20 (предпочтительно до pH от 3 до 9), если это необходимо. Приготовление пригодных парентеральных составов в стерильных условиях легко осуществить с помощью стандартных фармацевтических методов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Составы, пригодные для парентерального введения, включают в себя водные и
25 неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя
30 суспендирующие агенты и загустители. Указанные составы могут быть представлены в однократных или многократных контейнерах, например, в герметичных ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные
35 растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных выше.

В альтернативном варианте терапевтические композиции можно вводить интраназально или путем ингаляции (например, в форме аэрозольного распыления из
40 контейнера под давлением, насоса, распылителя или небулайзера с применением пригодного пропеллента, такого как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, гидрофторалкан, такой как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134A3 или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан (HFA 227EA3), диоксид углерода или другой пригодный газ). В случае применения аэрозоля под давлением, единица дозы может
45 быть определена с помощью предусмотренного клапана для подачи измеренного количества. Контейнер под давлением, насос, распылитель или небулайзер могут содержать раствор или суспензию активного полипептида, например, со смесью этанола и пропеллента в качестве растворителя, который может дополнительно содержать
смазывающее вещество, например, триолеат сорбитана. Капсулы и картриджи (изготовленные, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуфляторе

могут быть изготовлены так, чтобы содержать порошковую смесь соединения по настоящему изобретению и пригодную порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Предпочтительно полипептид предлагается в форме, пригодной для доставки на
5 слизистую оболочку дыхательных путей.

В пятом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения солидной опухоли у субъекта, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества (а) полипептида, обладающего активностью сериновой протеазы, и (b) одного или более соединений антибиотика.

10 Примеры пригодных полипептидов, обладающих активностью сериновой протеазы, и соединений антибиотика для применения согласно пятому аспекту настоящего изобретения подробно описаны выше.

Термин "лечение" означает применение комбинированных терапевтических агентов как с лечебной, так и с профилактической целью. Специалистам в данной области
15 техники будет понятно, что комбинированная терапия может полностью удалить бактериальную биопленку или может обеспечить частичный эффект (например, уменьшение размера бактериальной популяции, составляющей биопленку, и/или замедление роста бактериальной популяции, составляющей биопленку).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения субъект является
20 человеком. Кроме того, способы по настоящему изобретению могут также быть пригодны для применения в ветеринарии, например, при воздействии на бактериальные биопленки у домашних и/или сельскохозяйственных животных (включая собак, кошек, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец и т.п.).

Специалистам в данной области техники будет понятно, что описанные в настоящем
25 документе способы можно применять для разрушения, ингибирования или предотвращения роста микробной биопленки в любой среде, в которой могут быть обнаружены такие биопленки. Таким образом, биопленка может быть связана либо с инертной подложкой, либо с живой подложкой.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка связана с
30 живой подложкой (см. выше). Например, биопленка может расти или быть восприимчивой к росту на поверхности тела человека или животного. Таким образом, в настоящем изобретении предлагается соединение как определено выше, для применения в лечении или профилактике патологического состояния, ассоциированного с наличием или ростом биопленки. Например, субъект может иметь или быть
35 восприимчивым к инфекции верхних и/или нижних дыхательных путей, ассоциированной с образованием биопленки.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка связана с инертной подложкой (см. выше). Таким образом, биопленка может расти или
40 быть восприимчивой к росту на поверхности изделия медицинского назначения, имплантированного или иным образом вставленного в организм человека или животного.

Таким образом, следует понимать, что способы, описанные в настоящем документе, особенно пригодны для лечения и профилактики внутрибольничных инфекций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка содержит или
45 состоит из грамположительных и/или грамположительных бактерий.

Таким образом, бактерии могут быть грамотрицательными бактериями, такими как те, которые выбраны из группы, состоящей из стафилококков или стрептококков. Например, бактерии могут представлять собой стафилококки, такие как *Staphylococcus*

aureus (например, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, MRSA). В альтернативном варианте бактерии могут представлять собой стрептококки, такие как *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sanguis*.

Бактерии также могут быть грамотрицательными бактериями, такими как *Legionella*.

5 В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биопленка содержит бактерии, независимо выбранные из группы, состоящей из *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, чувствительного к метициллину *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*,
10 *Legionella pneumophila*, *Clostridium difficile* и любых их комбинаций.

Например, биопленка может содержать или состоять из стрептококков, таких как *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae*.

В способах по настоящему изобретению комбинированная терапия будет вводиться пациенту в фармацевтически эффективной дозе. В данном контексте термин
15 "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" или "терапевтически эффективное" относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект при данном патологическом состоянии и схеме введения (см. выше).

В шестом аспекте настоящего изобретения предлагается изделие медицинского назначения для доставки субъекту эффективного количества препарата
20 комбинированной терапии согласно первому аспекту настоящего изобретения, причем изделие медицинского назначения содержит резервуар с композицией согласно четвертому аспекту настоящего изобретения и средство для высвобождения указанной композиции из изделия медицинского назначения.

25 Например, изделие медицинского назначения может представлять собой устройство для распыления в полости рта или носа, пригодное для доставки препарата комбинированной терапии согласно первому аспекту настоящего изобретения на слизистую оболочку дыхательных путей.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается
30 имплантируемое изделие медицинского назначения, которое пропитывается, покрывается или иным образом обрабатывается композицией, как описано в настоящем документе.

Например, изделие медицинского назначения представляет собой имплантируемое изделие медицинского назначения, выбранное из группы, состоящей из внутрисосудистых
35 устройств, катетеров, шунтов, интубационных и трахеотомических трубок, медицинских изделий, применяемых в офтальмологии, суставных протезов, искусственных клапанов сердца и имплантатов молочной железы. Под термином "имплантируемым изделием медицинского назначения" следует понимать изделия, прикрепленные к внутренней или внешней поверхности тела, например, контактные линзы.

40 Предпочтительно, чтобы имплантируемое изделие медицинского назначения было запечатано в герметичный и стерильный контейнер перед применением.

В седьмом аспекте изобретения предлагается способ разрушения, ингибирования или предотвращения роста бактериальной биопленки *in vitro*, причем способ включает в себя воздействие на биопленку (или поверхность, на которой следует предотвратить
45 рост биопленки) комбинированной терапией согласно первому аспекту настоящего изобретения. Например, описанные выше композиции по настоящему изобретению можно также применять в виде стерилизующего или промывочного раствора для предотвращения роста микробных биопленок на поверхности или субстрате, например,

в бытовых условиях (например, на кухонных рабочих поверхностях, в душевых кабинах, в трубах, на полу и т.д.) или в коммерческой или промышленной среде (например, в системах охлаждения, трубах, на поверхностях пола и т.д.).

Такие промывочные растворы могут дополнительно содержать поверхностно-активный агент или сурфактант. Пригодные поверхностно-активные вещества включают анионные поверхностно-активные вещества (например, алифатический сульфонат), амфотерные и/или цвиттерионные поверхностно-активные вещества (например, производные алифатического соединения четвертичного аммония, фосфония и сульфония) и неионные поверхностно-активные вещества (например, алифатические спирты, кислоты, амиды или алкилфенолы с алкиленоксидами). В целях удобства поверхностно-активный агент присутствует в концентрации от 0,5 до 5 мас.%.
10

Как при применении *in vitro*, так и *in vivo*, композиции по настоящему изобретению предпочтительно воздействуют на целевые поверхности в течение по меньшей мере пяти минут. Например, время экспозиции может составлять по меньшей мере 10 минут,
15 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 12 часов и 24 часа.

Следующие графические материалы являются частью настоящего описания и включены для дальнейшей демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять со ссылкой на это в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в
20 настоящем документе.

Фигура 1. Влияние комбинаций трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки

Влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки. На фигуре продемонстрировано, что комбинация
25 трипсинов трески и выбранных антибиотиков может быть более эффективной для разрушения биопленок, чем применение этих препаратов по отдельности. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете и применяли в качестве модели для биопленки. Биопленку обрабатывали антибиотиком или комбинацией антибиотиков и трипсинов
30 трески. Биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования, можно сделать вывод, что некоторые антибиотики, в данном случае комбинации тетрациклина, эритромицина, оксациллина и цефотаксима и трипсина
35 трески, являются более эффективными в борьбе с бактериальной биопленкой, по сравнению с применением антибиотиков отдельно. Однако показано, что ванкомицин не обладает значительно большей эффективностью против модели биопленки в комбинации с трипсином. Значения Р над планкой погрешностей указывают на достоверность различия между двумя видами обработок, которые оценивались по t-
40 критерию Стьюдента.

Фигура 2. Влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки.

Влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки. На фигуре продемонстрировано, что комбинация
45 трипсинов трески с тетрациклином или цефотаксимом может быть более эффективной для разрушения биопленок, чем применяемые по отдельности препараты. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете и применяли в качестве модели для биопленки.

Биопленку обрабатывали трипсинами трески, антибиотиком или их комбинацией. Биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что для этой модели комбинация трипсина трески и антибиотика тетрациклина или цефотаксима является более эффективной для разрушения бактериальной биопленки, чем трипсины трески или антибиотики, применяемые по отдельности. Значения Р над планкой погрешностей указывают на достоверность эффектов, которые оценивали с помощью анализа ANOVA.

Фигура 3. Влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки.

Влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки. Изображение представляет собой четкую наглядную демонстрацию того, что комбинация трипсинов трески и выбранных антибиотиков может быть более эффективной для разрушения биопленок, чем применяемые по отдельности препараты. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали трипсинами трески, антибиотиком или их комбинацией. Затем биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым. На основании этого исследования можно сделать вывод, что комбинации трипсинов трески и антибиотика являются более эффективными для разрушения бактериальной биопленки, чем антибиотики, применяемые отдельно. Как продемонстрировано в случае с ванкомицином, обработка биопленок антибиотиками может увеличить образование биопленки, эффекты которых нейтрализуются присутствием трипсина трески, как видно из столбцов 7 и 8.

На изображении продемонстрирован 96-луночный планшет, на котором биопленки, состоящие из *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus mitis*, выращивали в течение 4 часов с последующей обработкой трипсином трески (ct), антибиотиком или комбинацией трипсином трески и антибиотика. Каждый столбец представляет собой один вид лечения или комбинацию лечения, при этом ряды представляют собой уменьшающиеся концентрации сверху вниз. После обработки биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, причем более темный цвет указывает на более сохранный биопленку. Изображение демонстрирует, что комбинации антибиотиков и трипсина трески могут быть более эффективными, чем любой из препаратов, применяемый по отдельности. Это особенно важно для ванкомицина, который, по-видимому, при применении отдельно увеличивает образование биопленки, тогда как в комбинации с трипсином трески ванкомицин может повысить эффективность трипсина трески. Нижний ряд представляет контроли, при этом первые шесть лунок представляют необработанную биопленку, а следующие шесть - отсутствие биопленки. Таблица слева демонстрирует концентрации трипсина трески и антибиотиков, применяемые в каждом ряду/разведении.

На изображении продемонстрировано, как трипсин повышает эффективность некоторых антибиотиков, предположительно, разрушая биопленку и тем самым обеспечивая доступ антибиотиков к бактериям.

Фигура 4. Наглядная визуализация влияния трипсинов трески на супер-биопленку после окрашивания биопленки кристалловым фиолетовым.

Наглядная визуализация влияния трипсинов трески на супер-биопленку после окрашивания биопленки кристалловым фиолетовым. На фигуре продемонстрировано, что трипсины трески разрушают супер-биопленку концентрационно зависимым образом, что видно на прозрачных лунках, указывающих на отсутствие биопленки. Супер-

био пленку, сформированную комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали трипсином трески или плацебо в течение 2 минут, а лунки окрашивали для определения наличия био пленки (черные лунки) или ее отсутствия (прозрачные лунки) после обработки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески являются очень эффективными для разрушения супер-био пленки.

На фотоизображении продемонстрирован 96-луночный планшет, на котором био пленки, состоящие из *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали в течение 4 часов с последующей обработкой трипсином трески или плацебо. Каждый столбец представляет собой одну концентрацию, при этом первые три ряда представляют собой повторные обработки трипсином трески, а в нижних трех рядах продемонстрированы повторные обработки составом, не содержащим трипсина трески, в том же разведении. После обработки био пленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, причем более темный цвет указывает на более сохранную био пленку. На изображении продемонстрировано, что трипсин трески может быть эффективен для удаления био пленок при более высокой концентрации, но может потребовать дополнительных факторов при более низких концентрациях.

Фигура 5. Влияние трипсинов трески на супер-био пленку

Влияние трипсинов трески на супер-био пленку, измеренное с помощью спектрофотометрии после окрашивания кристалловым фиолетовым и растворения в уксусной кислоте. На фигуре продемонстрировано, что трипсины трески разрушают супер-био пленку концентрационно зависимым образом. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали трипсинами трески или плацебо, а лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование био пленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной био пленки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески являются очень эффективными для разрушения бактериальной био пленки. Данные представлены в виде полосовой диаграммы с планкой погрешностей, указывающей стандартную ошибку среднего (СОС). Данные о разведениях плацебо и трипсинов трески, которыми обрабатывали бактериальные био пленки, расположены рядом друг с другом. Log уменьшения образования био пленки при воздействии пензимом по сравнению с плацебо в том же разведении находится выше планки погрешностей, также как и уровень значимости, обозначенный звездочками (*), где * представляет собой $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$. Для подтверждения достоверности применяли t-критерий Стьюдента.

Фигура 6. Log уменьшения супер-био пленки под воздействием трипсинов трески в разных концентрациях.

Log уменьшения супер-био пленки под воздействием трипсинов трески в разных концентрациях. На фигуре продемонстрировано, что трипсины трески разрушают супер-био пленку концентрационно зависимым образом. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали треспинами трески или плацебо, а лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Формирование био пленки измеряли как поглощение при 492 нм, а уменьшение сравнивали с био пленкой, обработанной плацебо, по логарифмической шкале. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески в концентрациях 8 Ед/г или выше являются очень эффективными для

разрушения бактериальной биопленки менее чем за 2 минуты, при этом Log уменьшения, равный 3, означает 99,9% удаления биопленки, а Log уменьшения, равный 4, означает 99,99% удаления биопленки.

Фигура 7. Влияние предварительной обработки трипсинами трески на образование биопленки.

Влияние предварительной обработки трипсинами трески на образование биопленки. На фигуре продемонстрировано, что предварительная обработка бактерий, образующих биопленку, таких как *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, трипсином трески перед инкубацией при 37°C на 96-луночном микротитровальном планшете оказывает концентрационно зависимый эффект на их способность образовывать биопленки. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете после кратковременной обработки трипсинами трески или плацебо. После выращивания биопленок в течение 4 часов, лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески являются очень эффективными в предотвращении образования бактериальной биопленки. Данные представлены в виде коробчатой диаграммы, в которой верхняя часть прямоугольника указывает на третий квартиль, горизонтальная линия вблизи середины прямоугольника указывает на медиану, а нижняя часть прямоугольника указывает на первый квартиль. Вертикальная линия простирается от вершины прямоугольника, указывая на максимальное значение, а другая вертикальная линия простирается от нижней части прямоугольника, указывая на минимальное значение.

Фигура 8. Влияние предварительной обработки трипсинами трески на образование биопленки.

Влияние предварительной обработки трипсинами трески на образование биопленки. На фигуре продемонстрировано, что трипсин трески может препятствовать образованию биопленок концентрационно зависимым образом, при этом планктонные бактерии обрабатывали трипсином до получения ими возможности образовывать биопленку. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете после обработки трипсинами трески или плацебо. После выращивания биопленок в течение 4 часов, лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески являются очень эффективными в предотвращении образования бактериальной биопленки. Статистическая значимость различий, оцененная по t-критерию Стьюдента, обозначается символами над прямоугольниками, где n.s. означает $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

Примеры

Пример 1. Ингибирование адгезии *Pneumococcus* и *S. mitis* композицией трипсина трески

Как продемонстрировано на фигуре 1 и фигуре 2, биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете после обработки трипсинами трески или плацебо. После выращивания биопленок в течение 4 часов, лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки

измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования можно сделать вывод о том, что композиция трипсина трески была очень эффективной в предотвращении образования бактериальной биопленки. Обработка бактерий композицией трипсина трески до образования биопленки проявляла концентрационно зависимый эффект на образование биопленки *in vitro*. Трипсины трески предотвращают образование биопленки концентрационно зависимым образом. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете после обработки трипсинами трески или плацебо. После выращивания биопленок в течение 4 часов, лунки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. На основании этого исследования можно сделать вывод, что трипсины трески являются очень эффективными в предотвращении образования бактериальной биопленки. Данные представлены в виде коробчатой диаграммы, в которой верхняя часть прямоугольника указывает на третий квартиль, горизонтальная линия вблизи середины прямоугольника указывает на медиану, а нижняя часть прямоугольника указывает на первый квартиль. Вертикальная линия простирается от вершины прямоугольника, указывая на максимальное значение, а другая вертикальная линия простирается от нижней части прямоугольника, указывая на минимальное значение. Данные относительно бактерий, обработанных плацебо и треспином, приведены на одной и той же диаграмме. Перекрытие "коробок" указывает на отсутствие различий в образовании биопленки. Статистическая значимость различий, оцененная по t-критерию Стьюдента, обозначается символами над прямоугольниками, где n.s. означает $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$. Результаты представлены на фигурах 1 и 2.

На фигурах 4, 5, 6, 7 и 8 продемонстрировано, что трипсины трески вполне способны как удалять бактерии, так и частично предотвращать повторное прикрепление бактерий к поверхностям концентрационно зависимым образом. Однако только этого может оказаться недостаточно, чтобы полностью осуществить эрадикацию бактериальных инфекций, поскольку бактерии в результате воздействия трипсина полностью не уничтожаются.

Пример 2. Комбинация трипсина трески и антибиотиков для высоко эффективного разрушения биопленки такими композициями трипсина

Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали антибиотиком или комбинацией антибиотиков и трипсинов трески. Биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. Был сделан вывод о том, что комбинации трипсинов трески и антибиотиков являются более эффективными для разрушения бактериальной биопленки по сравнению с антибиотиками, применяемыми отдельно (см. фигуру 3). Значения Р над планкой погрешностей указывают на достоверность различия между двумя видами обработок, которые оценивались по t-критерию Стьюдента. При включении выбранных антибиотиков в комбинацию с трипсином трески отмечено, что применение трипсинов трески значительно повышало эффективность антибиотиков в 4 из 5 анализируемых препаратах, как показано на фигуре 1. Данные на фигуре 2 демонстрируют эксперименты, при которых биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым с последующим растворением уксусной

кислотой. Образование биопленки измеряли как поглощение при 492 нм и нормировали относительно необработанной биопленки. Значения Р над планкой погрешностей указывают на достоверность эффектов, которые оценивали с помощью анализа ANOVA. Приведенные данные демонстрируют, что местное комбинаторное применение трипсинов трески с антибиотиками более эффективно усиливало разрушение биопленки по сравнению с антибиотиками, применяемыми отдельно. Установлено, что комбинация трипсина трески с антибиотиками усиливает разрушение биопленки антибиотиками. Добавление трипсина трески позволяет применять более низкие концентрации антибиотиков при лечении биопленочных инфекций. Фигура 3 демонстрирует влияние комбинации трипсинов трески с выбранными антибиотиками на распространение биопленки. Изображение представляет собой четкую наглядную демонстрацию того, что комбинация трипсинов трески и выбранных антибиотиков может быть более эффективной для разрушения биопленок, чем применяемые по отдельности препараты. Биопленки, сформированные комбинацией *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus mitis*, выращивали на микротитровальном планшете. Биопленку обрабатывали трипсинами трески, антибиотиком или их комбинацией. Затем биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым. На основании этого исследования можно сделать вывод о том, что комбинации трипсинов трески и антибиотика являются более эффективными для разрушения бактериальной биопленки, чем антибиотики, применяемые отдельно.

Литература

Augustin, M., T. Ali-Vehmas, and F. Atroshi, 2004, Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms: *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, p. 55-64.

Bjarnason, J. B., 2000, Fish serine proteases and their pharmaceutical and cosmetic use. Patent: PCT, WO 00/78332 A2.

Gudmundsdottir, A., H. Hilmarsson, and B. Stefansson, 2013, Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine: Biomed Research International.

Stefansson, B., L. Helgadottir, S. Olafsdottir, A. Gudmundsdottir, and J. B. Bjarnason, 2010, Characterization of cold-adapted Atlantic cod (*Gadus morhua*) trypsin I - Kinetic parameters, autolysis and thermal stability: *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v. 155, p. 186-194.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> Zymetech ehf
 <120> Комбинированные виды терапии
 <130> ENZBA/P61071PC
 <150> EP15178209.1
 <151> 2015-07-24
 10 <160> 2
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 222
 <212> PRT
 15 <213> Gadus morhua
 <220>
 <223> трипсин I
 <400> 1
 20 Ile Val Gly Gly Tyr Glu Cys Thr Lys His Ser Gln Ala His Gln Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Val Ser Lys
 20 25 30
 Asp Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Val Leu Arg Val
 35 40 45
 Arg Leu Gly Glu His His Ile Arg Val Asn Glu Gly Thr Glu Gln Tyr
 50 55 60
 25 Ile Ser Ser Ser Val Ile Arg His Pro Asn Tyr Ser Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ile Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Thr Lys Pro Ala Thr Leu
 85 90 95
 Asn Gln Tyr Val His Ala Val Ala Leu Pro Thr Glu Cys Ala Ala Asp
 100 105 110
 Ala Thr Met Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Asn Thr Met Ser Ser Val
 115 120 125
 30 Ala Asp Gly Asp Lys Leu Gln Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ser His
 130 135 140
 Ala Asp Cys Ala Asn Ser Tyr Pro Gly Met Ile Thr Gln Ser Met Phe
 145 150 155 160
 Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
 165 170 175
 Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Val Val Ser Trp
 180 185 190
 35 Gly Tyr Gly Cys Ala Glu Arg Asp His Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val
 195 200 205
 Cys Val Leu Ser Gly Trp Val Arg Asp Thr Met Ala Asn Tyr
 210 215 220
 <210> 2

40 file:///D:/Soloduhina/Desktop/1810046/P61071PC%20Sequence%20listing%20-%20Russian%20Translation.txt[21.02.2018 13:31:24]

45

<211> 241
 <212> PRT
 <213> Gadus morhua

5

<220>
 <223> зимогенная последовательность для трипсина I

<400> 2

Met Lys Ser Leu Ile Phe Val Leu Leu Leu Gly Ala Val Phe Ala Glu
 1 5 10 15
 Glu Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Glu Cys Thr Lys His Ser Gln Ala
 20 25 30
 His Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu
 35 40 45
 Val Ser Lys Asp Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Val
 50 55 60
 Leu Arg Val Arg Leu Gly Glu His His Ile Arg Val Asn Glu Gly Thr
 65 70 75 80
 Glu Gln Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Val Ile Arg His Pro Asn Tyr Ser
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Ile Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Thr Lys Pro
 100 105 110
 Ala Thr Leu Asn Gln Tyr Val His Ala Val Ala Leu Pro Thr Glu Cys
 115 120 125
 Ala Ala Asp Ala Thr Met Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Asn Thr Met
 130 135 140
 Ser Ser Val Ala Asp Gly Asp Lys Leu Gln Cys Leu Ser Leu Pro Ile
 145 150 155 160
 Leu Ser His Ala Asp Cys Ala Asn Ser Tyr Pro Gly Met Ile Thr Gln
 165 170 175
 Ser Met Phe Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln
 180 185 190
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Val
 195 200 205
 Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Glu Arg Asp His Pro Gly Val Tyr
 210 215 220
 Ala Lys Val Cys Val Leu Ser Gly Trp Val Arg Asp Thr Met Ala Asn
 225 230 235 240
 Tyr

30

35

40 file:///D:/Soloduhina/Desktop/1810046/P61071PC%20Sequence%20listing%20-%20Russian%20Translation.txt[21.02.2018 13:31:24]

(57) Формула изобретения

1. Применение комбинированной терапии при лечении бактериальной биопленки у субъекта, которая включает (а) полипептид с активностью сериновой протеазы и (b)
 45 одно или более соединений антибиотика,

где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы представляет собой морскую сериновую протеазу, выбранную из группы, состоящей из трипсинов и химотрипсинов,

где указанная биопленка содержит или состоит из *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae* и

полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1:

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGENHIR
VNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMC
TVSGWGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQG
DSGGPVVCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY
[SEQ ID NO: 1]

и одно или несколько антибиотических соединений выбирают из группы, состоящей из тетрациклина, цефотаксима, ванкомицина, эритромицина и оксациллина.

2. Применение комбинированной терапии по п. 1, где субъект является человеком.

3. Применение комбинированной терапии по п. 1 или 2, где биопленка локализуется в верхних и/или нижних дыхательных путях.

4. Применение комбинированной терапии по любому из предшествующих пунктов, где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, выделен из природного источника.

5. Применение комбинированной терапии по любому из пп. 1-4, где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, представляет собой рекомбинантный белок.

6. Применение комбинированной терапии по любому из предшествующих пунктов, которое включает одно соединение антибиотика.

7. Полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, для применения при лечении бактериальной биопленки у субъекта, где указанная биопленка включает или состоит из *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae*, где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, представляет собой морскую сериновую протеазу, выбранную из группы, состоящей из трипсинов и химотрипсинов, и где полипептид предназначен для применения в комбинации с одним или более соединениями антибиотика, где

указанная биопленка содержит или состоит из *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae* и

где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1:

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSLSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGENHIR
VNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHAVALPTECAADATMC
TVSGWGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDSCQG
DSGGPVVCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY
[SEQ ID NO: 1].

8. Полипептид для применения по п. 7, где указанный полипептид является таким, как определено в любом из пп. 4, 5.

9. Полипептид для применения по п. 7 или 8, где одно или более соединений антибиотика является/являются таким/такими, как определено в любом из пп. 1-6.

10. Применение полипептида, обладающего активностью сериновой протеазы, для приготовления лекарственного средства при лечении бактериальной биопленки у субъекта, где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, представляет собой морскую сериновую протеазу, выбранную из группы, состоящей из трипсинов и химотрипсинов, и где полипептид предназначен для применения в комбинации с одним или более соединениями антибиотика, где указанная биопленка содержит или

состоит из *Streptococcus mitis* и/или *Streptococcus pneumoniae* и где полипептид, обладающий активностью сериновой протеазы, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1:

IVGGYECTKHSQAHQVSLNSGYHFCGGSIVSKDWVVSAAHCYKSVLRVRLGENHIR
 VNEGTEQYISSSSVIRHPNYSSYNINNDIMLIKLTKPATLNQYVHVALPTECAADATMC
 TVSGWGNTMSSVADGDKLQCLSLPILSHADCANSYPGMITQSMFCAGYLEGGKDCQG
 DSGGPVVCNGVLQGVVSWGYGCAERDHPGVYAKVCVLSGWVRDTMANY

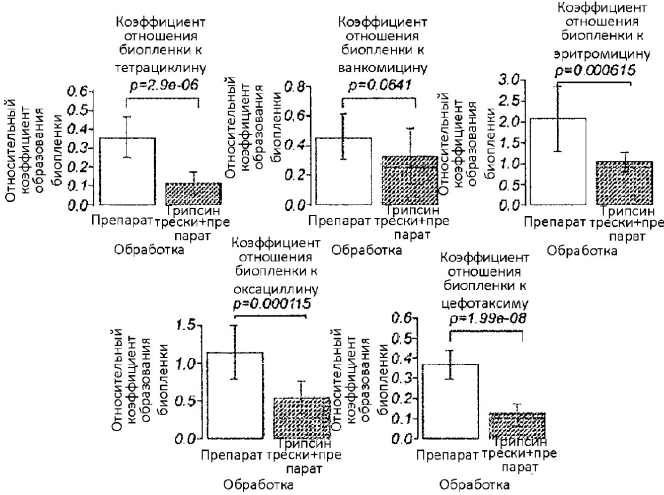
[SEQ ID NO: 1].

11. Применение полипептида по п. 10, где указанный полипептид является таким, как определено в любом из пп. 6, 7.

12. Применение полипептида по п. 10 или 11, где одно или более соединений антибиотика является/являются таким/такими, как определено в любом из пп. 1-6.

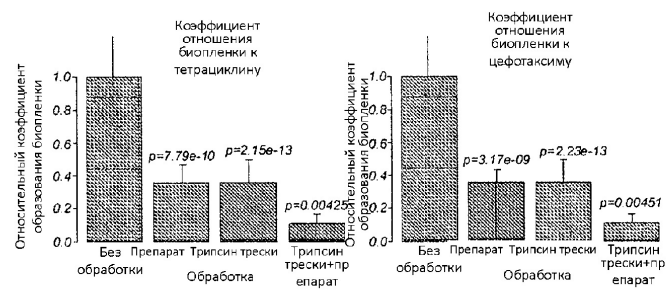
13. Способ разрушения, ингибирования или предотвращения роста бактериальной биопленки *in vitro*, который включает воздействие на биопленку или поверхность, на которой следует предотвратить рост биопленки, комбинированной терапией по любому из пп. 1-6.

Фиг. 1



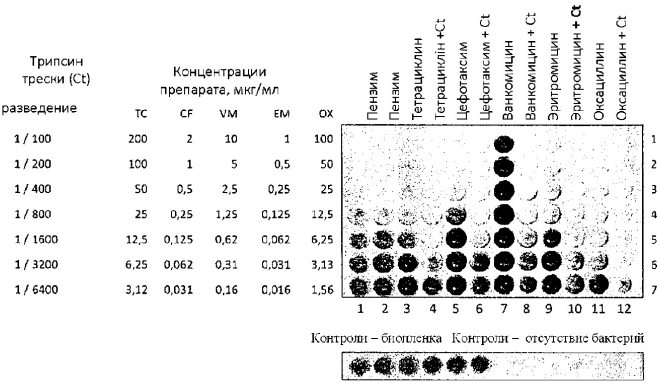
2/8

Фиг. 2



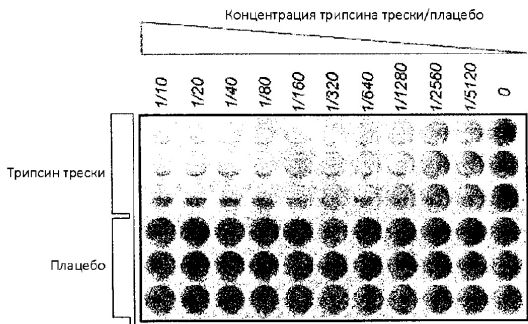
3/8

Фиг. 3



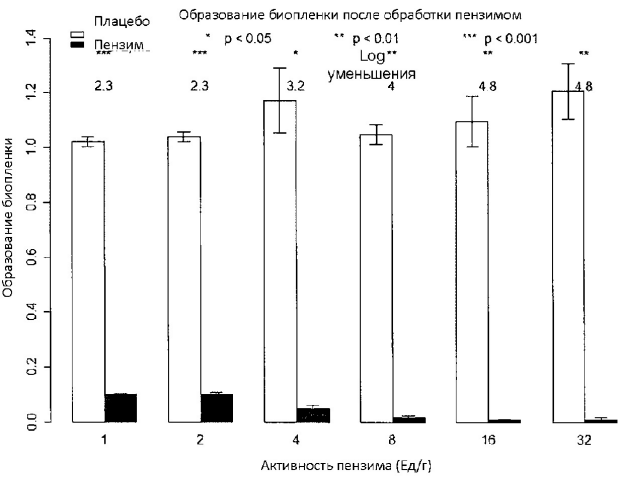
4/8

Фиг. 4



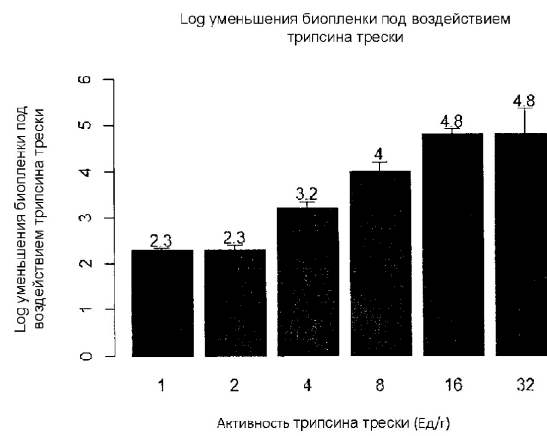
5/8

Фиг. 5



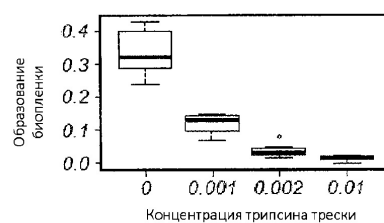
6/8

Фиг. 6



7/8

Фиг. 7



8/8

Фиг. 8

