



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114616240 A

(43) 申请公布日 2022.06.10

(21) 申请号 202080076229.7

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(22) 申请日 2020.11.06

专利代理师 王思琪 王建秀

(30) 优先权数据

62/932,609 2019.11.08 US

63/028,636 2020.05.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/059415 2020.11.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/092382 EN 2021.05.14

(71) 申请人 高等教育联邦系统-匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 K·乌里斯 J·B·曼德尔

权利要求书5页 说明书19页

序列表5页 附图8页

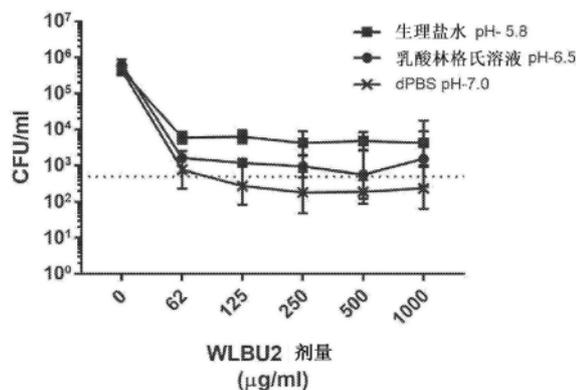
(54) 发明名称

包含抗微生物肽的组合物

(57) 摘要

提供了治疗或预防患者微生物感染的方法，以及伤口冲洗系统和用于减少伤口中微生物负荷或预防伤口微生物感染的冲洗液形式的组合物。

生物膜处理10分钟



1. 药物组合物, 包含:

- a. 阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐; 和
- b. 药学上可接受的水性载体,

其中所述药物组合物为液体形式; 且

其中所述药物组合物的总容量渗透压浓度为约1mOsm/L至约350mOsm/L。

2. 如权利要求1所述的药物组合物, 其中所述阳离子抗微生物肽与以下具有至少约70%的同源性: SA-5 (SEQ ID NO:1)、LSA-5 (SEQ ID NO:2)、WLSA-5 (SEQ ID NO:3)、LBU-1 (SEQ ID NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLBU-1 (SEQ ID NO:9)、WLBU-2 (SEQ ID NO:10)、WLBU-3 (SEQ ID NO:11)、WLBU-4 (SEQ ID NO:12)、WR6 (SEQ ID NO:13)、WR12 (SEQ ID NO:14)、WR18 (SEQ ID NO:15)、WR 24 (SEQ ID NO:16)、这些中任何一种的药学上可接受的盐或其任何组合。

3. 如权利要求1或2所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包含约0.01M至约0.4M的总离子强度。

4. 如权利要求3所述的药物组合物, 其中所述离子强度为约0.01M至约0.2M。

5. 如权利要求3所述的药物组合物, 其中所述离子强度为约0.02M至约0.4M。

6. 如权利要求3所述的药物组合物, 其中所述离子强度为约0.08M至约0.16M。

7. 如权利要求3所述的药物组合物, 其中所述离子强度为约0.08M。

8. 如权利要求3所述的药物组合物, 其中所述离子强度为约0.16M。

9. 如权利要求1或2的药物组合物, 其中所述药物组合物是生理学等渗的。

10. 如权利要求1或2的药物组合物, 其中所述药物组合物是生理学低渗的。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包含盐。

12. 如权利要求11所述的药物组合物, 其中所述盐包括氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二钠、氯化钙、乳酸钠、氯化铜、硫酸铜、 $C_{11}H_{22}CuO_{14}$ 、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、氢氧化铵或其任何组合。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物还包含约5.0至约8.0的pH。

14. 如权利要求13所述的药物组合物, 其中所述pH为约5.0至约7.8。

15. 如权利要求13所述的药物组合物, 其中所述pH为约6.0至约8.0。

16. 如权利要求13所述的药物组合物, 其中所述pH为约7.0至约7.6。

17. 如权利要求13所述的药物组合物, 其中所述pH为约7.4。

18. 如权利要求13所述的药物组合物, 其中所述pH为约8.0。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的药物组合物, 其中所述LLP-1阳离子抗微生物肽或所述其药学上可接受的盐以治疗用途的有效量存在于所述药物组合物中。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的药物组合物, 其中所述组合物还包含抗生素, 例如头孢唑啉。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的药物组合物, 其中所述药物组合物为单位剂量形式。

22. 如权利要求21所述的药物组合物, 其中所述单位剂量为, 每公斤所述个体体重, 所述阳离子抗微生物肽或所述其药学上可接受的盐的量约0.001mg至约100mg (mg/kg)。

23. 治疗或预防有需要的个体感染的方法,包括向所述个体施用药物组合物,从而治疗或预防所述感染;其中所述药物组合物包含:

- a. 阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐;和
- b. 药学上可接受的水性载体,

其中所述药物组合物为液体形式;且

其中所述药物组合物的总容量渗透压浓度为约1mOsm/L至约350mOsm/L。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述组合物还包含抗生素,例如头孢唑啉。

25. 如权利要求23所述的方法,其中所述阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐与以下具有至少约70%的同源性:SA-5 (SEQ ID NO:1)、LSA-5 (SEQ ID NO:2)、WLSA-5 (SEQ ID NO:3)、LBU-1 (SEQ ID NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLBU-1 (SEQ ID NO:9)、WLBU-2 (SEQ ID NO:10)、WLBU-3 (SEQ ID NO:11)、WLBU-4 (SEQ ID NO:12)、WR6 (SEQ ID NO:13)、WR12 (SEQ ID NO:14)、WR18 (SEQ ID NO:15)、WR 24 (SEQ ID NO:16)、这些中任何一种的药学上可接受的盐或其任何组合。

26. 如权利要求23-25中任一项所述的方法,其中所述药物组合物还包含约0.01M至约0.4M的总离子强度。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述离子强度为约0.01M至约0.2M。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述离子强度为约0.04M至约0.4M。

29. 如根据权利要求26所述的方法,其中所述离子强度为约0.08M至约0.16M。

30. 如权利要求26所述的方法,其中所述离子强度为约0.08M。

31. 如权利要求26所述的方法,其中所述离子强度约为0.16M。

32. 如权利要求23或25所述的方法,其中所述药物组合物是生理学等渗的。

33. 如权利要求23或25所述的方法,其中所述药物组合物是生理学低渗的。

34. 如权利要求23-33中任一项所述的方法,其中所述药物组合物还包含盐。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述盐是氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二钠、氯化钙、乳酸钠、氯化铜、硫酸铜、 $C_{11}H_{22}CuO_{14}$ 、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、氢氧化铵或其任何组合。

36. 如权利要求23-35中任一项所述的方法,其中所述药物组合物还包含约5.0至约8.0的pH。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物的所述pH为约5.0至约7.8。

38. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物的所述pH为约6.0至约8.0。

39. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物的所述pH为约7.0至约7.6。

40. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物的所述pH为约7.4。

41. 如权利要求36所述的方法,其中所述药物组合物的所述pH为约8.0。

42. 如权利要求23-41中任一项所述的方法,其中所述阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐以治疗用途的有效量存在。

43. 如权利要求22-42中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的施用进行约0.1min至约30min。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述施用进行约0.1min至约20min。

45. 如权利要求43所述的方法,其中所述施用进行约5min至约30min。

46. 如权利要求43所述的方法,其中,所述施用进行约10min。
47. 如权利要求23-46中任一项所述的方法,其中所述方法用于治疗感染。
48. 如权利要求23-46中任一项所述的方法,其中所述方法用于预防感染。
49. 如权利要求23-48中任一项所述的方法,其中所述感染包括细菌感染、病毒感染、真菌感染或其任何组合。
50. 如权利要求49的方法,其中所述感染还包括存在于生物膜中的病原体感染。
51. 如权利要求49或50所述的方法,其中所述感染包括所述细菌感染,并且其中所述细菌选自由以下组成的组:屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肠杆菌属菌种(*Enterobacter species*)、大肠杆菌(*Escherichia.Coli*)病原体及其任何组合。
52. 如权利要求23-51中任一项所述的方法,其中所述治疗或预防所述感染还包括将所述药物组合物施用到植入体、医疗器械、假体或其任何部分上;其中所述施用发生在将所述植入体、医疗器械、假体或其任何部分植入所述个体之前、期间或之后。
53. 如权利要求23-52中任一项所述的方法,其中所述治疗或预防所述感染还包括向所述个体的伤口施用所述药物组合物。
54. 如权利要求53的方法,其中所述伤口是开放性伤口。
55. 如权利要求52-54中任一项所述的方法,其中所述治疗或预防所述感染还包括用所述药物组合物冲洗所述伤口、开放性伤口、植入体、医疗器械、假体或其任何部分;其中所述施用发生在将所述植入体、医疗器械、假体或其任何部分植入所述个体之前、期间或之后。
56. 如权利要求23-51中任一项所述的方法,其中所述施用所述药物组合物通过动脉内施用、静脉内施用、肌肉内施用、口服施用、皮下施用、鼻内施用、吸入施用或其任何组合来施用。
57. 如权利要求23-56中任一项所述的方法,其中所述个体是人。
58. 如权利要求57所述的方法,其中所述人是男性。
59. 如权利要求57所述的方法,其中所述人是女性。
60. 如权利要求54-59中任一项所述的方法,其中,所述人的年龄为约0岁至约17岁。
61. 如权利要求54-59中任一项所述的方法,其中所述人的年龄为约18岁至约130岁。
62. 如权利要求23-61中任一项所述的方法,其中所述施用一天进行至少一次。
63. 如权利要求23-61中任一项所述的方法,其中所述施用一天进行至少两次。
64. 如权利要求23-63中任一项所述的方法,其中所述施用进行约5天至约30天。
65. 试剂盒,包括权利要求1-20中任一项所述的药物组合物和容器。
66. 如权利要求65所述的试剂盒,还包括使用说明。
67. 制备试剂盒的方法,包括将权利要求1-20中任一项的所述药物组合物与容器组合。
68. 如权利要求67所述的方法,还包括添加使用说明。
69. 减少患者伤口中的微生物负荷的方法,包括:用冲洗液洗涤所述伤口,所述冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,所述肽的量为通过用所述冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,从而减少所述患者伤口中的微生物负荷,其中所述水性载体或冲洗液任选地是生理学等渗的或

生理学低渗的和/或具有5.0-8.0的pH。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述冲洗液还包含抗生素,例如头孢唑啉。

71. 在患者中进行伤口冲洗的方法,任选地用于预防所述伤口感染,包括:用冲洗液洗涤所述伤口,所述冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,所述肽的量为通过用所述冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中所述水性载体或冲洗液任选地是生理学等渗的或生理学低渗的或具有5.0-8.0的pH。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述冲洗液还包含抗生素,例如头孢唑啉。

73. 将器械植入患者的方法,任选地用于预防所述患者与所述器械植入相关的感染,包括:用冲洗液洗涤所述器械和/或所述患者内的器械植入位置,所述冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,所述肽的量为通过用所述冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中所述水性载体或冲洗液任选地是生理学等渗的或生理低渗的和/或具有5.0-8.0的pH。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述冲洗液还包含抗生素,例如头孢唑啉。

75. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述LLP-1源性抗微生物肽是以下中的一种或多种:SA-5 (SEQ ID NO:1)、LSA-5 (SEQ ID NO:2)、WLSA-5 (SEQ ID NO:3)、LBU-1 (SEQ ID NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLB-1 (SEQ ID NO:9)、WLB-2 (SEQ ID NO:10)、WLB-3 (SEQ ID NO:11)、WLB-4 (SEQ ID NO:12)、WR6 (SEQ ID NO:13)、WR12 (SEQ ID NO:14)、WR18 (SEQ ID NO:15) 或WR 24 (SEQ ID NO:16)。

76. 如权利要求69-74中任一项所述的方法,其中所述自LLP-1源性抗微生物肽是WLB-2 (SEQ ID NO:10)。

77. 如权利要求69-76中任一项所述的方法,其中所述冲洗液是生理学低渗的。

78. 如权利要求69-76中任一项所述的方法,其中所述冲洗液具有碱性pH。

79. 如权利要求69-76中任一项所述的方法,其中所述水性载体是水。

80. 如权利要求69-76中任一项所述的方法,其中所述冲洗液是生理学低渗的且具有碱性pH。

81. 如权利要求69-80中任一项所述的方法,其中所述冲洗液的pH为7.2-8.0。

82. 如权利要求69-81中任一项所述的方法,其中所述冲洗液在所述伤口、器械或植入部位中的接触时间小于20分钟、15分钟、10分钟或5分钟,且所述伤口中的微生物负荷减少至少三个数量级(至少1000倍)。

83. 灌洗系统,包括:冲洗执行机构,其配置为用冲洗液洗涤或冲洗患者的伤口,流体连接至包含冲洗液的储液器,所述冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,所述肽的量为通过用所述冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中所述水性载体或冲洗液任选地是生理学等渗的或生理学低渗的和/或具有5.0-8.0的pH。

84. 如权利要求83所述的系统,其中所述冲洗液还包含抗生素,例如头孢唑啉。

85. 如权利要求83或84所述的系统,其中所述LLP-1源性抗微生物肽是以下中的一种或多种:SA-5 (SEQ ID NO:1)、LSA-5 (SEQ ID NO:2)、WLSA-5 (SEQ ID NO:3)、LBU-1 (SEQ ID

NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLBU-1 (SEQ ID NO:9)、WLBU-2 (SEQ ID NO:10)、WLBU-3 (SEQ ID NO:11)、WLBU-4 (SEQ ID NO:12)、WR6 (SEQ ID NO:13)、WR12 (SEQ ID NO:14)、WR18 (SEQ ID NO:15) 或WR 24 (SEQ ID NO:16)。

86. 如权利要求85所述的系统,其中所述LLP-1源性抗微生物肽是WLBU-2 (SEQ ID NO:10)。

87. 如权利要求83-86中任一项所述的系统,其中所述冲洗液是生理学低渗的。

88. 如权利要求83-86中任一项所述的系统,其中所述冲洗液具有碱性pH。

89. 如权利要求83-86中任一项所述的系统,其中所述水性载体是水。

90. 如权利要求83-86中任一项所述的系统,其中所述冲洗液是生理学低渗的并且具有碱性pH。

91. 如权利要求83-90中任一项所述的系统,其中所述冲洗液的pH为7.2-8.0。

92. 如权利要求83-91中任一项所述的系统,其中冲洗液在少于20分钟、15分钟、10分钟或5分钟内将生物膜或伤口中的微生物负荷减少至少1000倍。

93. 冲洗液,包含:水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,所述肽的量为通过洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中所述冲洗液或水性载体是生理低渗的或具有7.2-8.0的pH。

94. 如权利要求93所述的冲洗系统,其中所述冲洗液还包含抗生素,例如头孢唑啉。

95. 如权利要求93或94所述的冲洗液,其总容量渗透压浓度为50mOsm/L至300mOsm/L,且总离子强度为0.02M至0.2M。

96. 如权利要求93-95中任一项所述的冲洗液,其中所述LLP-1源性抗微生物肽是以下中的一种或多种:SA-5 (SEQ ID NO:1)、LSA-5 (SEQ ID NO:2)、WLSA-5 (SEQ ID NO:3)、LBU-1 (SEQ ID NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLBU-1 (SEQ ID NO:9)、WLBU-2 (SEQ ID NO:10)、WLBU-3 (SEQ ID NO:11)、WLBU-4 (SEQ ID NO:12)、WR6 (SEQ ID NO:13)、WR12 (SEQ ID NO:14)、WR18 (SEQ ID NO:15) 或WR 24 (SEQ ID NO:16)。

97. 如权利要求93-95中任一项所述的冲洗液,其中,所述LLP-1源性抗微生物肽是WLBU-2。

98. 如权利要求93-97中任一项所述的冲洗液,其中所述水性载体包含NaCl、KCl、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 CaCl_2 、 $\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$ 、 CuCl_2 、 CuSO_4 、和/或 $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{CuO}_{14}$ 中的一种或多种。

99. 如权利要求93-97中任一项所述的冲洗液,其中所述水性载体是水。

100. 如权利要求93-97中任一项所述的冲洗液,其中所述水性载体是生理学低渗的并且具有碱性pH。

101. 如权利要求93-97中任一项所述的冲洗液,其中所述水性载体的pH使用氢氧化铵、氢氧化钠、氢氧化镁、碳酸钠或其组合来调节。

102. 如权利要求101所述的冲洗液,其中所述水性载体的pH使用氢氧化铵来调节。

103. 如权利要求93-97中任一项所述的冲洗液,其中所述冲洗液或水性载体是生理学低渗的。

104. 用于植入患者的医疗器械,包装在权利要求93-103中任一项所述的冲洗液中。

包含抗微生物肽的组合物

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年11月8日提交的美国临时专利申请第62/932,609号和2020年5月22日提交的美国临时专利申请第63/028,636号的权益,每一个都通过引用整体并入本文。

[0003] 有关联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院授予的资助号TR0001856和AR071494的政府支持下完成的。政府对发明享有一定的权利。

[0005] 有关序列表的介绍

[0006] 与本申请有关的序列表通过EFS-Web以电子格式提交,并通过引用整体并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称是6527_2005591_ST25.txt。文本文件大小为6,036字节,文本文件创建于2020年10月15日。

[0007] 提供了治疗患者微生物感染的方法。还提供了伤口冲洗系统。

[0008] 美国每年发生约200万例医院相关感染。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是导致这些感染的主要微生物,这些感染包括手术部位和植入假体相关感染。全膝关节置换术 (Total knee arthroplasty, TKA) 是美国规模最大的主要外科手术,每年进行超过700,000例。1.5-2%的接受关节置换手术的患者发生全膝关节置换术感染,称为关节假体周围感染 (periprosthetic joint infection, PJI)。PJI治疗涉及多个后续外科手术和长期抗生素治疗方案。在急性PJI中,清创抗生素和植入体保留 (debridement antibiotics and implant retention, DAIR) 是一种常见的方法。治疗失败率超过60%,五年死亡率约为25%。这些感染中的大多数是金黄色葡萄球菌。生物膜的高抗生素耐受性越来越被认为是这些难以根除感染的主要原因。需要对生物膜具有更好活性的新型抗生素。

[0009] 需要用于处理生物膜的优良组合物,例如用于涉及植入体的外科手术。

发明内容

[0010] 提供了包含阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐和药学上可接受的水性载体的药物组合物,其中所述药物组合物为液体形式;并且其中所述药物组合物的总容量渗透压浓度 (total osmolarity) 为约1mOsm/L至约350mOsm/L。

[0011] 提供了治疗或预防有需要的个体的感染的方法。该方法包括向所述个体施用药物组合物,从而治疗或预防所述感染;其中所述药物组合物包含:阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐;和药学上可接受的水性载体,其中所述药物组合物为液体形式;并且其中所述药物组合物的总容量渗透压浓度为约1mOsm/L至约350mOsm/L。

[0012] 提供了包含药物组合物的试剂盒,该药物组合物包含:阳离子抗微生物肽或其药学上可接受的盐;和药学上可接受的水性载体以及容器,其中所述药物组合物为液体形式;并且其中所述药物组合物的总容量渗透压浓度为约1mOsm/L至约350mOsm/L。

[0013] 提供了减少患者伤口中微生物负荷的方法,包括:用冲洗液洗涤伤口,该冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过用冲洗液洗涤

伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,从而减少患者伤口中的微生物负荷,其中水性载体或冲洗液任选地是生理等渗的或生理低渗的和/或pH为5.0-8.0。

[0014] 提供了在患者中进行伤口冲洗的方法,任选地用于预防伤口感染,包括:用冲洗液洗涤伤口,该冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过用冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中水性载体或冲洗液任选地是生理等渗的或生理低渗的或pH为5.0-8.0。

[0015] 提供了将器械植入患者中的方法,任选地用于预防与器械植入相关的患者感染,包括:用冲洗液洗涤器械和/或患者内的器械植入位置,该冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过用冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中水性载体或冲洗液任选地是生理等渗的或生理低渗的和/或pH为5.0-8.0。

[0016] 提供了灌洗系统,包括:冲洗执行机构,其被配置为用冲洗液洗涤或冲洗患者伤口,流体连接至包含冲洗液的储液器,该冲洗液包含在药学上可接受的水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过用冲洗液洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中水性载体或冲洗液任选地是生理等渗的或生理低渗的和/或pH为5.0-8.0。

[0017] 提供了冲洗液,其包含:在水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中冲洗液或水性载体是生理低渗的或pH为7.2-8.0。

[0018] 提供了包装在冲洗液中的医疗器械,该冲洗液包含在水性载体中的LLP-1源性抗微生物肽,该肽的量为通过洗涤伤口30分钟或更短时间有效地将患者伤口中的微生物负荷减少至少1000倍,其中冲洗液或水性载体是生理低渗的或pH为7.2-8.0。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图1是本文所述冲洗或灌洗系统的示意图。

[0021] 图2A和2B. WLBU-2在PBS中显示出更快和改善的金黄色葡萄球菌生物膜杀伤。使SH1000成熟生物膜在不锈钢克氏丝植入片上在MHB中生长超过48小时。将生物膜用PBS洗涤,并放入具有WLBU-2或头孢唑啉的倍数稀释液的MHB中。生物膜片用WLBU-2处理5-120分钟,并用头孢唑啉处理2、6和24小时。将处理的生物膜用PBS洗涤,放入1% Tween 20的PBS超声处理溶液中并超声处理10分钟。在血琼脂板上对菌落形成单位(CFU)进行量化,以确定处理后存在的生物膜负荷(图2A)。在5-30分钟的非常早期时间点用PBS中的WLBU-2处理生物膜植入片。生物膜用PBS洗涤并处理,用于CFU分析。与在MHB中的处理相比,使用PBS中的WLBU-2处理导致生物膜杀伤的速度和幅度增加,红线表示未处理的生物膜细菌负荷减少99.9%(图2B)。

[0022] 图3A和3B. 碱性调节的PBS增强了WLBU-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。在2.5-20分钟的早期时间点用PBS中的WLBU-2处理生物膜植入片。在添加肽和处理生物膜之前,将PBS pH从6.5调节到8.0。将处理的生物膜放入1% Tween 20的PBS超声处理溶液中并超声处理10分钟。在血琼脂板上对CFU进行量化,以确定未处理对照的 $3 \log$ 减少。获得生物膜CFU $3 \log$ 减少所需的接触时间随着pH增加而减少(图3A)。此外,CFU分析显示,在碱性值

PBS的情况下WLBU-2处理能够在超声处理后获得0CFU的无菌样品(图3B)。

[0023] 图4.碱性调节的WLBU-2冲洗液改善PJI植入生物膜处理。使成熟的SH1000生物膜在克氏丝植入片上生长48小时,并插入手动扩孔的股骨近端,然后在PJI小鼠模型中用缝线缝合。两天后,从小鼠中取出植入片,直接放入具有以1.0mg/ml溶解的WLBU-2的pH调节的PBS中10分钟。将植入片超声处理和涂覆,用于CFU分析,以确定植入细菌负荷。与未处理的对照(无药物)相比,在7.0、7.2和7.4的更碱性PBS中用WLBU-2处理的PJI植入体表现出生物膜CFU显著降低。与6.5pH PBS中的WLBU-2冲洗液相比,7.4pH PBS中的WLBU-2冲洗液显示出明显较少的CFU植入体负荷。黑线表示与仅PBS冲洗液(无药物)相比减少了99.9%。

[0024] 图5.WLBU-2在dPBS中显示出改善的金黄色葡萄球菌生物膜杀伤。使SH1000成熟生物膜在不锈钢克氏丝植入片上在MHB中生长超过48小时。将生物膜用dPBS洗涤并放入具有WLBU-2或头孢唑啉的倍数稀释液的MHB中。将生物膜在生理盐水、乳酸盐林格氏溶液和dPBS中用WLBU-2处理10分钟。将处理的生物膜用PBS洗涤,放入1%Tween 20的dPBS超声处理溶液中并超声处理10分钟。在血琼脂板上对菌落形成单位(CFU)进行量化,以确定处理后存在的生物膜负荷。黑线表示与仅冲洗CFU负荷相比减少了99.9%。

[0025] 图6.pH和离子强度调节的dPBS增强了WLBU-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。在2.5-20分钟的非常早期时间点用PBS中的WLBU-2处理生物膜植入片。在添加肽和处理生物膜之前,将PBS pH从6.5调节到8.0。获得生物膜CFU 3log减少所需的接触时间随着pH的增加而减少(A)。此外,CFU分析显示,在碱性值PBS的情况下WLBU-2处理能够在超声处理后获得0CFU无菌样品(B)。在离子强度调节的dPBS中用WLBU-2进行了类似处理,以3log减少(C)和0CFU无菌(D)所需的接触时间,对生物膜进行类似处理。黑线显示,最小(2.5min)和高于20min的最大(20min)WLBU-2接触时间记录值无法实现3log减少或0CFU无菌生物膜。

[0026] 图7.生理pH调节的WLBU-2冲洗液改善PJI植入生物膜处理。使成熟的SH1000生物膜在克氏丝植入片上生长48小时,并插入手动扩孔的股骨近端,然后在PJI小鼠模型中用缝线缝合。两天后,从小鼠中取出植入片,直接放入具有以1.0mg/ml溶解的WLBU-2的pH调节的PBS中10分钟。将植入片超声处理和涂覆,用于CFU分析,以确定植入细菌负荷。与未处理的对照(无药物)相比,用在pH为7.0、7.2和7.4的PBS中WLBU-2处理的PJI植入体表现出生物膜CFU显著减少。与6.5pH PBS中的WLBU-2冲洗液相比,7.4pH PBS中的WLBU-2冲洗液表现出明显较小的CFU植入体负荷。黑线表示与仅PBS冲洗液(无药物)相比减少了99.9%。

[0027] 图8.生理pH和离子强度调节的dPBS增强了WLBU-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。将生物膜用在pH 7.5的dPBS中、pH 7.5的高渗dPBS和pH 7.5的低渗dPBS中的WLBU-2处理10分钟。用在pH 7.5的dPBS中的62、125、250、500和1000 μ g/mL WLBU-2实现了生物膜CFU的3log减少,用在pH 7.5的低渗dPBS中的62、125、250、500和1000 μ g/mL WLBU-2实现了0生物膜CFU。黑线表示与仅dPBS冲洗相比减少了99.9%(无药物)。

[0028] 图9是描述在实施例4所述兔模型中获得的WLBU-2的初始数据的图。

[0029] 图10.PLG0206处理组与对照组相比,离体和体内处理有显著差异,细菌负荷减少超过2log。在体内研究中,与0.5mg/ml PLG0206相比,1mg/ml PLG0206 15分钟的细菌负荷减少明显更大。用1mg/ml PLG0206处理7.5分钟,观察到类似的细菌负荷减少。

[0030] 图11.单独的1mg/ml PLG0206处理(第3组)与对照相比不明显。然而,1mg/ml PLG0206与头孢唑啉联合处理(第4组)导致细菌负荷显著减少(2.5log)(图11)。单独的头孢

唑啉处理(第2组)不足以消除生物膜,细菌负荷仅减少1.5log。

具体实施方式

[0031] 除非另有明确说明,否则在本申请中指定的各种范围内的数值的使用均表示为近似值,就好像在所述范围内的最小值和最大值都以单词“约”开头一样。以这种方式,高于和低于所述范围的轻微变化可以用于实现与所述范围内的值基本相同的结果。此外,除非另有说明,否则这些范围的公开旨在作为包括最小值与最大值之间的每个值的连续范围。对于本文提供的定义,这些定义还涉及这些词或短语的词形、同源词和语法变体。

[0032] 如本文所用,术语“包含/包括(comprising)”、“包含/包括(comprise)”或“包含/包括(comprised)”及其变体,在提及项目、组合物、设备、方法、过程、系统、权利要求等的要素时,旨在是开放式的,意味着该项目、组合物、设备、方法、过程、系统、权利要求等包括那些要素,并且可以包括其他元素,并且仍然落入所述项目、组合物、设备、方法、过程、系统、权利要求等的范围/定义内。如本文所用,“一(个)/一种”或“一(个)/一(种)”表示一个/一种或更多个/多种。如本文所用,“另一(个)/另一(种)”可以表示至少第二个/第二中或更多个/更多种。

[0033] 如本文所用,术语“患者”或“个体”是指动物界成员,包括但不限于人类。

[0034] 本文所用“药学上可接受的赋形剂”、“水性载体”或“药学上可接受的水性载体”是指生理相容的溶剂或分散介质等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇中的一种或多种及其组合。药学上可接受的载体还可以包含少量可以提高活性剂的贮存期或效果的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0035] 实现期望的治疗、药理学、医疗或生理学效果的“有效量(effective amount)”或“有效量(amount effective)”是实现所述目的的任何量。例如,一定量的抗微生物化合物,例如LLP-1源性肽,有效减少患者伤口中的微生物负荷,和/或减少患者伤口中的微生物生物膜。基于本文提供的教导,普通技术人员可以容易地确定所述剂型要素的有效量并产生安全有效的剂型和药物产品。在洗涤、冲洗或灌洗溶液中复合的WLBU-2肽的有效量的实例包括500 μ g/ml(微克/毫升)或1mg/ml(毫克/毫升)溶液,并且对于WLBU-2或其他LLP-1源性肽而言,可以为1 μ g/ml至100mg/ml,或100mg/ml至10mg/ml。其他LLP-1源性肽的当量,包括摩尔或w/v(重量/体积)当量,可以用于本文所述的方法、系统和装置。

[0036] 术语“同源性”可以指多肽与参考多肽的同一性百分比。实际上,任何特定多肽是否可以与本文所述任何多肽的任何参考氨基酸序列(其可对应于本文所述的特定核酸序列)至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%相同,都可以使用已知的计算机程序,例如Bestfit程序(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711),常规地确定此类特定的多肽序列。当根据本发明使用Bestfit或任何其他序列比对程序来确定特定序列是否与参考序列例如95%相同时,可以设置参数,以便在全长参考氨基酸序列中计算同一性百分比,并且允许的同源性缺口高达参考序列中氨基酸残基总数的5%。

[0037] 例如,在具体实施方案中,参考序列(查询序列,即本发明的序列)与主题序列之间的同一性,也称为全局序列比对,可以使用FASTDB计算机程序基于Brutlag等人的算法

(Comp.App.Biosci.6:237-245 (1990)) 来确定。在一些实施方案中,在FASTDB氨基酸比对中使用的对同一性进行狭义解释的特定实施方案的参数可以包括:Scoring Scheme (评分方案) = PAM (Percent Accepted Mutations (接受的突变百分比)) 0, k-tuple = 2, Mismatch Penalty (错配罚分) = 1, Joining Penalty (加入罚分) = 20, Randomization Group Length (随机分组长度) = 0, Cutoff Score (截止分数) = 1, Window Size (窗口大小) = 序列长度, Gap Penalty (缺口罚分) = 5, Gap Size Penalty (缺口大小罚分) = 0.05, Window Size (窗口大小) = 500 或主题氨基酸序列的长度, 以较短者为准。根据该实施方案, 如果主题序列由于N末端或C末端缺失而不是由于内部缺失而比查询序列短, 则可以对结果进行手动校正, 以考虑FASTDB程序在计算全局同一性百分比时不考虑主题序列的N末端和C末端截短这一事实。对于相对于查询序列在N和C末端截断的主题序列, 百分比同一性可以通过计算查询序列在主题序列N和C末端侧面 (不与相应主题残基匹配/对齐) 的残基的数量来校正, 作为查询序列总碱基的百分比。残基是否匹配/对齐的确定, 可以通过FASTDB序列比对的结果来确定。然后可以从FASTDB程序使用指定参数计算的同一性百分比中减去该百分比, 以获得最终的同一性百分比分数。该最终百分比同一性分数可用于该实施方案的目的。在一些实施方案中, 出于手动调节同一性百分比分数的目的, 仅考虑与查询序列不匹配/对齐的主题序列的N和C末端残基。也就是说, 对于这种手动校正, 仅考虑在主题序列的最远N和C末端残基之外的查询残基位置。例如, 可以将90个氨基酸残基的主题序列与100个残基的查询序列进行比对, 以确定百分比同一性。缺失发生在主题序列的N末端, 因此, FASTDB比对未显示N末端的前10个残基的匹配/对齐。10个未配对的残基代表序列的10% (N和C末端不匹配的残基数/查询序列中的残基总数), 因此从FASTDB程序计算的同一性百分比分数中减去10%。如果剩余的90个残基完全匹配, 则最终的同一性百分比将为90%。在另一个实例中, 将90个残基的主题序列与100个残基的查询序列进行比较。这次缺失是内部缺失, 因此在主题序列的N或C末端没有与查询不匹配/对齐的残基。在这种情况下, 不会手动校正FASTDB计算的同一性百分比。再一次, 主题序列N和C末端之外的残基位置, 如FASTDB比对中所示, 与查询序列不匹配/对齐, 需要手动校正。

[0038] 如本文所用, 术语“共同施用”、“联合施用”及其语法等同物等, 可以涵盖向个体施用选定的多种治疗剂, 并且可以包括通过相同或不同施用途径或在相同或不同时间施用多种药剂的治疗方案。在一些实施方案中, 本文公开的肽可以与其他药剂共同施用。这些术语可以涵盖向个体施用两种或更多种药剂, 使得两种药剂和/或其代谢物同时存在于个体中。它们可以包括同时施用、在不同时间施用和/或以两种药剂都存在的组合物施用。因此, 在一些实施方案中, 可以在单一组合物中施用肽和其他药剂。在一些实施方案中, 可以将肽和其他药剂混合于组合物中。在一些实施方案中, 可以通过不同施用途径的组合施用相同的肽或药剂。在一些实施方案中, 可以以治疗有效量施用每种药剂。

[0039] 可以与任何合适的例如药学上可接受的水溶液、载体或赋形剂 (统称为水性载体), 其例如但不限于, 尤其是制药和复合领域中已知的: 水; 缓冲溶液; 盐溶液, 例如盐水; 缓冲盐溶液, 例如磷酸盐缓冲盐水, 将抗微生物肽 (例如本文所述的LLP-1源性肽, 包括WLBU-2) 配制成、复合成例如溶解成或以其他方式分散成冲洗液药物产品。可以配制冲洗液, 以在与生物膜或伤口接触30分钟或更短时间、20分钟或更短时间、15分钟或更短时间、10分钟或更短时间或5分钟或更短时间内, 减少伤口中的微生物负荷或生物膜, 例如微生物

负荷降低3个log或更多(1000倍或更大)。冲洗液可以是生理高渗的、等渗的或低渗的。冲洗液可以是微酸性、中性或碱性,例如从pH 4.0到pH 11.0,包括其间的增量,例如4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9或11.0,包括其间的增量,包括其间的增量。水性载体可以是生理等渗的,如乳酸盐林格氏溶液或生理盐水(0.9%w/v),或生理低渗的(亚生理容量渗透压浓度或重量渗透压浓度(osmolality)),例如,用例如水稀释的乳酸盐林格氏溶液或生理盐水的改良形式。生理低渗载体的pH可以大于5.0,或者可以是碱性的,即pH大于7.0。水性载体或冲洗液的总容量渗透压浓度可以为1毫渗透摩尔每升(mOsm/L)至350mOsm/L,例如,50mOsm/L至300mOsm/L或2mOsm/L至200mOsm/L。水性载体或冲洗液的总离子强度可以为0.01摩尔(M)至0.4M,例如0.02M至0.2M。可以选择具有碱性pH或在冲洗液中产生碱性pH(例如pH 7.2-8.0)的水性载体。通过向水性载体中添加碱,例如氢氧化铵、氢氧化钠、氢氧化镁、碳酸钠或其组合,可以将冲洗液的pH调节为碱性pH。考虑了产品的更高pH,但其可能会被证明过于碱性,因此对用于伤口冲洗的破坏性太大。载体可以是生理性低渗的,这意味着它具有或产生的冲洗液,与正常患者细胞的胞质溶胶相比,或与正常患者的血液、血浆、血清或淋巴液相比,具有更低浓度的溶质。载体或冲洗液可以是生理低渗的和碱性的,例如pH为7.2-8.0。药物产品的合适碱性pH值的实例包括7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0,包括其间的增量,或例如7.4-8.0或7.5-8.0的pH范围。

[0040] 如本文所述,药物产品,例如洗涤、冲洗或灌洗液体或溶液,在手术环境中是有用的并且可以使用,并且与现有冲洗溶液不同,可以在手术中使用,这意味着它们可以在单次外科手术过程中使用,没有明显延迟或无效等待期(inactive waiting period)。也就是说,它们在与生物膜或伤口接触30分钟或更短时间、20分钟或更短时间、15分钟或更短时间、10分钟或更短时间或5分钟或更短时间内,有效地减少了伤口中的微生物负荷或生物膜,例如微生物负荷降低3个log或更多(1000倍或更大)。本文所述的药物产品,例如包含所述抗微生物肽,并且在一些情况下,具有碱性pH或亚生理容量渗透压浓度或重量渗透压浓度中的一种或两种,在用于伤口洗涤、冲洗或灌洗时,可以实现微生物负荷或生物膜的这种快速减少。

[0041] “减少伤口中的微生物负荷”或“减少伤口中的生物膜”或类似短语意味着降低伤口中活微生物的总数。“微生物”包括但不限于细菌、真菌、原生动物和病毒,而不是指患者的正常、真核细胞。在本公开的上下文中,微生物可以视为病原体或病原的。

[0042] 治疗剂是递送给患者以实现期望效果的任何化合物或组合物,例如有益的治疗或治愈效果。治疗剂包括蛋白质,例如多肽或蛋白质。在本公开的上下文中,治疗剂是具有抗微生物活性的肽(“抗微生物肽”)。抗微生物肽可以衍生自对应于HIV-1病毒分离物HXB2R Env的氨基酸828-856的LLP-1肽亲本序列并且是其类似物,包括SA-5(SEQ ID NO:1)、LSA-5(SEQ ID NO:2)和WLSA-5(SEQ ID NO:3)(见下文表1)。其他LLP-1肽类似物的抗微生物活性先前已有描述(参见Tencza et al.,1999,Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:33-41, Montelaro等人的美国专利号5,714,577和Montelaro等人的美国专利号5,945,507,其公开内容通过引用并入本文)。抗微生物肽可以是具有基于以下原理的修饰的LLP 1类似

物:

[0043] (i) 优化两亲性, (ii) 用另一种氨基酸取代带电面上的精氨酸 (Arg) 和/或疏水面上的缬氨酸 (Val) 或色氨酸 (Trp), 和 (iii) 增加肽长度, 例如, 不限于LBU-1 (SEQ ID NO:4)、LBU-2 (SEQ ID NO:5)、LBU-3 (SEQ ID NO:6)、LBU-3.5 (SEQ ID NO:7)、LBU-4 (SEQ ID NO:8)、WLBU-1 (SEQ ID NO:9)、WLBU-2 (SEQ ID NO:10)、WLBU-3 (SEQ ID NO:11) 或WLBU-4 (SEQ ID NO:12); 参见表1)。按从左到右, 即从N末端到C末端, 提供了氨基酸序列。

[0044] 表1

SA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RIL	(SEQ ID NO: 1)
LSA-5:	RVIRV VQRAC RAIRH IVRRI RQGLR RILRV V	(SEQ ID NO: 2)
WLSA-5:	RWIRV VQRWC RAIRH IWRRI RQGLR RWLRV V	(SEQ ID NO: 3)
LBU-1:	RVVVR VRRVV RR	(SEQ ID NO: 4)
LBU-2:	RRVVR RVRRV VRRVV RVVRR VVRR	(SEQ ID NO: 5)
LBU-3:	VRVV RRVVR VVRRV VRRVR RVVRR VVRVV RRVRR	(SEQ ID NO: 6)
LBU-3.5:	RRVVR RVRRV VRRVV RVVRR VVRRV RRVVR RVVVR VRRVV RR	(SEQ ID NO: 7)
[0045] LBU-4:	RVVVR VRRVV RRVRR VVRRV VRVVR RVVRR VRRVV RRVVR VVRRV VRR	(SEQ ID NO: 8)
WLBU-1	RVVVR VRRVV RR	(SEQ ID NO: 9)
WLBU-2	RRWVR RVRRV WRVV RVVRR WVRR	(SEQ ID NO: 10)
WLBU-3	VRRVW RRVVR VVRRW VRRVR RVVRR VVRVV RRWVR R	(SEQ ID NO: 11)
WLBU-4	RVVVR VRRVV RRVRR VVRRV VRVVR RVVRR VRRVV RRVVR VVRRV RVV	(SEQ ID NO: 12)

[0046] 本文所述的抗微生物肽在生理盐浓度和其他条件下对微生物具有高度抑制作用, 并在滑液存在下发挥作用, 在动物模型中仅表现出最小的毒性。因此, 该抗微生物剂可以定义为选择性抗微生物剂。抗微生物肽包括下表2所示的富含精氨酸/色氨酸的肽。SEQ ID NOS:1-16的肽描述于美国专利号8,071,540中, 并且该专利和随后的出版物证明了它们的广谱抗微生物活性。

[0047] 表2

肽	序列	备注
WR6	RRWRR	SEQ ID NO:13
WR12	RWRWRRWRR	SEQ ID NO:14
WR18	WRRWRRWRRWRRWRR	SEQ ID NO:15
WR24	RRWRRWRRWRRWRRWRRWRR	SEQ ID NO:16

[0049] 其他LLP-1源性抗微生物肽公开于美国专利号6,887,847和国际专利申请公开号2018/160997中, 两者均通过引用并入本文, 因为它们公开了LLP-1源性抗微生物肽。

[0050] 提供了治疗感染、减少伤口中微生物负荷或冲洗患者伤口的方法。伤口可以是外伤性的或外科手术的, 例如, 由外科医生在外科手术过程中暴露感染的植入体或感染的组织(如脓肿)造成的。该方法包括, 用包含LLP-1源性抗微生物肽(例如SEQ ID NOS:1-16之一

的肽,例如WLB-2)的洗涤、冲洗或灌洗溶液,即本文所述的冲洗液,洗涤任选地包含微生物或生物膜的伤口或植入体。该组合物可以是碱性的(pH为至少7.2)和/或亚生理低渗的(例如,容量渗透压浓度、重量渗透压浓度或离子强度比血液或正常(0.9%w/v)盐水低)。洗涤减少或消除伤口或植入体的微生物负荷。

[0051] 包含抗微生物肽的冲洗液,例如生理低渗溶液,或具有碱性pH和/或亚生理容量渗透压浓度的溶液,其接触时间适合在外科手术环境中使用,在30分钟或更短的时间内,例如在20分钟或更短时间、15分钟或更短时间、10分钟或更短时间或5分钟或更短时间内,表现出微生物负荷降低3个log或更多。与先前描述的组合物相比,即使是包括所描述的LLP-1源性肽(例如SEQ ID NOS:1-16的那些肽)的那些组合物,本文所述的冲洗液,例如本文所述的碱性和/或低渗溶液,可如此迅速地降低微生物负荷,以至于它们可以用于手术环境中而无需大量等待时间。

[0052] 有多种洗涤或冲洗伤口或植入体的方法,包括浸泡、用重力从例如IV(静脉注射)袋供给溶液的低压灌洗,或将洗涤溶液泵入或脉冲到伤口中的高压灌洗。冲洗溶液可用于通过任何有用的方法洗涤或冲洗伤口或植入体,包括根据例如外科领域中已知的任何有用的方法浸泡或主动喷射、喷雾或脉冲,包括但不限于:浇冲洗液、重力滴冲洗液、喷冲洗液,例如:使用医用注射器,用诸如脉冲灌洗设备等灌洗设备泵送或脉冲化液体。一旦最初与伤口或植入体接触,则使冲洗溶液接触适当的持续时间以充分减少微生物负荷或生物膜,例如1、2、5、10、15、20、25或30分钟,在此期间可以使冲洗液在接触期间保持、停留或浸泡在适当位置,或连续或非连续施用,当不递送时,允许它在接触期间保持、停留或浸泡在适当位置接触时间。

[0053] 在一个实例中,膝关节植入体或其他骨科植入体可能会被感染。在目前的实践中,对感染的组织进行清创,用盐溶液或另一种生理溶液冲洗部分或完全暴露的植入体。由于清理感染的植入体和周围组织的传统方法在充分或完全去除微生物方面是无效的,因此向患者施用抗生素。随着此类微生物对抗生素耐药性的风险增加,抗生素治疗可能是困难的或无效的。本文所述的组合物和方法能够在短时间内(例如,在少于30分钟或更快)显著减少微生物负荷或消除微生物负荷,并且因此可以减少或消除治疗后的感染,和/或降低术后感染的难度。

[0054] 植入体可以是临时或永久插入患者体内的任何异物,例如整形外科植入体、引流管、套管或导管,例如用于透析、支架、起搏器或任何其他器械。

[0055] 本文还提供了用于向患者(例如向患者的伤口)递送本文所述包含抗微生物肽的洗涤、冲洗或灌洗溶液的洗涤、冲洗或灌洗系统。图1示意性地描绘了脉冲灌洗系统10,其包括用于递送例如伤口冲洗用冲洗液的冲洗执行机构。系统10包括冲洗执行机构子系统15(执行机构),该子系统15包括本体20,本体20具有吸嘴22和出口喷嘴23,本体20通过该出口喷嘴泵送流体。本体20包括一个或多个内部泵(24,以虚线示意性地示出),该内部泵可以由内部电池(25,以虚线示意性地示出)电池供电或使用通过电源适配器(未示出)连接到本体的电源外部供电,并且经配置通过出口喷嘴23以连续或脉冲方式将液体泵送为流、喷雾或喷射流。泵24的操作由触发器26控制,触发器26可以以开/关方式起作用,或者可以逐步、线性或非线性地控制泵送速度。提供了第一管28,第一管28与吸嘴22流体连接,并且经配置使得对第一管28施加真空以通过吸嘴22抽吸液体和碎屑。可以在第一管28与吸嘴22之间串联

插入阀(未示出),以控制通过吸嘴22的抽吸,并且阀可以是或可以独立地起作用,例如,通过结合到本体20中的第二触发器或与触发器26的动作同时。触发器26和任何其他触发器或控制器可以在本体外部,例如以脚踏开关、踏板或执行机构的形式。描绘了第二管29并且其连接于泵24和出口喷嘴23。系统10还包括储液器30,例如包含含本文所述抗微生物肽的洗涤、冲洗或灌洗溶液32的瓶子或袋子(例如i.v.袋)。第二管29配置在储液器30内以将溶液32供应到本体20的泵,从而通过出口喷嘴23递送溶液32。吸嘴22和出口喷嘴24可以各自独立地具有任何有用的形状或适用于众所周知的脉冲灌洗设备的配置。或者,执行机构可以仅包括出口喷嘴,例如,使用连接到包括吸嘴的单独抽吸设备的独立的外部真空供应和捕集器,独立于灌洗系统而施加抽吸。图1的系统10仅仅是示例性的。灌洗设备结构和设计的变化在本领域中是众所周知的,例如喷雾器驱动或泵驱动的冲洗设备,任选地包括用于去除液体和组织的抽吸特征,例如但不限于Simpulse™ VariCare™ Suction Irrigator (Davol, Inc.)、脉冲间脉冲灌洗系统(Stryker)或IGLOO®伤口冲洗设备(Bionix)。

[0056] 剂量

[0057] 在一些情况下,本文所述的肽、其盐或包含肽或其盐的药物组合物可以以下述剂量施用:约1mg至约1000mg、约5mg至约1000mg、约10mg的剂量施用至约1000mg、约15mg至约1000mg、约20mg至约1000mg、约25mg至约1000mg、约30mg至约1000mg、约35mg至约1000mg、约40mg至约1000mg、约45mg至约1000mg、约50mg至约1000mg、约55mg至约1000mg、约60mg至约1000mg、约65mg至约1000mg、约70mg至约1000mg、约75mg至约1000mg、约80mg至约1000mg、约85mg至约1000mg、约90mg至约1000mg、约95mg至约1000mg、约100mg至约1000mg、约150mg至约1000mg、约200mg至约1000mg、约250mg至约1000mg、约300mg至约1000mg、约350mg至约1000mg、约400mg至约1000mg、约450mg至约1000mg、约500mg至约1000mg、约550mg至约1000mg、约600mg至约1000mg、约650mg至约1000mg、约700mg至约1000mg、约750mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、约850mg至约1000mg、约900mg至约1000mg或约950mg至约1000mg。

[0058] 在一些情况下,本文所述的制剂可以是单位剂量形式。在某些情况下,单位剂量可以为约0.001 μ g/kg至约1000mg/kg、约0.001 μ g/kg至约900mg/kg、约0.001 μ g/kg至约800mg/kg、约0.001 μ g/kg至约700mg/kg、约0.001 μ g/kg至约600mg/kg、约0.001 μ g/kg至约500mg/kg、约0.001 μ g/kg至约400mg/kg、约0.001 μ g/kg至约300mg/kg、约0.001 μ g/kg至约200mg/kg、约0.001 μ g/kg至约100mg/kg、约0.001 μ g/kg至约90mg/kg、约0.001 μ g/kg至约80mg/kg、约0.001 μ g/kg至约70mg/kg、约0.001 μ g/kg至约60mg/kg、约0.001 μ g/kg至约50mg/kg、约0.001 μ g/kg至约40mg/kg、约0.001 μ g/kg至约30mg/kg、约0.001 μ g/kg至约20mg/kg、约0.001 μ g/kg至约10mg/kg、约0.001 μ g/kg至约9mg/kg、约0.001 μ g/kg至约8mg/kg、约0.001 μ g/kg至约7mg/kg、约0.001 μ g/kg至约6mg/kg、约0.001 μ g/kg至约5mg/kg、约0.001 μ g/kg至约4mg/kg、约0.001 μ g/kg至约3mg/kg、约0.001 μ g/kg至约2mg/kg、约0.001 μ g/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约1000mg/kg、约0.001mg/kg至约900mg/kg、约0.001mg/kg至约800mg/kg、约0.001mg/kg至约700mg/kg、约0.001mg/kg至约600mg/kg、约0.001mg/kg至约500mg/kg、约0.001mg/kg至约400mg/kg、约0.001mg/kg至约300mg/kg、约0.001mg/kg至约200mg/kg、约0.001mg/kg至约100mg/kg、约0.001mg/kg至约90mg/kg、约0.001mg/kg至约80mg/kg、约0.001mg/kg至约70mg/kg、约0.001mg/kg至约60mg/kg、约0.001mg/kg至约50mg/kg、约

0.001mg/kg至约40mg/kg、约0.001mg/kg至约30mg/kg、约0.001mg/kg至约20mg/kg、约0.001mg/kg至约10mg/kg、约0.001mg/kg至约9mg/kg、约0.001mg/kg至约8mg/kg、约0.001mg/kg至约7mg/kg、约0.001mg/kg至约6mg/kg、约0.001mg/kg至约5mg/kg、约0.001mg/kg至约4mg/kg、约0.001mg/kg至约3mg/kg、约0.001mg/kg至约2mg/kg、约0.001mg/kg至约1mg/kg、约0.001mg/kg至约0.9mg/kg、约0.001mg/kg至约0.8mg/kg、约0.001mg/kg至约0.7mg/kg、约0.001mg/kg至约0.6mg/kg、约0.001mg/kg至约0.5mg/kg、约0.001mg/kg至约0.4mg/kg、约0.001mg/kg至约0.3mg/kg、约0.001mg/kg至约0.2mg/kg, or from about 0.001mg/kg至约0.1mg/kg (肽或其药学上可接受的盐/个体重量)。在一起情况下,单位剂量可以为约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg、约1.8mg/kg、约1.9mg/kg、约2mg/kg、约2.1mg/kg、约2.2mg/kg、约2.3mg/kg、约2.4mg/kg、约2.5mg/kg、约2.6mg/kg、约2.7mg/kg、约2.8mg/kg、约2.9mg/kg、约3mg/kg、约3.1mg/kg、约3.2mg/kg、约3.3mg/kg、约3.4mg/kg、约3.5mg/kg、约3.6mg/kg、约3.7mg/kg、约3.8mg/kg、约3.9mg/kg、约4mg/kg、约4.1mg/kg、约4.2mg/kg、约4.3mg/kg、约4.4mg/kg、约4.5mg/kg、约4.6mg/kg、约4.7mg/kg、约4.8mg/kg、约4.9mg/kg、约5mg/kg、约5.1mg/kg、约5.2mg/kg、约5.3mg/kg、约5.4mg/kg、约5.5mg/kg、约5.6mg/kg、约5.7mg/kg、约5.8mg/kg、约5.9mg/kg、约6mg/kg、约6.1mg/kg、约6.2mg/kg、约6.3mg/kg、约6.4mg/kg、约6.5mg/kg、约6.6mg/kg、约6.7mg/kg、约6.8mg/kg、约6.9mg/kg、约7mg/kg、约7.1mg/kg、约7.2mg/kg、约7.3mg/kg、约7.4mg/kg、约7.5mg/kg、约7.6mg/kg、约7.7mg/kg、约7.8mg/kg、约7.9mg/kg、约8mg/kg、约8.1mg/kg、约8.2mg/kg、约8.3mg/kg、约8.4mg/kg、约8.5mg/kg、约8.6mg/kg、约8.7mg/kg、约8.8mg/kg、约8.9mg/kg、约9mg/kg、约9.1mg/kg、约9.2mg/kg、约9.3mg/kg、约9.4mg/kg、约9.5mg/kg、约9.6mg/kg、约9.7mg/kg、约9.8mg/kg、约9.9mg/kg、约10mg/kg、约10.1mg/kg、约10.2mg/kg、约10.3mg/kg、约10.4mg/kg、约10.5mg/kg、约10.6mg/kg、约10.7mg/kg、约10.8mg/kg、约10.9mg/kg、约11mg/kg、约11.1mg/kg、约11.2mg/kg、约11.3mg/kg、约11.4mg/kg、约11.5mg/kg、约11.6mg/kg、约11.7mg/kg、约11.8mg/kg、约11.9mg/kg、约12mg/kg、约12.1mg/kg、约12.2mg/kg、约12.3mg/kg、约12.4mg/kg、约12.5mg/kg、约12.6mg/kg、约12.7mg/kg、约12.8mg/kg、约12.9mg/kg、约13mg/kg、约13.1mg/kg、约13.2mg/kg、约13.3mg/kg、约13.4mg/kg、约13.5mg/kg、约13.6mg/kg、约13.7mg/kg、约13.8mg/kg、约13.9mg/kg、约14mg/kg、约14.1mg/kg、约14.2mg/kg、约14.3mg/kg、约14.4mg/kg、约14.5mg/kg、约14.6mg/kg、约14.7mg/kg、约14.8mg/kg、约14.9mg/kg、约15mg/kg、约15.1mg/kg、约15.2mg/kg、约15.3mg/kg、约15.4mg/kg、约15.5mg/kg、约15.6mg/kg、约15.7mg/kg、约15.8mg/kg、约15.9mg/kg、约16mg/kg、约16.1mg/kg、约16.2mg/kg、约16.3mg/kg、约16.4mg/kg、约16.5mg/kg、约16.6mg/kg、约16.7mg/kg、约16.8mg/kg、约16.9mg/kg、约17mg/kg、约17.1mg/kg、约17.2mg/kg、约17.3mg/kg、约17.4mg/kg、约17.5mg/kg、约17.6mg/kg、约17.7mg/kg、约17.8mg/kg、约17.9mg/kg、约18mg/kg、约18.1mg/kg、约18.2mg/kg、约18.3mg/kg、约18.4mg/kg、约18.5mg/kg、约18.6mg/kg、约18.7mg/kg、约18.8mg/kg、约18.9mg/kg、约19mg/kg、约19.1mg/kg、约19.2mg/kg、约19.3mg/kg、约19.4mg/kg、约19.5mg/kg、约19.6mg/kg、约19.7mg/kg、约19.8mg/kg、约19.9mg/kg、约20mg/kg、约20.1mg/kg、约20.2mg/kg、约20.3mg/kg、约20.4mg/kg、约20.5mg/kg、约20.6mg/kg、

kg、约45.5mg/kg、约45.6mg/kg、约45.7mg/kg、约45.8mg/kg、约45.9mg/kg、约46mg/kg、约46.1mg/kg、约46.2mg/kg、约46.3mg/kg、约46.4mg/kg、约46.5mg/kg、约46.6mg/kg、约46.7mg/kg、约46.8mg/kg、约46.9mg/kg、约47mg/kg、约47.1mg/kg、约47.2mg/kg、约47.3mg/kg、约47.4mg/kg、约47.5mg/kg、约47.6mg/kg、约47.7mg/kg、约47.8mg/kg、约47.9mg/kg、约48mg/kg、约48.1mg/kg、约48.2mg/kg、约48.3mg/kg、约48.4mg/kg、约48.5mg/kg、约48.6mg/kg、约48.7mg/kg、约48.8mg/kg、约48.9mg/kg、约49mg/kg、约49.1mg/kg、约49.2mg/kg、约49.3mg/kg、约49.4mg/kg、约49.5mg/kg、约49.6mg/kg、约49.7mg/kg、约49.8mg/kg、约49.9mg/kg或约50.0mg/kg。

[0059] 试剂盒

[0060] 本文公开了试剂盒。试剂盒可包括肽、其盐、含本文所述肽的制剂或药物组合物。在一些方面，肽、制剂或组合物包装在容器中。在一些方面，试剂盒还可以包括指导向个体施用单位剂量的肽或制剂的说明书。在一些方面，试剂盒可以包括本文公开的肽及其使用说明。

[0061] 制备试剂盒的方法可以包括将肽、其盐、包含本文所述肽的制剂或药物组合物置于用于包装的容器中。方法还可以包括包括使用说明。在一些情况下，使用说明可以指导向个体施用单位剂量的肽或制剂。

[0062] 施用方法

[0063] 施用可以根据需要口服、直肠或胃肠外施用含有常规可接受的载体、佐剂和赋形剂的制剂。施用也可以是动脉内、静脉内、肌肉内、口服、皮下、鼻内、吸入或其任何组合。在一些实施方案中，施用可以是注射或输注，包括动脉内、心内、脑室内、皮内、十二指肠内、髓内、肌肉内、骨内、腹膜内、鞘内、血管内、静脉内、玻璃体内、硬膜外和皮下)、吸入、经皮、经粘膜、舌下、颊和局部(包括表皮、真皮、灌肠、滴眼液、滴耳液、鼻内、阴道)施用。在一些示例性实施方案中，施用途径可以通过注射，例如肌内、静脉内、皮下或腹膜内注射。

[0064] 向个体施用肽、其盐或包含肽或其盐的药物组合物可以用于至少部分改善个体的细菌感染。肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以进行以下治疗持续时间：至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100天，连续或非连续天数。在一些情况下，治疗持续时间可以为约1至约30天、约2至约30天、约3至约30天、约4至约30天、约5至约30天、约6至约30天、约7至约30天、约8至约30天、约9至约30天、约10至约30天、约11至约30天、约12至约30天、约13至约30天、约14至约30天、约15至约30天、约16至约30天、约17至约30天、约18至约30天、约19至约30天、约20至约30天、约21至约30天、约22至约30天、约23至约30天、约24至约30天、约25至约30天、约26至约30天、约27至约30天、约28至约30天或约29至约30天。

[0065] 肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以一天进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24次。在一些实施方案中，可以连续施用肽、盐或包含肽的药物组合物。在一些实施方案中，可以非连续施用肽、盐或包含肽的药物组合物。

[0066] 在一些情况下,肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以一周进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21次。在一些情况下,肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以一月进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90次。

[0067] 在一些情况下,肽、盐或包含肽的药物组合物可以与本文所述的其他抗生素、抗真菌剂或抗病毒剂联合施用。肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以与本文所述的其他抗生素、抗真菌剂或抗病毒剂同时进行。在一些实施方案中,肽、盐或包含肽的药物组合物的施用可以作为本文所述其他抗生素、抗真菌剂或抗病毒剂的二级治疗进行。

[0068] 在一些示例性实施方案中,其他抗生素可以选自:硝酸银、头孢比罗、头孢洛林、克林霉素、头孢唑啉、达巴万星、达托霉素、利奈唑胺、莫匹罗星、奥利万星、泰地唑胺、特拉万星、替加环素、万古霉素、氨基糖苷、碳青霉烯、头孢他啶、头孢吡肟、头孢比罗、氟喹诺酮、哌拉西林、替卡西林、利奈唑胺、链霉素、替加环素、达托霉素、任何这些的盐及其任何组合。在一些情况下,抗病毒化合物可选自:阿昔洛韦、溴夫定、二十二烷醇、泛昔洛韦、碘苷、喷昔洛韦、曲氟尿苷、伐昔洛韦、金刚烷胺、金刚烷乙胺、神经氨酸酶抑制剂、奥司他韦、扎那米韦、这些中任一种的盐及其任何组合。

[0069] 在一些示例性实施方案中,可以向个体施用肽以治疗金黄色葡萄球菌感染,治疗持续时间为约5天到30天左右。可以通过阻止病原体生长或改善与感染相关的症状来确定治疗的停止。

[0070] 实施例1

[0071] WLBU-2是基于优化天然存在的抗微生物肽LL37的合成改造的阳离子肽的一个实例(参见,例如,美国专利号8,071,540)。基于其快速消除植入体表面抗生素耐受性生物膜的能力和对ESKAPE(屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌)或E.coli病原体的广谱活性(参见例如Santajit,S.,et al.,Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens (2016) Biomed Res Int.2016;2016:2475067,doi:10.1155/2016/2475067),其使用的潜在适应症包括DAIR的术中递送和PJI中的两阶段程序。

[0072] 典型的临床冲洗解决方案包括生理盐水或乳酸盐林格氏溶液。pH和这些缓冲溶液对用抗微生物剂处理所需的接触时间的影响是未知的。本研究的目的是,了解手术室使用的典型缓冲溶液的pH和pH对抗微生物活性的影响以及WLBU-2的所需接触时间。假设与更生理缓冲的溶液相比,在手术室中用于冲洗的典型溶液、生理盐水和乳酸盐林格氏溶液会导致基于较低pH的活性丧失。

[0073] 材料和方法

[0074] 细菌菌株和培养物.金黄色葡萄球菌SH1000用于体外试验和PJI动物模型。在37°C下将SH1000接种于Tryptic Soy Broth(胰蛋白酶大豆肉汤)(TSB,Becton Dickinson and Company)中过夜,同时以250rpm摇动。使用0.5MacFarland Standard(GFS Chemicals)和Infinite M200 Spectrophotometer(Tecan)将菌株在Mueller Hinton Broth(MHB;Bectin Dickinson and Company)中稀释至 0.5×10^6 CFU/ml的最终浓度。WLBU-2(PLG0206)由

Peptilogics (San Jose, California) 提供。在三个不同时间用新鲜接种的培养物至少一式三份进行所有实验。

[0075] 金黄色葡萄球菌生物膜植入体外杀伤试验. 植入体材料由直径为0.6mm的不锈钢克氏丝 (Synthes) 制成, 并切成6mm长, 高压灭菌, 并与SH1000和 1×10^6 CFU/ml的所有临床菌株一起平板接种在孔中。平板接种后, 在24小时时更换新鲜的MHB培养基。在48小时时, 将具有成熟生物膜的丝放入具有头孢唑啉或WLB-2的新鲜MHB中。用0.13、0.25、0.5和1mg/ml的头孢唑啉或62、125、250和500mg/ml的WLB-2处理生物膜。头孢唑啉处理的生物膜在药物添加后2、6和24小时去除, WLB-2处理的生物膜在药物添加后5分钟、20分钟、60分钟和2小时去除。处理后, 将克氏丝放入1ml 1% Tween 20中并超声处理10分钟。将超声处理产物连续稀释, 并平板接种于含有血琼脂的TSA II 5%绵羊血CS100平板上, 用于菌落形成单位 (CFU) 分析。对于pH分析, 在加入WLB-2之前, 使用盐酸将PBS调节至更酸性的pH, 使用氢氧化铵将其调节至更碱性的pH。用在调节至pH 6.5、6.8、7.0、7.2、7.4和8.0的PBS中0.5和1.0mg/ml的WLB-2, 测试感染的植入片。在2.5-20分钟的非常早期时间点处理生物膜植入片, 然后进行CFU分析。

[0076] 关节假体周围感染鼠冲洗模型. 所有实验均使用12周龄的B57BL/6 J雌性小鼠 (Jackson)。用2%异氟醚麻醉小鼠, 从腿上去除毛发并用必达净 (Betadine) 处理。用手术刀做一个内侧髌旁切口, 股四头肌-髌骨复合体的横向位移使得股骨髌间缺口可视化。使用25号丝, 手动扩孔股骨髓内管。将先前在0.6mm宽/6mm长的克氏丝 (Synthes) 上建立的成熟金黄色葡萄球菌生物膜插入扩孔管中, 并缝合闭合。48小时后, 对小鼠实施安乐死, 取出感染的克氏丝植入体, 置于在先前pH调节至6.5、7.0、7.2或7.4的PBS中的1.0mg/ml WLB-2中, 持续10分钟, 然后将1% Tween 20置于冰上。将植入体超声处理10分钟。将样品连续稀释并平板接种于TSA II 5%绵羊血CS100平板上, 用于CFU分析。

[0077] 统计

[0078] 所有统计方法均使用Prism 7.0 (GraphPad, La Jolla CA) 进行。使用Kruskal-Wallis检验和Dunn的多重比较后测对多个组进行比较。在所有情况下, $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.005$ (**)、 $p < 0.0005$ (***) 和 $p < 0.0001$ (****) 认为是显著的。

[0079] 结果

[0080] WLB-2活性在临床使用的典型缓冲溶液中降低。在临床常用冲洗缓冲溶液即生理盐水和乳酸盐林格氏溶液中测试了WLB-2的活性。将这些结果与生理缓冲溶液即磷酸盐缓冲液和MHB培养基 (微生物实验室中用于测量MIC的典型培养基) 进行了比较。在未处理的情况下, 在克氏丝植入片上生长的生物膜在24小时内表现出 $0.2-1.0 \times 10^6$ CFU/ml。与未处理的植入片相比, 头孢唑啉处理在6小时内仅导致生物膜CFU适度降低, 并且需要超过24小时才能实现99.9%的CFU减少 (图2A)。相比之下, WLB-2处理导致生物膜CFU的减少更快, 当在MHB培养基中处理时, 在少于2小时内实现了99.9%的减少 (图2A)。用在缓冲PBS中的WLB-2处理生物膜导致以62-1000 μ g/ml剂量进行杀伤的幅度和速度增加, 所有这些都能够在20分钟内实现生物膜CFU中99.9%的减少 (虚线) (图2B)。

[0081] 生理pH增强WLB-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性. 在观察到不同缓冲溶液中WLB-2活性的巨大差异后, 怀疑pH是否会改变治疗性处理所需的接触时间。再次在外科植入材料上培养成熟的生物膜, 并确定作为pH函数的WLB-2所需接触时间。将PBS pH从6.5调

节到8.0,然后添加肽并处理生物膜。在血琼脂板上进行CFU量化,以确定自未处理对照的3log减少(图3A)。随着pH增加到更碱性的条件,观察到获得3log减少所需的接触时间明显减少。在1.0mg/ml时,6.5 pH PBS中的WLB2需要15分钟才能实现3log减少,而8.0 pH PBS中的WLB2只需2.5分钟(图3A)。此外,CFU分析显示,在碱性值为7.4和8.0的PBS的情况下,WLB2处理能够获得0CFU无菌样品(图3B)。

[0082] 碱性调节的WLB2冲洗液改善PJI植入生物膜处理。在鼠PJI动物模型中证实了pH和缓冲溶液对WLB2活性的依赖性。将在克氏丝植入片上生长的成熟生物膜插入膝关节间隙并加以缝合。48小时后,获得植入物片并用在pH调节的PBS中的1.0mg/ml WLB2处理10分钟。使用pH 6.5、7.0、7.2和7.4的pH调节的PBS,用WLB2冲洗液对感染的植入片进行CFU分析,并对用无WLB2(无药物)的7.0PBS处理的植入片进行CFU分析。与无药物组相比,使用调节至pH 7.0、7.2和7.4的WLB2冲洗液均显示出生物膜CFU的显著减少。此外,与pH 6.5的WLB2冲洗液相比,pH 7.4的WLB2冲洗液显示出生物膜CFU的显著减少(图4)。

[0083] 总之,与生物学上更复杂的MHB相比,WLB2在PBS中显示出更快和改善的金黄色葡萄球菌生物膜杀伤。碱性调节的PBS增强了WLB2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。并且,在PJI冲洗小鼠模型中,碱性条件提高了WLB2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。目前,悬浮在盐水或乳酸盐林格氏溶液中的必达净、H₂O₂或氯己定用作抗微生物洗涤液。本文提供的结果表明,WLB2具有潜在的冲洗应用。乳酸盐林格氏溶液的pH值为约6.5,而生理盐水的酸性更强,pH值约为5.5。使用与生物膜直接接触的WLB2时,抗微生物活性最佳。在PJI或任何手术部位感染期间和I&D期间局部使用相对高剂量的WLB2时,这很好地起作用。本文提供的数据表明,使用WLB2作为抗微生物剂进行局部冲洗最好在碱性溶液中进行,例如碱性缓冲盐水,从而导致更快、更完全的生物膜杀伤和清除。

[0084] 实施例2

[0085] 使金黄色葡萄球菌成熟生物膜在金属植入材料上生长,并用溶解在不同冲洗溶剂中的WLB2处理。成熟的生物膜在体外以及关节假体周围感染小鼠模型中都进行了处理。与pH 5.5的生理盐水相比,当WLB2溶解在pH 7.0的dPBS中时,WLB2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性得以增加。WLB2活性在酸性dPBS中可能降低,而在碱性dPBS中可能增加。WLB2活性在高渗dPBS可能降低,而在低渗dPBS中可能增加。溶解在酸性较低的dPBS中的WLB2在处理PJI冲洗鼠模型中显示出功效增加。WLB2显示出对关节成形材料上PJI相关金黄色葡萄球菌生物膜进行灭菌的能力。当将改造的阳离子两亲性肽WLB2保存在酸性较低和更加生理性pH调节的盐水中时,可进一步优化其对术中金黄色葡萄球菌生物膜灭菌的功效。

[0086] 本研究的目的是了解手术室使用的典型缓冲溶液的pH和离子强度以及pH对WLB2的抗微生物活性和所需接触时间的影响。假设与更生理缓冲的溶液相比,在手术室中用于冲洗的典型溶液生理盐水和乳酸盐林格氏溶液会导致基于较低pH的活性丧失。pH和离子强度对改变接触时间以减少生物膜负荷的影响仍然未知。与静脉内递送相比,这会对最大限度地减少直接局部应用这种抗生素所需的接触时间具有重要的处方意义。

[0087] 材料和方法

[0088] 细菌菌株和培养物。金黄色葡萄球菌SH1000用于体外试验和PJI动物模型中。在37℃下将SH1000接种于Tryptic Soy Broth(TSB,Becton Dickinson and Company)中过夜,

同时以250rpm摇动。使用0.5MacFarland Standard (GFS Chemicals) 和Infinite M200 Spectrophotometer (Tecan) 将菌株在Mueller Hinton Broth (MHB; Becton Dickinson and Company) 中稀释至 0.5×10^6 CFU/ml的最终浓度。WLBU-2 (PLG0206) 由Peptilogics (San Jose, California) 提供。在三个不同时间,用新鲜接种的培养物进行至少一式三份进行所有实验。

[0089] 金黄色葡萄球菌生物膜植入体体外杀伤试验. 植入材料由直径为0.6mm的不锈钢克氏丝 (Synthes) 制成,并切成6mm长,高压灭菌,并与SH1000和 1×10^6 CFU/ml的所有临床菌株一起平板接种在孔中。平板接种后,在24小时时,更换新鲜MHB培养基。在48小时时,将具有成熟生物膜的丝放入具有62、125、250、500和1000 μ g/ml的WLBU-2倍数稀释液的新鲜MHB、生理盐水、乳酸盐林格氏溶液或dPBS中。使用溶解在无菌去离子水中的表3所列盐缓冲液的任何组合制备dPBS溶液。处理后,将克氏丝置于1ml dPBS中的1% Tween 20中,并超声处理10分钟。将超声处理产物连续稀释,并平板接种于含有5%绵羊血CS100血琼脂的TSA II平板上,用于菌落形成单位 (CFU) 分析。对于pH分析,在添加WLBU-2之前,使用盐酸将dPBS调节至更酸性的pH,使用氢氧化铵将其调节至更碱性的pH。用在调节至pH 6.5、6.8、7.0、7.2、7.4和8.0的PBS中0.5和1.0mg/ml的WLBU-2测试感染的植入片。对于离子强度分析,通过向dPBS添加NaCl将dPBS调节为高渗条件 (0.3M),并通过向dPBS添加去离子水将dPBS调节为低渗条件 (0.08M)。在2.5-20分钟的非常早期时间点用0.12、0.25、0.5和1.0mg/ml的WLBU-2处理生物膜植入片,然后进行CFU分析。

[0090] 表3

[0091]

盐缓冲液和备选的盐缓冲液成分	容量渗透压浓度 (mOsm/L)
NaCl	20-200
KCl	2-50
KH_2PO_4	2-50
Na_2HPO_4	2-50
CaCl_2	2-50
$\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$	2-50
$\text{CuCl}_2/\text{CuSO}_4/\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{CuO}_{14}$	2-50

[0092] 关节假体周围感染小鼠冲洗模型. 所有实验均使用12周龄的B57BL/6J雌性小鼠 (Jackson)。用2%异氟醚麻醉小鼠,从腿上去除毛发并用必达净处理。用手术刀做一个内侧髌旁切口,股四头肌-髌骨复合体的横向位移使得股骨髌间缺口可视化。使用25号针,手动扩孔股骨髓内管。将先前在0.6mm宽/6mm长的克氏丝 (Synthes) 上建立的成熟金黄色葡萄球菌生物膜插入扩孔管中,并缝合闭合。48小时后,对小鼠实施安乐死并取出感染的克氏丝植入体,置于在先前pH调节至6.5、7.0、7.2或7.4的PBS中的1.0mg/ml WLBU-2中,持续10分钟,然后将1% Tween 20置于冰上。将植入体超声处理10分钟。将样品连续稀释并平板接种于含有5%绵羊血CS100的TSA II平板上,用于CFU分析。

[0093] 统计

[0094] 所有统计方法均使用Prism 7.0 (GraphPad, La Jolla CA) 进行。使用Kruskal-Wallis检验和Dunn的多重比较后测对多个组进行比较。在所有情况下, $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.005$ (**)、 $p < 0.0005$ (***) 和 $p < 0.0001$ (****) 视为显著的。

[0095] 结果

[0096] WLBU-2活性在临床使用的典型缓冲溶液中降低.在手术室中用于冲洗PJI的临床常用缓冲溶液生理盐水和乳酸盐林格氏溶液中测试了WLBU-2的活性,作为剂量的函数.将这些结果与生理磷酸盐缓冲盐水(微生物实验室使用的典型培养洗涤介质)进行了比较.测量pH为5.8的生理盐水在62-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的WLBU-2的情况下显示出细菌生物膜CFU减少了近99%.相比之下,pH为6.5和7.0的乳酸盐林格氏溶液和dPBS在62-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的WLBU-2的情况下分别显示出细菌生物膜减少99.9%以上.WLBU-2在较高pH溶液中在减少植入体表面上生物膜质量方面具有较高的功效,该功效在较低浓度的WLBU-2下是剂量依赖性的.如图5所示,所有三种冲洗溶液都有不同的pH值范围,但也含有不同量的导致容量渗透压浓度和离子强度略有不同的缓冲液(生理盐水-308mOsm/L,0.15M;乳酸盐林格氏溶液-274mOsm/L,0.14M;dPBS-299mOsm/L,0.16M)。

[0097] 生理pH增强WLBU-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性.在观察到不同缓冲溶液中WLBU-2活性的巨大差异后,怀疑冲洗溶液的pH和离子强度是否会改变治疗性处理所需的接触时间.成熟的生物膜再次在外科植入材料上培养成熟的生物膜,并确定作为pH和离子强度的函数的WLBU-2所需接触时间.在血琼脂板上进行CFU量化,以确定自未处理对照的3log减少(图6(A)).随着pH增加到更碱性的条件,观察到获得3log减少所需的接触时间明显减少.在1.0mg/ml时,6.5pH PBS中的WLBU-2需要15分钟才能实现3log减少,而8.0pH PBS中的WLBU-2只需2.5分钟(图6(A)).此外,CFU分析显示,在7.4和8.0的更生理值的PBS的情况下,WLBU-2处理能够获得0CFU无菌样品(图6(B))。

[0098] 离子强度改变WLBU-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性.在观察到pH改变消除生物膜所需接触时间的能力后,怀疑离子强度是否具有类似的改变消除生物膜所需接触时间的能力.离子强度与消除生物膜所需接触时间之间存在反向线性关系.与高渗dPBS相比,0.08M低渗dPBS中的WLBU-2显示获得3log减少(图6(C))和0CFU无菌样品(图6(D))所需的时间较少。

[0099] 生理pH调节的WLBU-2冲洗液改善PJI植入生物膜处理.在鼠PJI动物模型中证实了pH和缓冲溶液对WLBU-2活性的依赖性.将在克氏丝植入片上生长的成熟生物膜插入膝关节间隙并加以缝合.48小时后,获得植入片并用在pH调节的PBS中的1.0mg/ml WLBU-2处理10分钟.使用pH 6.5、7.0、7.2和7.4的pH调节的PBS,用WLBU-2冲洗液对感染的植入片进行CFU分析,并对用无WLBU-2(无药物)的7.0PBS处理的植入片进行CFU分析.与未处理组相比,使用调节至pH 7.0、7.2和7.4的WLBU-2冲洗液均显示出生物膜CFU的显著减少.此外,与pH 6.5的WLBU-2冲洗液相比,pH 7.4的WLBU-2冲洗液显示出生物膜CFU的显著减少(参见图7)。

[0100] 实施例3

[0101] 材料和方法

[0102] 细菌菌株和培养物.将SH1000在37 $^{\circ}\text{C}$ 下接种在TSB中过夜,同时以250转/分钟(rpm)的速度摇动.使用0.5MacFarland Standard和Infinite M200 Spectrophotometer (Tecan)将菌株在MHB中稀释至 0.5×10^6 CFU/mL的最终浓度.WLBU-2 (PLG0206)由Peptilogics (San Jose, California)提供。

[0103] 金黄色葡萄球菌生物膜植入体外杀伤试验.植入物材料由直径0.6mm的不锈钢克氏丝(Synthes)制成,切割成6mm长的片,高压灭菌,并与 1×10^6 CFU/mL的SH1000和所有临床

菌株以一起平板接种在孔中。平板接种后,在24小时时,更换新鲜MHB培养基。在48小时时,将具有成熟生物膜的丝放入具有62、125、250、500和1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的WLB-2倍数稀释液的新鲜MHB、生理盐水、乳酸盐林格氏溶液或dPBS中。处理后,将克氏丝置于1mL dPBS中的1%Tween 20中并超声处理10分钟。将超声处理产物连续稀释,并平板接种于含有5%绵羊血CS100的血琼脂的TSA II平板上,用于CFU分析。通过向dPBS中添加NaCl将DPBS溶液调节至高渗条件,通过向dPBS中添加去离子水将DPBS溶液调节至低渗条件,并使用氢氧化铵将pH调节至约7.5。

[0104] 结果

[0105] 生理pH和离子强度改变WLB-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。证实了生理pH和离子强度缓冲溶液对WLB-2活性的依赖性。与未处理组相比,在暴露10分钟后,由不同离子强度和pH7.5的dPBS制备的WLB-2冲洗液显示生物膜CFU减少(图8)。在7.5的dPBS中制备的所有浓度的WLB-2均实现了3log减少或更多减少,而在pH 7.5的高渗dPBS中制备的WLB-2冲洗液未实现3log减少。在暴露10分钟后,pH 7.5的低渗dPBS中的WLB-2在所有浓度(62、125、250、500和1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WBLU2)下导致0CFU样品。该研究表明,生理pH和低渗离子强度调节的dPBS增强了WLB-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。

[0106] 本研究表明,与目前在手术室使用的更酸性的冲洗溶液(如生理盐水)相比,生理pH调节dPBS增强了WLB-2对抗金黄色葡萄球菌生物膜的活性。重要的是,将冲洗溶液的pH增加到7.0以上导致获得高于99.9%的生物膜清除率所需的接触时间减少到5分钟以下。仅研究了适用于临床使用的冲洗溶剂的pH范围,而不是更酸性和碱性的极端情况。

[0107] 这项工作证明了,改造的两亲性肽,例如LLP-1源性肽,例如WLB-2,可用于在短时间内消除和显着减少关节成形材料上的金黄色葡萄球菌生物膜,这可以在手术室中实现。更重要的是,从配制的角度来看,冲洗溶液的pH和离子强度会改变灭菌或大量消除金黄色葡萄球菌生物膜所需的接触时间。这些结果表明,在减少关节成形材料上的生物膜质量或微生物负荷的冲洗过程中,WLB-2具有处理金黄色葡萄球菌生物膜以及其他生物膜的潜在应用。这类似于在植入过程中使用诸如必达净和氯己定等抗菌溶液去除生物膜质量。在手术期间接受必达净灌洗的患者发生深度关节假体周围感染的机会较低。虽然必达净是有效的,但在PJI的治疗过程中也广泛使用氯己定。比较必达净与氯己定的使用显示,两者都对PJI的治疗有效,但两者都没有优于对方。两种最常用的冲洗溶剂是乳酸盐林格氏溶液和生理盐水,它们的pH分别为约6.5和约5.5。这会改变WLB-2有效所需的功效和接触时间。

[0108] 对使用抗微生物肽治疗感染的主要先验批判是它们的不稳定性。尽管通过合理设计LLP-1源性肽,例如WLB-2,极大地改善了不稳定性,但已经证明,在PJI的I&D期间和在任何手术部位感染的冲洗期间,以与生物膜直接接触的方式且以相对较高的剂量局部使用WLB-2时,它们的活性最佳。数据表明,使用WLB-2进行局部冲洗最好在弱碱性和低渗缓冲盐水溶液中进行,以获得最佳结果。溶解WLB-2的盐水溶液碱性和低渗性越强,会导致更快和更好的生物膜杀灭和清除,并可能降低所需的肽浓度。

[0109] 实施例4

[0110] 目的:

[0111] 本研究的目的是评估WLB2在兔关节假体周围感染(PJI)模型中的功效。

[0112] 赋形剂/对照身份

[0113] 磷酸盐缓冲盐水pH 7.4,室温下

[0114] 制剂详情:

[0115] 将在磷酸盐缓冲盐水中制备剂量给药制剂。将确定制剂的pH(调节至 7.4 ± 0.1)和重量渗透压浓度的测量值。将使用 $0.22 \mu\text{M}$ PVDF过滤每种制剂。

[0116] 实验设计:

[0117] 使用PJI新西兰白兔动物模型。将3D打印的胫骨钛植入体置于膝关节,并在关节切除术后闭合后接种金黄色葡萄球菌(菌株:SH1000,接种密度 2×10^6)。

[0118] 在手术过程中用氯胺酮 $40 \text{mg}/\text{kg}$ 和甲苯噻嗪 $2 \text{mg}/\text{kg}$ 麻醉兔。使用带有 1.2mm 或 1.6mm 碳化钨钻头的钻在胫骨管中创建骨隧道。然后将骨隧道干燥并处理以模拟初次关节成形术后的急性人类PJI。然后将3D打印的钛植入物置于骨隧道中并闭合伤口。在表层皮肤层闭合之前,将 0.1mL 生理盐水中的 2×10^6 个浮游细菌(金黄色葡萄球菌;菌株:SH1000;CFU/兔子)注入关节间隙。进行闭合,并允许在2天内建立生物膜。

[0119] 48小时后,处死动物并将植入体暴露于PBS(pH 7.4)中的局部头孢唑啉($10 \text{mg}/\text{kg}$)或局部WLB2($1 \text{mg}/\text{mL}$)。将植入体超声处理10分钟,并在血琼脂板上进行菌落形成单位(CFU)测定以量化细菌负荷。

[0120] 实验在每组三只兔上完成,总共6只兔。排除标准包括发生肌肉内(关节外)脓肿或股骨管穿孔,因为这两种情况在关节假体周围感染中并不常见。结果如图9所示,头孢唑啉组有3只动物和总共9个数据点,WLB2组有1只动物和3个数据点。

[0121] 在感染后2天,对感染的关节进行冲洗和清创(irrigation and debridement, I&D)。在15分钟(离体和体内)和7.5分钟(体内)暴露时间以 $1 \text{mg}/\text{mL}$ 浓度(离体或体内)和 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 浓度(体内)施用PLG0206治疗。对于离体施用,移除植入体并暴露于试管内的PLG0206溶液15分钟。对于体内施用,对关节进行冲洗和清创,然后进行PLG0206处理。处理后对动物实施安乐死,死后取出植入体。

[0122] 对于离体和体内处理,PLG0206处理组明显不同于比较对照组,细菌负荷减少超过 $2 \log$ 。在体内研究中,与 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ PLG0206相比, $1 \text{mg}/\text{mL}$ PLG0206 15分钟的细菌负荷明显减少更大。用 $1 \text{mg}/\text{mL}$ PLG0206处理7.5分钟观察到类似的细菌负荷减少(图10)。

[0123] 在感染后2天,将对感染的关节进行I&D,并开始治疗。动物将接受I&D单独处理、I&D和PLG0206处理、头孢唑啉或PLG0206和头孢唑啉全身处理。当动物死亡或生病并需要安乐死时,会在死后收集植入体和胫骨的一部分,并会通过CFU确定细菌负荷。会在第28天对所有幸存动物实施安乐死,死后收集植入体和胫骨用于CFU分析。

[0124] 与对照相比, $1 \text{mg}/\text{mL}$ PLG0206单独处理(第3组)不显著。然而, $1 \text{mg}/\text{mL}$ PLG0206与头孢唑啉(第4组)联合处理导致细菌负荷显著降低($2.5 \log$) (图11)。头孢唑啉单独处理(第2组)不足以消除生物膜,细菌负荷仅减少 $1.5 \log$ 。

[0125] 已经描述了本发明,本领域普通技术人员应当理解,同样可以在宽且等效的条件、制剂和其他参数范围内进行,而不影响本发明或其任何实施方案的范围。

序列表

<110> 高等教育联邦系统-匹兹堡大学

K·乌里斯

J·B·曼德尔

<120> 包含抗微生物肽的组合物

<130> 6527-2005591

<150> 62/932,609

<151> 2019-11-08

<150> 63/028,636

<151> 2020-05-22

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 SA-5

<400> 1

Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile

1 5 10 15

Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu

20 25

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LSA-5

<400> 2

Arg Val Ile Arg Val Val Gln Arg Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile

1 5 10 15

Val Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Ile Leu Arg Val Val

20 25 30

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WLSA-5

<400> 3

Arg Trp Ile Arg Val Val Gln Arg Trp Cys Arg Ala Ile Arg His Ile

1 5 10 15

Trp Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Arg Arg Trp Leu Arg Val Val

 20 25 30

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LBU-1

<400> 4

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LBU-2

<400> 5

Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg

1 5 10 15

Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg

 20

<210> 6

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LBU-3

<400> 6

Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg

1 5 10 15

Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val

 20 25 30

Val Arg Arg

35

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LBU-3.5

<400> 7

Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg

1 5 10 15

Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val

20 25 30

Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg

35 40

<210> 8

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 LBU-4

<400> 8

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg Arg Val

1 5 10 15

Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg Val Arg

20 25 30

Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Val Val Arg Arg

35 40 45

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WLBU-1

<400> 9

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WLBU-2

<400> 10

Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Val Val Arg Val

1 5 10 15

Val Arg Arg Trp Val Arg Arg

20

<210> 11

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WLBU-3

<400> 11

Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val

1 5 10 15

Arg Arg Val Arg Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg

20 25 30

Trp Val Arg Arg

35

<210> 12

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WLBU-4

<400> 12

Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg Arg Val

1 5 10 15

Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Val Arg Arg Val Arg

20 25 30

Arg Val Trp Arg Arg Val Val Arg Val Val Arg Arg Trp Arg Val Val

35 40 45

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WR6

<400> 13

Arg Arg Trp Trp Arg Arg

1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WR12

<400> 14

Arg Trp Trp Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WR18

<400> 15

Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗微生物肽 WR24

<400> 16

Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg

1 5 10 15

Trp Trp Arg Arg Trp Trp Arg Arg

20

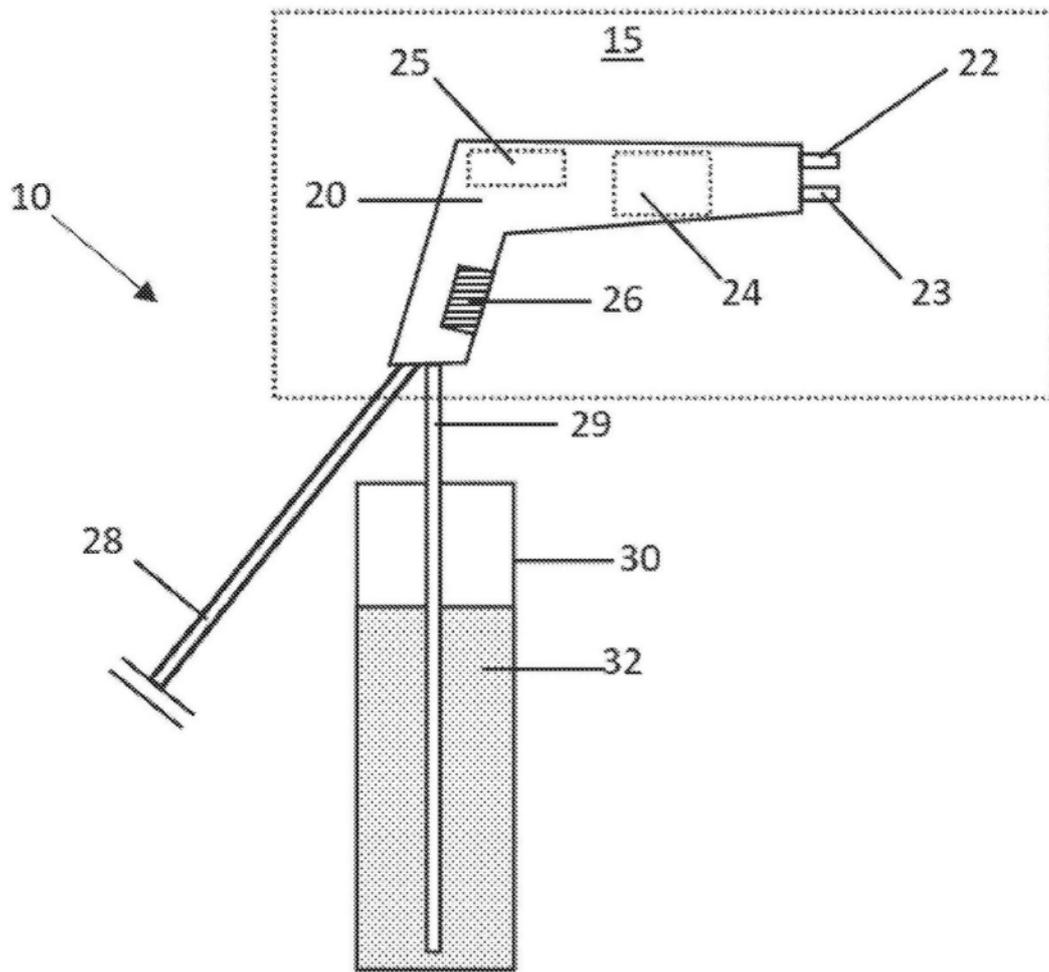


图1

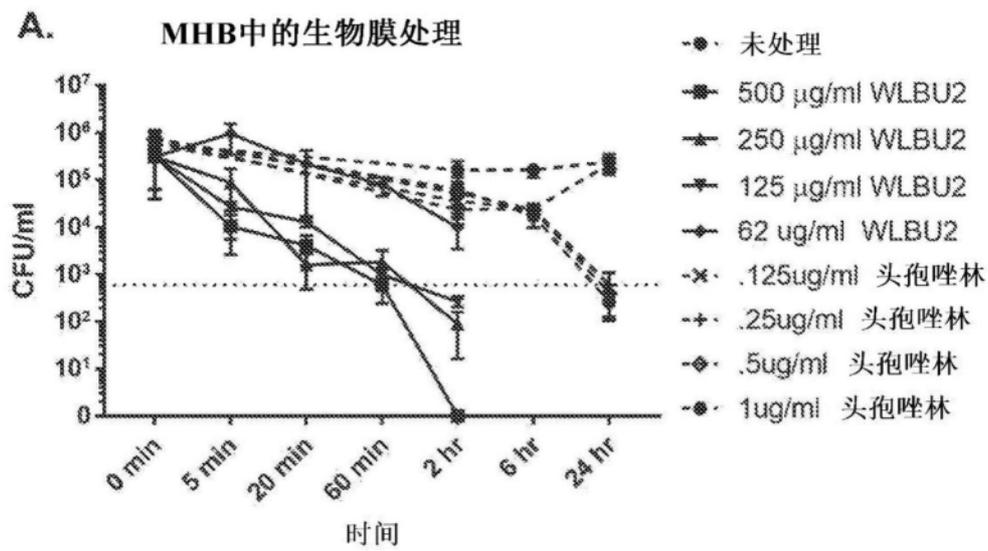


图2A

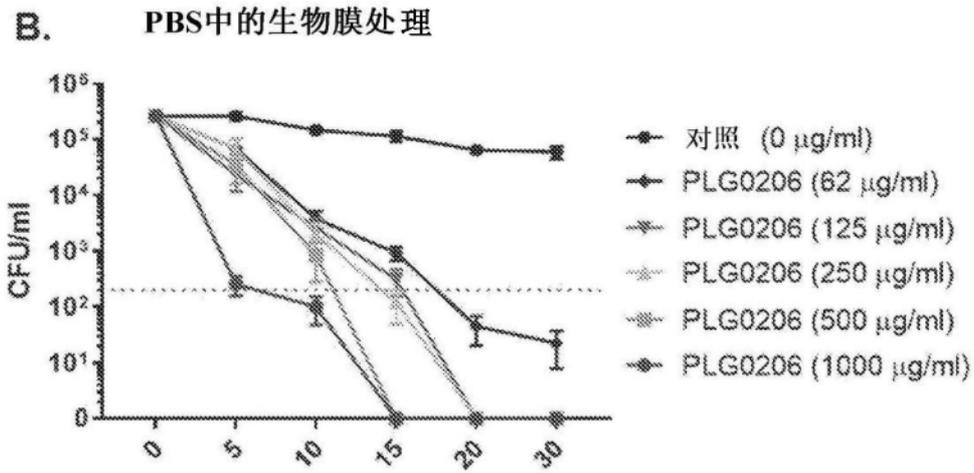


图2B

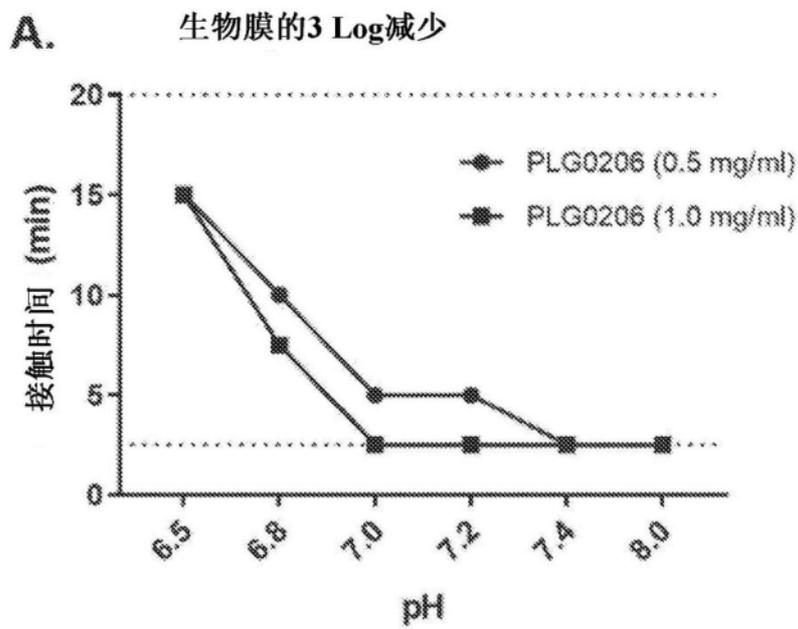


图3A

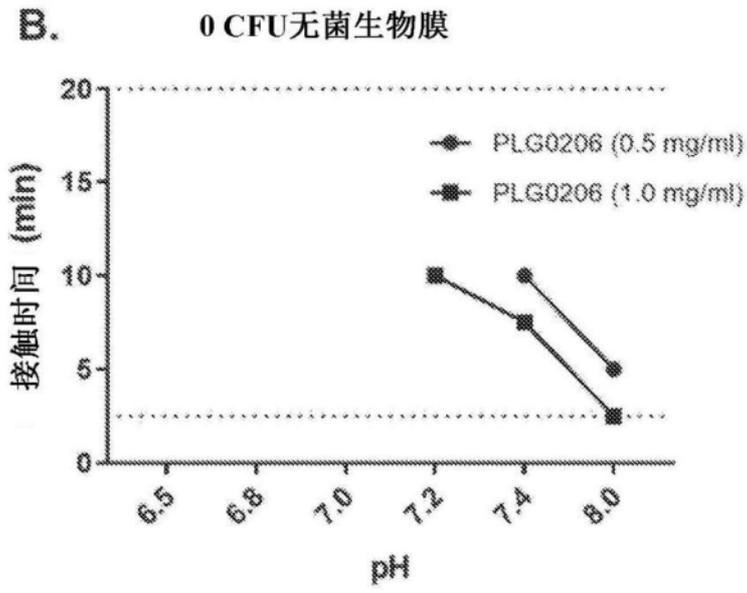


图3B

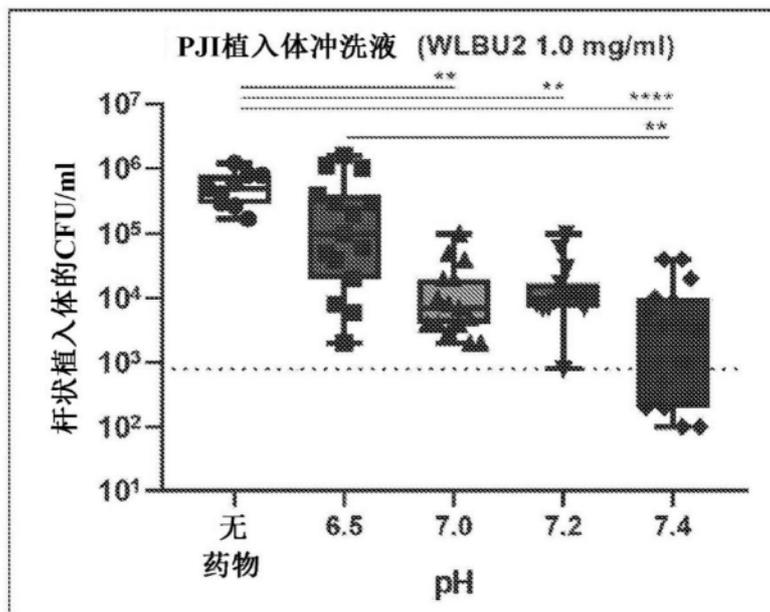


图4

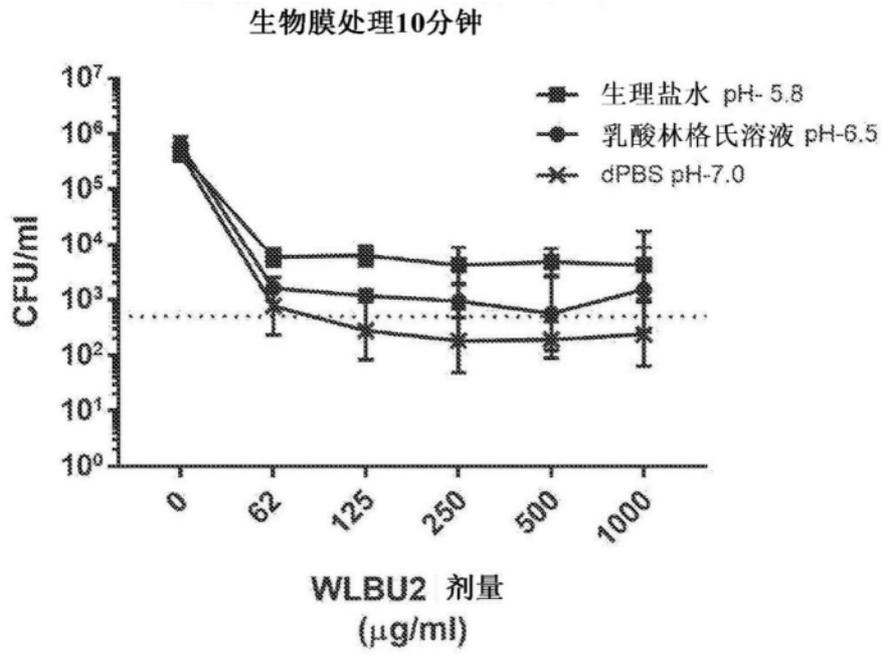


图5

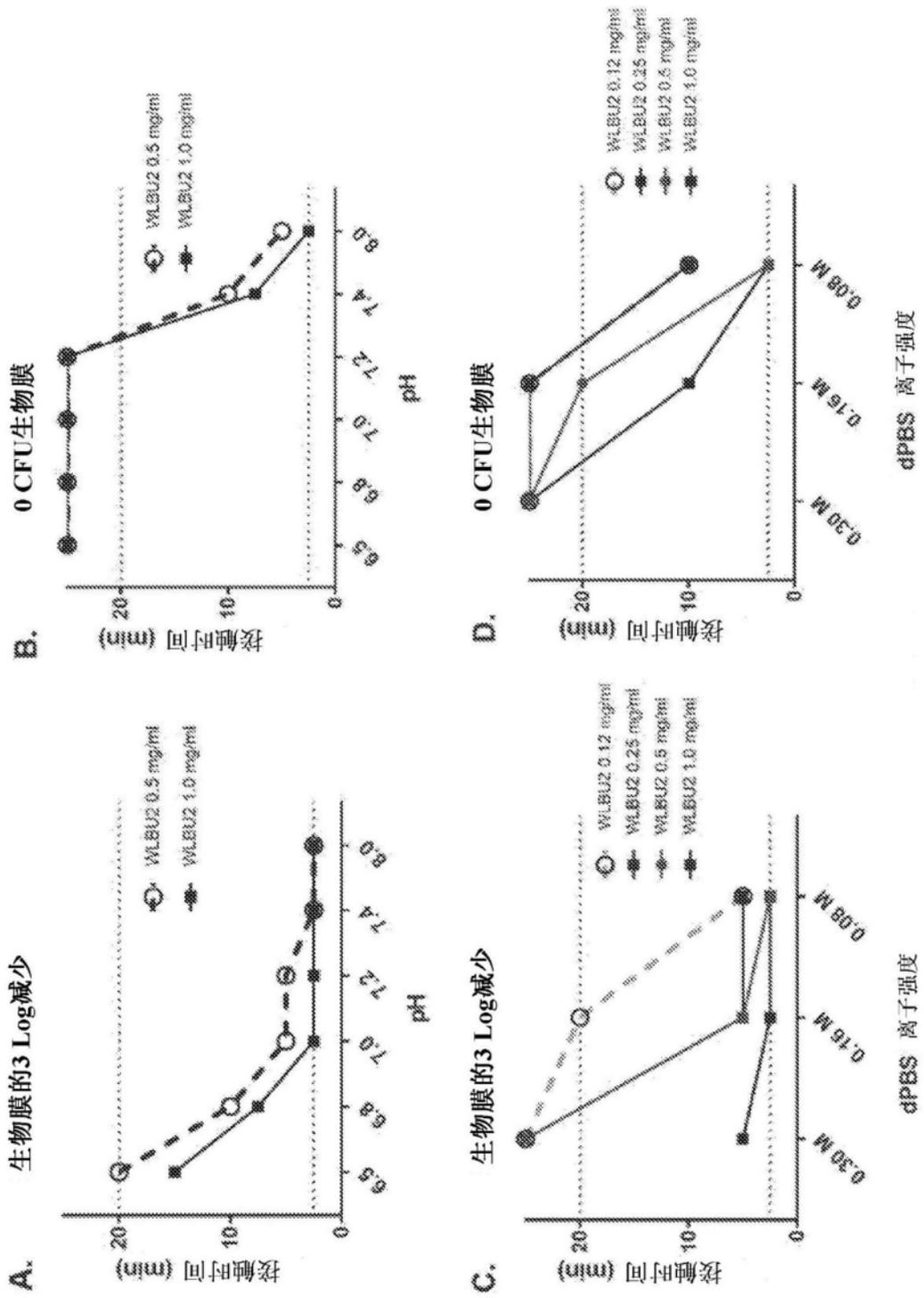


图6

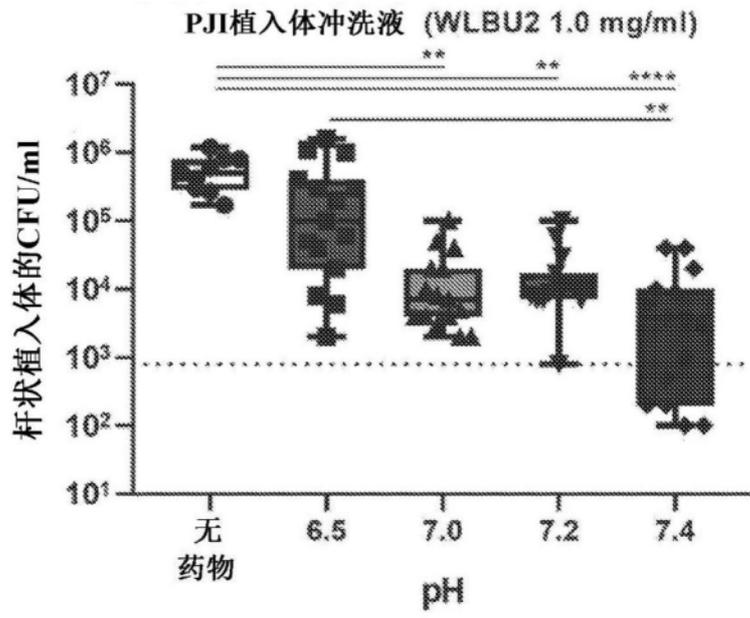


图7

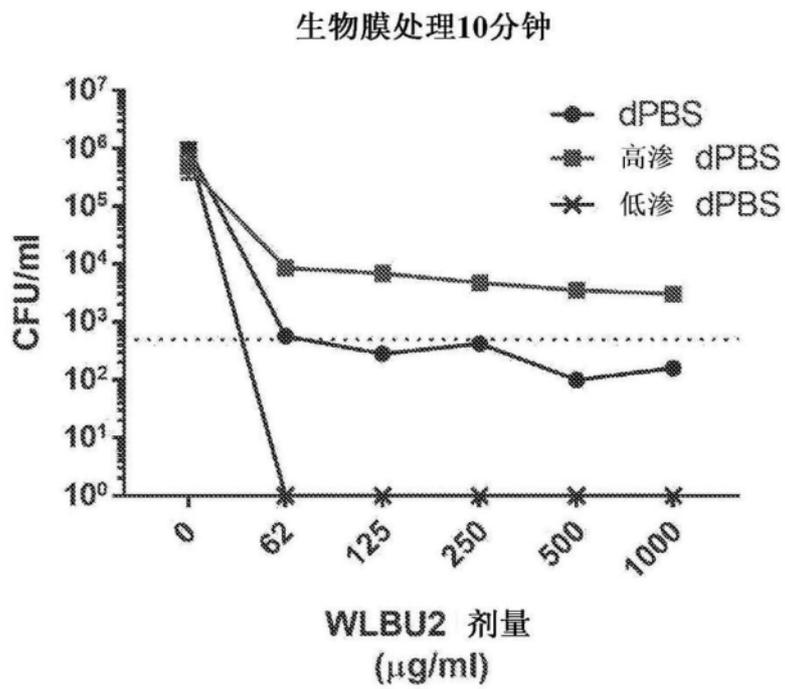


图8

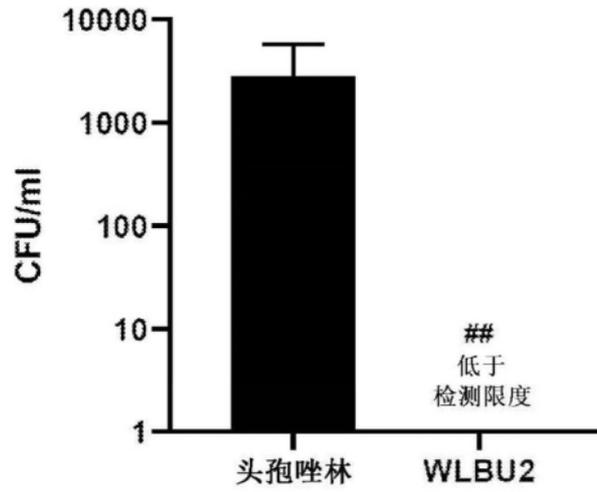


图9

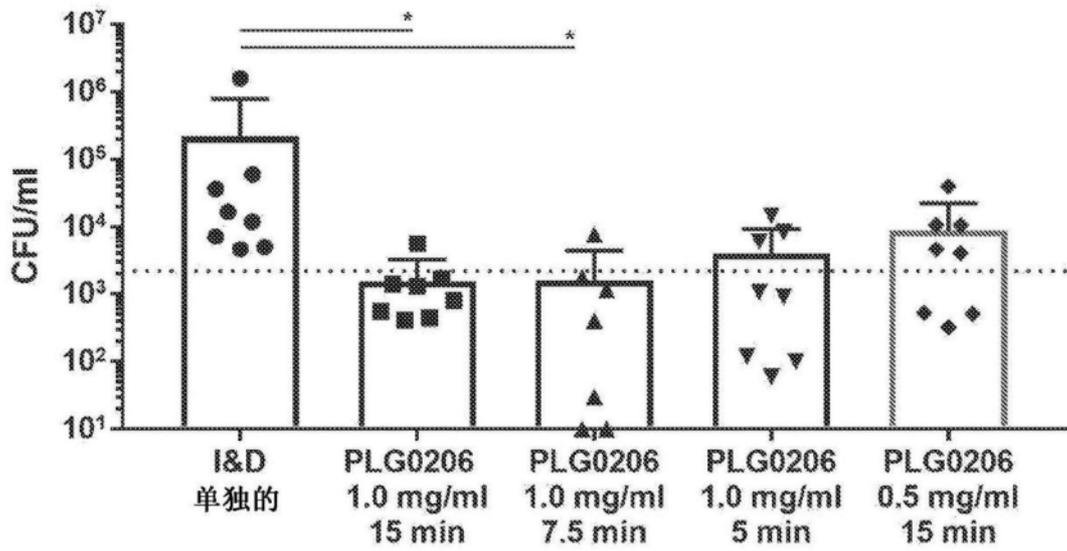


图10

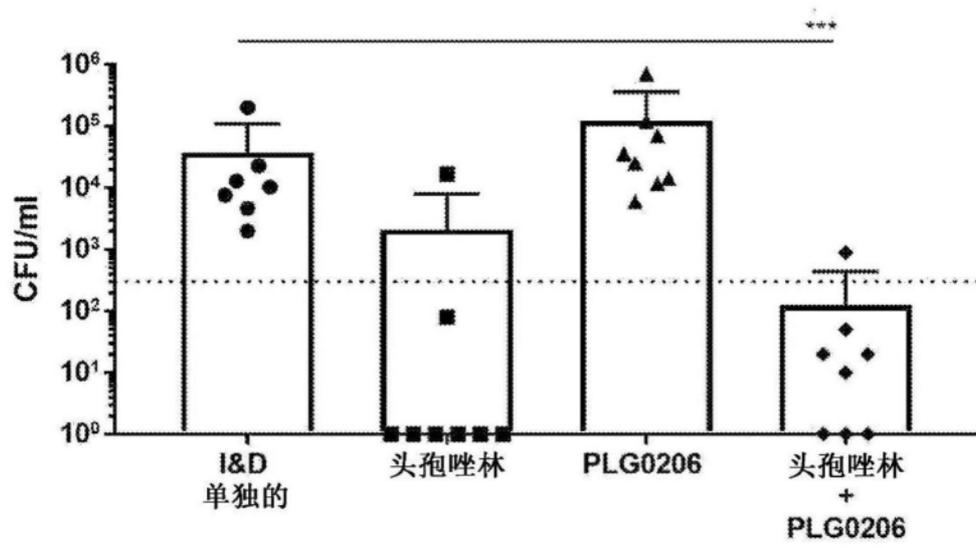


图11