



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104189908 B

(45)授权公告日 2017.01.11

(21)申请号 201410399745.X

A61K 31/734(2006.01)

(22)申请日 2008.10.24

A61K 8/73(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 8/66(2006.01)

申请公布号 CN 104189908 A

A61K 38/48(2006.01)

(43)申请公布日 2014.12.10

A61K 9/08(2006.01)

(30)优先权数据

A01N 65/03(2009.01)

60/996,611 2007.11.27 US

A01N 63/02(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61Q 11/00(2006.01)

200880118093.0 2008.10.24

A61P 17/02(2006.01)

(73)专利权人 阿尔吉法玛公司

A61P 31/02(2006.01)

地址 挪威桑维卡

A61P 29/00(2006.01)

(72)发明人 爱德尔·欧塞也恩

A01P 1/00(2006.01)

罗尔夫·米沃德

A01P 3/00(2006.01)

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

(56)对比文件

公司 11127

CN 1867364 A, 2006.11.22, 权利要求1-8.

代理人 丁香兰 庞东成

CN 1921833 A, 2007.02.28, 权利要求1-10.

(51)Int.Cl.

审查员 陈卫星

A61K 45/06(2006.01)

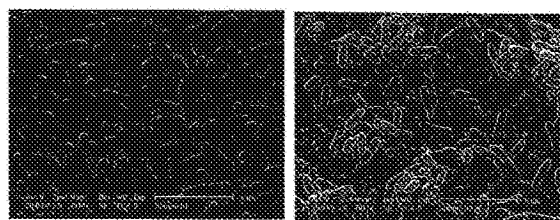
权利要求书1页 说明书29页 附图10页

(54)发明名称

包含藻酸盐低聚物的产品、包含无生命表面的产品和清创组合物

(57)摘要

本发明提供一种包含藻酸盐低聚物的产品，所述藻酸盐低聚物具有至少70%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基和2~100的聚合度。本发明还涉及一种包含无生命表面的产品，所述产品已经用具有至少70%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基和2~100的聚合度的藻酸盐低聚物进行涂布。本发明还涉及一种清创组合物，所述清创组合物包含(i)具有至少70%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基和2~100的聚合度的藻酸盐低聚物，和(ii)至少一种蛋白水解酶和/或至少一种研磨剂固相，其中所述组合物是无菌水溶液或油类无菌溶液。



低粘蛋白

粘蛋白+2%G

1. 一种包含无生命表面的可植入医疗装置,所述产品已经用具有至少70%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基和2~100的聚合度的藻酸盐低聚物进行涂布。

2. 如权利要求1所述的可植入医疗装置,其中,所述可植入医疗装置是假体、软组织植入物或线路。

3. 如权利要求1所述的可植入医疗装置,其中,所述可植入医疗装置是支架、子宫内装置、起搏器或插管。

4. 如权利要求2所述的可植入医疗装置,其中,

(i)所述线路是导液管,

(ii)所述假体是心脏瓣膜或人工关节,并且

(iii)所述软组织植入物是胸部、臀部和唇部植入物。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的聚合度为2~75。

6. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的聚合度为2~35。

7. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的数均聚合度为2~75。

8. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的数均聚合度为2~35。

9. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的数均聚合度为2~30。

10. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物为3聚物~28聚物。

11. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物为4聚物~25聚物。

12. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物为6聚物~22聚物。

13. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物为8聚物~20聚物。

14. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物具有至少85%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基。

15. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物具有至少90%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基。

16. 如权利要求1~4中任一项所述的可植入医疗装置,其中,所述藻酸盐低聚物的结构中至少90%的古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基与另一古洛糖醛酸或古洛糖醛酸盐残基1-4连接。

包含藻酸盐低聚物的产品、包含无生命表面的产品和清创组合物

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的申请号为200880118093.0,申请日为2008年10月24日,发明名称为“藻酸盐低聚物在抗击生物膜中的用途”。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗击生物膜的方法。具体地,本发明涉及使用特定类别的藻酸盐、特别是某些藻酸盐低聚物来抗击生物膜,所述生物膜包括生物表面和非生物表面上的生物膜。因此,本发明提供了抗击生物膜感染或防止无生命表面上的生物膜形成的医学和非医学用途和方法,例如用于消毒和清洁目的。本发明基于以下令人惊奇的发现:某些藻酸盐低聚物能够与生物膜相互作用并且干扰生物膜。

背景技术

[0003] 通常,术语生物膜是由细胞外聚合物(在本领域也称为糖萼(glycocalyx))的基质包围的微生物的集合或群落。这些细胞外聚合物通常为多糖,特别是由生物体自身产生的多糖,但是它们也能够包含其它生物聚合物。生物膜通常附着在可能是惰性或活的表面,并且还已经观察到生物膜可以由相互附着的微生物形成或者在任何界面形成。因此,通常将生物膜表征为高度有组织的微生物的多细胞群落,所述微生物被包裹在细胞外聚合物基质、通常为多糖基质中,或被其包围,并且通常与表面或界面紧密联系。此类生长模式对微生物而言是保护性的,并且使其难以除去或根除(例如,如下文所进一步讨论,对抗微生物剂或宿主防御或清除机制的顽抗性或抗性)。根据本发明,认为藻酸盐低聚物可以与生物膜的聚合物基质相互作用,从而削弱生物膜。如下文所进一步讨论,在感染、污染、污损和腐败方面,生物膜引起显著的商业、工业和医学问题,因此本发明在使得能够或促进抗击此类生物膜上提供显著的优点,所述对生物膜的抗击既包括减少或避免生物膜的形成,也包括使其更易被除去或减少,例如,更易于受到抗微生物剂(包括消毒剂或抗生素)的影响,或在感染的情况下的确更易于受到受感染宿主的免疫响应的影响。因而可以增强治疗和非治疗性的抗微生物剂、特别包括抗生素的功效。

[0004] 如果存在有益于微生物建群的条件,发现生物膜普遍地存在于各种表面或界面上(例如水/固体和水/气体(例如水/空气)界面)。基本上,生物膜将形成于任何存在微生物和界面或表面的地方,特别是暴露于水或湿气的表面,并且现在认为生物膜是在此类表面或界面上微生物生长的自然状态。如上所述,基本而言,生物膜为微生物集落在表面上或在界面处的复杂且有组织的排列,这在水或湿气存在时特别可能发生。这些集落的组织化是由微生物产生其中“包埋”有细胞的有组织的细胞外基质的能力造成的。该基质由微生物生成的生物聚合物形成,而多糖通常在所述生物聚合物中占优势。

[0005] 生物膜群落中的微生物显示出细胞水平的性质(表型),该性质不与其浮游生物(自由漂浮)等效物共有。事实上,认为在生物膜中的微生物与浮游生物的自由漂浮细胞极其不同。在群落水平上还观察到进一步差异,并且将其归因于细胞外基质的作用。也许最值

得注意的是通常观察到的以下现象：在生物膜环境中的微生物对于抗微生物剂(例如抗生素、抗真菌剂和杀菌剂)和宿主免疫防御或清除机制显示出不同的易感性。据信该抗性由细胞外基质的屏障效应和/或微生物自身的表型改变导致。例如，一旦生物膜形成，抗体不再附着至生物膜内的微生物(例如细菌)。实验已显示，抗体在生物膜的外部而不是在生物膜自身内厚厚地结壳。对于抵抗生物膜的白细胞活性的研究已经说明了类似的发现。在浮游微生物与其驻留于生物膜集落中的等效物之间的毒素产生也可能不同，这表明了微生物中的表型改变。此外，还认为在生物膜中的微生物可以较缓慢地生长，结果吸收抗微生物剂更缓慢。

[0006] 生物膜易于在水生环境表面上形成，并且在暴露于水的任何表面(任何“湿”表面)上已建立的微生物集落几乎肯定作为生物膜结构存在。此外，生物膜还可以在微生物感染的情况下(即在受感染宿主内或其上)形成，现在这正变得明显且越来越多地被记载。因而，生物膜的形成还可以在“生理学”或“生物”表面(其为有生命的表面或生物表面)上发生，或在受感染宿主生物体(例如人类或非人类动物受试对象)上或其内的表面上，例如在体内或体外的表面或组织表面上。目前正逐渐认为，在身体组织上的此类生物膜形成(或感染)促成各种感染性疾病，包括例如自体瓣膜心内膜炎(二尖瓣、主动脉、三尖瓣、肺动脉瓣膜)、急性中耳炎(中耳)、慢性细菌性前列腺炎(前列腺)、囊性纤维化(肺)、肺炎(呼吸道)、牙周炎(支撑牙齿的组织，例如齿龈、牙周韧带、齿槽骨(alveolar bone))。当然，当植入医疗装置时这些生物膜生态位(niches)都存在，并且在此类植入(“留置”)装置上生物膜的形成能够导致在此类位置处的感染的临床问题(例如，人工瓣膜心内膜炎和装置相关的感染(例如与子宫内装置、隐形眼镜、假体(例如人工关节)相关的感染))，以及在导管(例如中心静脉导管或尿管)插入位置的感染的临床问题。

[0007] 伴随此类生物膜感染的显著问题和风险在于，微生物(或具体而言为微集落)可能从该生物膜断裂或脱离并进入其它组织，显著地包括循环。此类循环的源自生物膜的微生物能够引起进一步的感染，并导致严重的临床问题，特别是当脱离的循环微生物可能具有亲本群落的所有抗性特征时。

[0008] 生物膜感染通常逐步发展，并可以缓慢地产生显性症状。然而，一旦建立，如上所述，生物膜难以清除，并且生物膜感染通常为持续性的，而即使在具有健康的天然免疫响应和适应性免疫响应的个体中也很少被宿主防御或免疫机制解决。事实上激活的宿主响应可能是有害的，例如，细胞介导的免疫(例如侵入性嗜中性粒细胞)可能引起邻近的健康宿主组织的附带损害。生物膜感染仅短暂响应于抗生素治疗。因而，当浮游微生物细胞可以被抗体或吞噬细胞清除并且对抗微生物剂易感时，在生物膜中的微生物趋于对抗体、吞噬细胞和抗微生物剂有抗性。吞噬细胞被吸引至生物膜，但是吞噬作用受阻。然而，吞噬性酶仍得到释放并且可能破坏生物膜周围的组织。浮游细菌可以由生物膜释放并且此类释放可能引起在邻近组织中的传播和急性感染。

[0009] 死亡或损伤(例如坏死或发炎)的身体或组织表面特别容易受到生物膜感染。伤口易受感染，并且生物膜形成能够发生在短时间内未愈合的伤口中。伤口是理想的生物膜形成环境，这是由于其对细菌建群的易感性且对于生物膜附着而言可以获得基质和表面。问题在于，伤口的感染通常进一步使愈合延迟，并因而使该伤口更易遭受生物膜形成和受到已建立的感染。其中延迟愈合的伤口(所谓的慢性伤口)代表就生物膜形成而言的特别受关

注的位置。慢性伤口处于炎症状态,具有升高水平的促炎症细胞因子。这些细胞因子的作用在于产生免疫细胞(嗜中性粒细胞和巨噬细胞)的区域云集。如果以任何方式延迟该防御系统(如在慢性伤口中),细菌或其它微生物有时间附着至该表面并进入生物膜生长模式。逐渐增加的证据表明,慢性和急性伤口可能是生物膜感染的位置,证据在于伤口、特别是慢性伤口中的各种微生物群落或群体,包括在慢性伤口内的厌氧细菌。慢性伤口感染与其它生物膜感染共有两个重要属性:即使在具有健康的天然免疫响应和适应性免疫反应的个体中也不会被宿主免疫系统清除的持续感染,和对全身和局部抗微生物剂的增加的抗性。因此,基于生物膜的感染非常难以处理,而生物膜污染非常难以根除。频繁的清创术是帮助愈合慢性伤口的临床上最有效的治疗之一。这是部分有效的治疗,因为其从伤口物理除去生物膜。原则上,这与解决来自生物膜建群的留置医疗装置(例如导液管)中的感染类似,在所述医疗装置中抗生素治疗是无效的,而最有效的方法是除去或替换被生物膜感染的装置。

[0010] 慢性伤口在全世界是主要的健康问题,并代表临床资源上的显著消耗。三种主要的慢性伤口类型为糖尿病足溃疡、下肢静脉性溃疡和压力性溃疡,但包括外科伤口的其它伤口也可能变为慢性。此类伤口的护理造成了巨大的材料和患者成本,因此有效的抗生物膜治疗、或事实上任何有助于或促进生物膜治疗并因此加速或促进伤口愈合的治疗将具有非常显著的影响。

[0011] 更一般性而言,考虑到生物膜的广泛出现和它们引起的医学、环境、工业或其它商业问题,改善对生物膜的抗击或能够抗击生物膜的任何手段在临床和商业上都非常重要。

[0012] 因此,存在着对在临床和工业或商业情况下抗击生物膜的新方法的需要,本发明旨在解决该需要。

[0013] 具体地,且如上所述,已经发现特定类型的藻酸盐、即某些藻酸盐低聚物,作为抗生物膜剂是有效的。该藻酸盐低聚物可以与生物膜的细胞外聚合物相互作用并由此将其削弱,使得能够或促进将其除去或分解(或破坏),和/或促进抗微生物剂对生物膜的侵袭,由此增强其抗生物膜功效。因此,本发明提出了用于抗击生物膜的涉及使用藻酸盐低聚物的新方法或手段。

[0014] 藻酸盐为(1-4)连接的 β -D-甘露糖醛酸(M)和/或其C-5差向异构体 α -L-古洛糖醛酸(G)的线性聚合物。藻酸盐的一级结构可以极大地变化。M和G可以组织为邻接的M或G残基的均聚嵌段、组织为交替的M和G残基的嵌段,并且可以发现单个M或G残基隔开这些嵌段结构。藻酸盐分子能够包含一些或所有的这些结构,并且此类结构在整个聚合物中可能不均匀地分布。在极限情况下,存在古洛糖醛酸(聚古洛糖醛酸盐)的均聚物或甘露糖醛酸(聚甘露糖醛酸盐)的均聚物。

[0015] 藻酸盐已经从海洋褐藻(例如南极冰河海藻(*Durvillea*)、巨藻属(*Lessonia*)和海带属(*Laminaria*)的某些物种)和例如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)等细菌中分离。其它的假单胞菌(例如,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*))保留产生藻酸盐的遗传能力,但是在自然环境下它们不产生可检测水平的藻酸盐。通过突变,能够诱导这些非生产性假单胞菌稳定地产生大量的藻酸盐。

[0016] 藻酸盐可以作为聚甘露糖醛酸盐合成,并且在聚合物中G残基通过差向异构酶(特别是C-5差向异构酶)在M残基上的作用而形成。在提取自藻类的藻酸盐的情形中,G残基主

要被组织为G嵌段,因为在藻类中涉及藻酸盐生物合成的酶优选将G残基引入来与另一个G邻接,从而将M残基的延伸链转化成G嵌段。对这些生物合成系统的明晰使得能够生产具有特定一级结构的藻酸盐(WO 94/09124,Gimmestad,M等,Journal of Bacteriology,2003,Vo1 185(12)3515-3523和WO 2004/011628)。

[0017] 藻酸盐通常作为高分子量聚合物(例如,平均分子量为300,000道尔顿~500,000道尔顿)从天然来源分离。然而,已知可以例如通过化学或酶促水解将此类大的藻酸盐聚合物降解或分解,从而产生较低分子量的藻酸盐结构。工业上使用的藻酸盐的平均分子量通常为100,000道尔顿~300,000道尔顿(即,此类藻酸盐仍被认为是大的聚合物),尽管在药物中已经使用平均分子量约为35,000道尔顿的藻酸盐。

[0018] 现在已经发现藻酸盐低聚物具有干扰生物膜的细胞外基质的能力。不希望受到任何特定的理论束缚,据信这种干扰引起生物膜的细胞外基质分解,由此导致生物膜的物理破坏。所述分解还增加生物膜内的微生物(或其免疫原性成分,例如LPS和肽聚糖结构)对于受感染宿主的免疫防御和/或已经或将要应用的任何抗微生物剂的暴露。所述分解还降低了细胞外基质和微生物之间的关系的亲密性,并且这导致了在表型水平上微生物对抗微生物剂的敏感性的增加。

发明内容

[0019] 因此,本发明提供了用于抗击生物膜的方法,所述方法包括使所述生物膜与藻酸盐低聚物接触。

[0020] 如上所述,藻酸盐通常作为平均分子量至少为35,000道尔顿(即约175~190个单体残基)但通常更高的聚合物出现,而本发明的藻酸盐低聚物可以被定义为通过将藻酸盐聚合物、通常是天然存在的藻酸盐片段化(fractionation)(即尺寸降低)获得的材料。可以认为,藻酸盐低聚物是平均分子量低于35,000道尔顿(即低于约190个单体残基或低于175个单体残基)的藻酸盐,特别是平均分子量低于30,000道尔顿(即低于约175个单体残基或低于150个单体残基),更特别是平均分子量低于25,000道尔顿或20,000道尔顿(即低于约135个单体残基或125个单体残基或者低于约110个单体残基或100个单体残基)的藻酸盐。

[0021] 作为另一种选择而言,低聚物通常包括2个以上单元或残基,根据本发明使用的藻酸盐低聚物通常包含2~100个、优选2~75个、优选2~50个、更优选2~40个、2~35个或2~30个单体残基,即根据本发明使用的藻酸盐低聚物的平均分子量通常为350道尔顿~20,000道尔顿、优选为350道尔顿~15,000道尔顿、优选为350道尔顿~10,000道尔顿、更优选为350道尔顿~8000道尔顿、350道尔顿~7000道尔顿或350道尔顿~6,000道尔顿。

[0022] 作为另一种选择而言,藻酸盐低聚物可以具有2~100、优选2~75、优选2~50、更优选2~40、2~35或2~30的聚合度(DP)或数均聚合度(DP_n)。

[0023] 如上所述,生物膜通常形成于表面或界面上,并且根据本发明处理的生物膜可以处于任何表面或界面上。因此,在本发明的方法中生物膜可以处于任何有生命或无生命(或生物或非生物)表面上,即任何活的表面、或者源自活材料(例如,死亡或损伤组织如坏死组织)的表面(本文使用术语“有生命的”以包括任何活的表面或源自活材料的任何表面、特别是已经死亡的活表面)、或者任何惰性或非活性表面(之前未曾存活或有生命的表面)。

[0024] 术语“接触”包括将藻酸盐低聚物输送至生物膜的任何直接或间接的手段,以及因

此将藻酸盐低聚物应用至生物膜或将生物膜暴露于藻酸盐低聚物的任何手段,例如,将藻酸盐低聚物直接应用于生物膜、或将藻酸盐低聚物施用于患有生物膜感染的受试对象。因此可以理解,其包括体外和体内两种方法。

[0025] 更具体地,使生物膜与有效量的藻酸盐低聚物、更具体而言可有效抗击生物膜的量的藻酸盐低聚物接触。

[0026] 如上所述,藻酸盐低聚物包含(或包括)古洛糖醛酸盐或古洛糖醛酸(G)和/或甘露糖醛酸盐或甘露糖醛酸(M)残基或单元。本发明的藻酸盐低聚物将优选仅由糖醛酸盐/糖醛酸残基组成或基本上仅由糖醛酸盐/糖醛酸残基组成(即基本上由其构成),更具体地仅由G和/或M残基组成或基本上仅由G和/或M残基组成。作为另一种选择而言,在本发明所用的藻酸盐低聚物中,至少80%、更具体地至少85%、90%、95%或99%的单体残基可以为糖醛酸盐/糖醛酸残基或更具体地为G和/或M残基。换言之,藻酸盐低聚物优选不包含其它残基或单元(即其它糖残基,或更具体而言其它糖醛酸/糖醛酸盐残基)。

[0027] 藻酸盐低聚物优选为线性低聚物。

[0028] 更具体而言,在优选实施方式中,藻酸盐低聚物的至少30%的单体残基为G残基(即古洛糖醛酸盐或古洛糖醛酸)。换言之,藻酸盐低聚物将包含至少30%古洛糖醛酸盐(或古洛糖醛酸)残基。因此,具体实施方式包括具有(例如包含)30%~70%的G(古洛糖醛酸盐)残基或70%~100%的G(古洛糖醛酸盐)残基的藻酸盐低聚物。因此,本发明使用的代表性藻酸盐低聚物将包含至少70%G残基(即,藻酸盐低聚物的至少70%的单体残基将为G残基)。

[0029] 优选至少60%、更优选至少70%或75%、还更优选至少80%、85%、95%或99%的单体残基为古洛糖醛酸盐。在一个实施方式中,藻酸盐低聚物可以为低聚古洛糖醛酸盐(即,G的均聚物,或100%G)。

[0030] 在另一个优选实施方式中,本发明的上述藻酸盐具有其中大多数G残基处于所谓的G嵌段中的一级结构。优选至少50%、更优选至少70%或75%、最优选至少80%、85%、90%或95%的单独的G残基处于G嵌段中。G嵌段为至少2个G残基、优选至少3个邻接的G残基、更优选至少4或5个邻接的G残基、最优选至少7个邻接的G残基的邻接序列。

[0031] 特别地,至少90%的G残基与另一G残基1-4连接。更特别地,藻酸盐的至少95%、更优选至少98%且最优选至少99%的G残基与另一G残基1-4连接。

[0032] 用于本发明的藻酸盐低聚物优选为3聚物~至35聚物、更优选为3聚物~28聚物、特别是4聚物~25聚物、尤其是6聚物~22聚物、特别是8聚物~20聚物、尤其是10聚物~15聚物,例如,其分子量为350道尔顿~6400道尔顿或350道尔顿~6000道尔顿、优选为550道尔顿~5500道尔顿、优选为750道尔顿~5000道尔顿、尤其是750道尔顿~4500道尔顿。

[0033] 藻酸盐低聚物可以为单一化合物,或其可以为化合物的混合物,例如具有一定范围的聚合程度的混合物。如上所述,藻酸盐低聚物中的单体残基可以相同或不同,并且不需要所有都携带带电基团,但优选大多数(例如,至少60%、优选至少80%且更优选至少90%)携带带电基团。优选基本上大多数(例如,至少80%、更优选至少90%)的带电基团具有相同的极性。在藻酸盐低聚物中,羟基与带电基团的比例优选为至少2:1,更优选为至少3:1。

[0034] 本发明的藻酸盐低聚物可以具有3~28、4~25、6~22、8~20或10~15、或5~18或7~15或8~12、尤其是10的聚合度(DP)或数均聚合度(DP_n)。

[0035] 优选的分子量分布使得不超过5%摩尔的分子具有比相关 DP_n 上限高出2的DP。同样地,优选不超过5%摩尔的分子具有其数值比相关 DP_n 下限低2的DP。合适的藻酸盐低聚物描述于W02007/039754、W02007/039760和W02008/125828中,本文通过参考明确并入其全部公开内容。

[0036] 代表性的合适的藻酸盐低聚物的 DP_n 为5~30,古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.80,甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.20,至少95摩尔%的分子的DP不超过25。

[0037] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为7~15(优选为8~12),古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.85(优选至少为0.90),甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.15(优选不超过0.10),至少95摩尔%的分子的聚合度小于17(优选小于14)。

[0038] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为5~18(尤其是7~15),古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.80(优选为至少0.85,尤其是至少0.92),甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.20(优选不超过0.15,尤其不超过0.08),至少95摩尔%的分子的聚合度小于20(优选小于17)。

[0039] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为5~18,古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.92,甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.08,至少95摩尔%的分子的聚合度小于20。

[0040] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为5~18(优选为7~15,更优选为8~12,尤其约为10),古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.80(优选为至少0.85,更优选为至少0.90,尤其是至少0.92,最优选为至少0.95),甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.20(优选不超过0.15,更优选不超过0.10,尤其不超过0.08,最优选不超过0.05),至少95摩尔%的分子的聚合度小于20(优选小于17,更优选小于14)。

[0041] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为7~15(优选为8~12),古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.92(优选至少为0.95),甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.08(优选不超过0.05),至少95摩尔%的分子的聚合度小于17(优选小于14)。

[0042] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为5~18,古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.80,甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.20,至少95摩尔%的分子的聚合度小于20。

[0043] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为7~15,古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.85,甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.15,至少95摩尔%的分子的聚合度小于17。

[0044] 其它合适的藻酸盐低聚物的数均聚合度为7~15,古洛糖醛酸盐/半乳糖醛酸盐分数(F_G)至少为0.92,甘露糖醛酸盐分数(F_M)不超过0.08,至少95摩尔%的分子的聚合度小于17。

[0045] 藻酸盐低聚物通常携带电荷,因此藻酸盐低聚物的平衡离子可以为任何生理学上耐受的离子,特别是通常用于带电药物物质的那些离子,例如钠、钾、铵、氯、甲磺酸盐、葡甲胺等。还可以使用促进藻酸盐凝胶化的离子,例如第2族金属离子。

[0046] 尽管藻酸盐低聚物可以由合适数量的古洛糖醛酸盐和甘露糖醛酸盐残基的聚合产生的合成材料,用于本发明的藻酸盐低聚物可以从天然来源(例如上述那些天然来源)即天然藻酸盐源材料获得、生产或衍生。

[0047] 产生可用于本发明的藻酸盐低聚物的多糖至低聚糖的裂解可以使用传统的多糖裂解技术(例如酶促消化和酸水解)来进行。然后可以使用离子交换树脂通过色谱或通过分级沉淀、溶解或过滤从多糖分解产物分离低聚物。US 6,121,441和WO2008/125828(本文通过参考明确并入其全部内容)描述了适合制备用于本发明中的藻酸盐低聚物的方法。其它的信息和讨论可见于例如“Handbooks of Hydrocolloids”,Phillips和Williams编著,CRC,Boca Raton,Florida,USA,2000,本文通过参考明确并入该教科书的全部内容。

[0048] 藻酸盐低聚物还可以进行化学修饰,包括但不限于添加带电基团(例如羧基化或羧甲基化的聚糖)的修饰,和经修饰以改变柔性(例如通过高碘酸盐氧化)的藻酸盐低聚物。

[0049] 适用于本发明的藻酸盐低聚物(例如低聚古洛糖醛酸)可以方便地通过以下方式来生产:将来自但不限于北方海带(*Laminaria hyperbora*)和巨藻(*Lessonia nigrescens*)的藻酸进行酸水解,在中性pH溶解,添加无机酸降低pH至3.4以使藻酸盐低聚物(低聚古洛糖醛酸)沉淀,用弱酸洗涤,在中性pH重悬并冻干。

[0050] 用于生产本发明的藻酸盐低聚物的藻酸盐还可以从合适的细菌源(例如铜绿假单胞菌和棕色固氮菌)直接获得,然而考虑到事实上在这些生物体中产生的藻酸盐趋于具有其中大多数G残基以G嵌段而不是作为单独残基排列的一级结构,故预期藻类来源是最合适的。

[0051] 参与荧光假单胞菌和棕色固氮菌中藻酸盐生物合成的分子设备已经得到克隆和表征(WO 94/09124;Ertesvag,H.等,Metabolic Engineering,1999,第1卷,262-269;WO 2004/011628;Gimmestad,M.等,(见上);Remminghorst和Rehm,Biotechnology Letters,2006,第28卷,1701-1712;Gimmestad,M.等,Journal of Bacteriology,2006,第188(15)卷,5551-5560),并且通过操纵这些系统可以容易地获得具有定制的一级结构的藻酸盐。

[0052] 藻酸盐(例如藻酸盐源材料)的G含量能够通过差向异构化例如使用来自棕色固氮菌的甘露糖醛酸(mannuran)C-5差向异构酶或其它差向异构酶来增加。如此,可以使用来自假单胞菌或固氮菌(*Azotobacter*)的分离的差向异构酶(例如,来自荧光假单胞菌或棕色固氮菌的AlgG,或来自棕色固氮菌的AlgE酶(AlgE1~AlgE7))来进行例如体外试验。此外,特别考虑了来自具有产生藻酸盐的能力的其它生物体、特别是藻类的差向异构酶的使用。使用棕色固氮菌AlgE差向异构酶的低G藻酸盐的体外差向异构化详细地描述于Ertesvag等(见上)和Strugala等(*Gums and Stabilisers for the Food Industry*,2004,12,The Royal Society of Chemistry,84-94)。优选采用除了AlgE4的其它一种或多种棕色固氮菌AlgE差向异构酶进行差向异构化,这是因为这些酶能够产生G嵌段结构。在使用时,还特别考虑了来自其它生物体的突变形式或同源物。WO94/09124描述了例如由差向异构酶序列编码的重组或修饰的甘露糖醛酸C-5差向异构酶(AlgE酶),在所述差向异构酶序列中编码差向异构酶的不同结构域或模块的DNA序列已经改组(shuffle)或重组。作为另一种选择,可以使用天然存在的差向异构酶(AlgG或AlgE)的突变体,这些突变体通过例如AlgG或AlgE基因的定点或随机诱变而获得。

[0053] 另一种方法是创建在其一些或全部差向异构酶基因中进行了突变的假单胞菌和固氮菌,从而这些突变体产生具有制备藻酸盐低聚物所需的结构的藻酸盐、甚至具有所需结构和尺寸(或分子量)的藻酸盐低聚物。具有突变的AlgG基因的许多荧光假单胞菌生物体的产生详细地描述于WO 2004/011628和Gimmestad,M.等,2003(见上)。具有突变的AlgE基

因的许多棕色固氮菌生物体的产生公开于Gimmestad, M. 等, 2006(见上)。无需过度的负担, 本领域技术人员即能使用该教导来制备可生成本发明的藻酸盐低聚物的新突变体。

[0054] 另一种方法是使来自固氮菌和假单胞菌生物体的内源性差向异构酶基因缺失或失活, 然后引入一种或多种外源性差向异构酶基因, 这些外源性差向异构酶基因可以为突变的或未突变的(即可以为野生型或经修饰的)并且其表达可以例如通过使用诱导型或其它“可控启动子”控制。通过选择基因的合适组合, 能够生产预定一级结构的藻酸盐。

[0055] 另一种方法是将假单胞菌和/或固氮菌的一些或所有藻酸盐生物合成机制引入不产生藻酸盐的生物体(例如大肠杆菌), 并且诱导藻酸盐从这些经遗传修饰的生物体产生。

[0056] 当使用这些基于培养的系统时, 藻酸盐或藻酸盐低聚物的一级结构能够受培养条件影响。本领域技术人员完全有能力调整例如温度、摩尔渗透压浓度(osmolarity)、养料水平/来源和气氛参数等培养参数以便控制由特定生物体产生的藻酸盐的一级结构。

[0057] “G残基/G”和“M残基/M”、古洛糖醛酸或甘露糖醛酸或者古洛糖醛酸盐或甘露糖醛酸盐, 可以与古洛糖醛酸/古洛糖醛酸盐以及甘露糖醛酸/甘露糖醛酸盐(具体而言是 α -L-古洛糖醛酸/古洛糖醛酸盐和 β -D-甘露糖醛酸/甘露糖醛酸盐)应当可相互替换地进行指代, 并且进一步包括其衍生物, 在所述衍生物中, 一个或多个可利用的侧链或基团已被修饰而未造成比未修饰聚合物显著更低的抗生物膜活性。常见的糖修饰基团包括乙酰基、硫酸根、氨基、脱氧基团、醇基、醛基、酯基和脱水基团。还可对藻酸盐低聚物进行化学修饰以添加带电基团(例如羧基化或羧甲基化的聚糖)和改变柔性(例如通过高碘酸盐氧化)。本领域技术人员将意识到, 可以对低聚糖的单糖亚基进行其它化学修饰, 并且这些化学修饰可以应用于本发明的藻酸盐。

[0058] “生物膜”是指特征在于固着细胞占主导的微生物的群落, 所述固着细胞附着于基底(substratum)或界面或者相互附着(还可以存在一些游动细胞)并且其包埋于细胞外聚合物(更具体为所述细胞已经产生的细胞外聚合物)的基质中, 其特征在于所述集落的微生物显示出与生长速率和基因转录有关的改变的表型(例如, 与其“非生物膜”或自由漂浮或浮游的对应物(counterpart)相比)。

[0059] 本文使用术语“抗击生物膜”来宽泛地包括破坏、减少或分解生物膜(即“攻击”已存在的生物膜)的任何效应, 或使其更易受到抗微生物剂或宿主免疫响应的影响的效应, 以及抑制、减少、延迟或预防生物膜的形成形成的效应。因此“抗击”包括对生物膜具有负面效应的任何生物膜处理。

[0060] 因此, “抗击生物膜”包括预防性和反应性措施或处理。因此抗击生物膜包括生物膜形成的预防、生物膜的消除、生物膜尺寸的减小、生物膜集落中微生物的数量的减少、生物膜的生长速率的降低或停止、生物膜集落中微生物数量的扩增速率的降低或停止、生物膜的物理完整性的降低、生物膜集落中的微生物对抗微生物剂或宿主免疫防御机制的敏感性的增加、以及生物膜对抗微生物剂或宿主免疫防御机制的渗透性的增加。

[0061] 因此, 本发明的方法可以在临床上使用, 例如用于生物膜感染的治疗, 或其可以用于清洁或净化任何表面, 例如商业或工业表面。

[0062] 生物膜中的微生物的尺寸、结构、完整性和数量能够通过任何方便的方法分析。例如, 扫描和透射电子显微镜常用于评价生物膜的尺寸、完整性和结构。微生物和/或细胞外基质成分的组织化学染色也是常规手段(例如用于来自假单胞菌生物膜的基质成分的

BODIPY™630/650-X SE染料和用于假单胞菌细胞膜的FM™1-43染料),并且可用于目视地或借助细胞分类装置、共焦显微镜或表面荧光显微镜来评价微生物数量和生物膜结构和完整性。MBEC测试(Moskowitz SM等,(2004)J Clin Microbiol,42:1915-1922,详细描述于实施例中)可用于评价生物膜中的微生物对抗微生物剂的敏感性。Donlan和Costerton,2002,Clin.Mic.Rev.,第15(2)卷,167-193提供了其它实例。

[0063] 就生物膜中的微生物而言,根据本发明可以抗击的生物膜不受限制,因为本发明的藻酸盐低聚物特别靶向细胞外基质。因此,生物膜可以包含任何纲、属或种的微生物,即可以形成生物膜的任何微生物。此类微生物通常包括细菌,包括任何属或种的细菌。因此,细菌可以为革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌,或不响应于革兰氏测试的细菌。细菌可以为需氧细菌或厌氧细菌。细菌可以为病原性细菌或非病原性细菌,或腐败菌或指示菌。细菌的属或种的实例包括但不限于,营养缺陷菌属(Abiotrophia)、无色杆菌属(Achromobacter)、氨基酸球菌属(Acidaminococcus)、食酸菌属(Acidovorax)、不动杆菌属(Acinetobacter)、放线杆菌属(Actinobacillus)、放线棒菌属(Actinobaculum)、马杜拉放线菌属(Actinomadura)、放线菌属(Actinomyces)、气球菌属(Aerococcus)、气单胞菌属(Aeromonas)、阿菲波菌属(Afipia)、土壤杆菌属(Agrobacterium)、产碱菌属(Alcaligenes)、差异球菌属(Alloiococcus)、交替单胞菌属(Alteromonas)、无枝酸菌属(Amycolata)、拟无枝酸菌属(Amycolatopsis)、厌氧螺菌(Anaerobospirillum)、棍状厌氧菌属(Anaerorhabdus)、蛛菌属(Arachnia)、隐秘杆菌属(Arcanobacterium)、弓形菌属(Arcobacter)、节杆菌属(Arthrobacter)、阿托波氏菌属(Atopobium)、金杆菌属(Aureobacterium)、拟杆菌属(Bacteroides)、巴氏丝菌属(Balneatrix)、巴尔通氏体属(Bartonella)、伯杰氏菌属(Bergeyella)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、嗜胆菌属(Bilophila)、布兰汉氏球菌属(Branhamella)、疏螺旋体属(Borrelia)、博德特氏菌属(Bordetella)、短螺旋体属(Brachyspira)、短芽孢杆菌属(Brevibacillus)、短杆菌属(Brevibacterium)、短波单胞菌属(Brevundimonas)、布鲁氏菌属(Brucella)、伯克霍尔德氏菌属(Burkholderia)、布丘氏菌属(Buttiauxella)、丁酸弧菌属(Butyrivibrio)、鞘杆菌属(Calymmatobacterium)、弯曲杆菌属(Campylobacter)、二氧化碳嗜纤维菌属(Capnocytophaga)、心杆菌属(Cardio bacterium)、卡托氏菌属(Catonella)、西地西菌属(Cedecea)、纤维单胞菌属(Cellulomonas)、蜈蚣菌属(Centipeda)、衣原体属(Chlamydia)、嗜衣原体属(Chlamydophila)、色杆菌属(Chromobacterium)、金黄杆菌属(Chyseeobacterium)、金色单胞菌属(Chryseomonas)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、梭菌属(Clostridium)、(Collinsella)、丛毛单胞菌属(Comamonas)、棒杆菌属(Corynebacterium)、考克斯氏体属(Coxiella)、短小杆菌属(Cryptobacterium)、代夫特菌属(Delftia)、皮杆菌属(Dermabacter)、嗜皮菌属(Dermatophilus)、脱硫单胞菌属(Desulfomonas)、脱硫弧菌属(Desulfovibrio)、戴阿利斯特杆菌属(Dialister)、偶蹄形菌属(Dichelobacter)、狡诈球菌属(Dolosicoccus)、狡诈菌属(Dolosigranulum)、爱德华氏菌属(Edwardsiella)、埃格特菌属(Eggerthella)、埃里希氏体属(Ehrlichia)、艾肯氏菌属(Eikenella)、稳杆菌属(Empedobacter)、肠杆菌属(Enterobacter)、肠球菌属(Enterococcus)、欧文氏菌属(Erwinia)、丹毒丝菌属(Erysipelothrix)、埃希氏菌属(Escherichia)、真杆菌属(Eubacterium)、爱文氏菌属(Ewingella)、微小杆菌属

(*Exiguobacterium*)、费克蓝姆菌(*Facklamia*)、产线菌属(*Filifactor*)、黄色单胞菌属(*Flavimonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、弗朗西丝氏菌属(*Francisella*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、加德纳氏菌属(*Gardnerella*)、球链菌属(*Globicatella*)、孪生球菌属(*Gemella*)、戈登氏菌属(*Gordona*)、嗜血菌属(*Haemophilus*)、哈夫尼菌属(*Hafnia*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、盐球菌属(*Helococcus*)、霍尔德曼氏菌属(*Holdemania*)、不活动粒菌属(*Ignavigranum*)、约翰森氏菌属(*Johnsonella*)、金氏菌属(*Kingella*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、考克斯菌属(*Kocuria*)、科泽氏菌属(*Koserella*)、库特氏菌属(*Kurthia*)、盖球菌属(*Kytococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、劳特洛普氏菌属(*Lautropia*)、勒克氏菌属(*Leclercia*)、军团菌属(*Legionella*)、勒米诺氏菌属(*Leminorella*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)、利斯顿氏菌属(*Listonella*)、巨球形菌属(*Megasphaera*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、光岗菌属(*Mitsuokella*)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*)、米勒氏菌属(*Moellerella*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体属(*Mycoplasma*)、香味菌属(*Myroides*)、奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、厄氏菌属(*Oeskovia*)、寡源杆菌属(*Oligella*)、东方体属(*Orientia*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、副衣原体属(*Parachlamydia*)、巴斯德氏菌属(*Pasteurella*)、片球菌属(*Pediococcus*)、消化球菌属(*Peptococcus*)、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、光杆状菌属(*Photorhabdus*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、卟啉单胞菌属(*Porphyrimonas*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、变形菌属(*Proteus*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、假支杆菌属(*Pseudoramibacter*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、拉恩氏菌属(*Rahnella*)、劳尔氏菌属(*Ralstonia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、立克次氏体属(*Rickettsia*)、罗卡利马氏体属(*Rochalimaea*)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*)、罗氏菌属(*Rothia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、月形单胞菌属(*Selenomonas*)、小蛇菌属(*Serpulina*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、芯卡体属(*Simkania*)、史雷克氏菌属(*Slackia*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、螺菌属(*Spirillum*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、口腔球菌属(*Stomatococcus*)、链杆菌属(*Streptobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、琥珀酸弧菌属(*Succinivibrio*)、萨特氏菌属(*Sutterella*)、萨顿氏菌属(*Suttonella*)、塔特姆氏菌属(*Tatumella*)、替策氏菌属(*Tissierella*)、特拉布斯氏菌属(*Trabulsiiella*)、密螺旋体属(*Treponema*)、创非锐属(*Tropheryma*)、束村氏菌属(*Tsakamurella*)、苏黎世菌属(*Turicella*)、尿枝原体属(*Ureaplasma*)、漫游球菌属(*Vagococcus*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)、弧菌属(*Vibrio*)、威克斯氏菌属(*Weeksella*)、沃林氏菌属(*Wolinella*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、致病杆菌属(*Xenorhabdus*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、和预研菌属(*Yokenella*)；革兰氏阳性细菌，例如，结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、鼠伤寒分枝杆菌

(*M. typhimurium*)、牛分枝杆菌BCG菌株、BCG亚菌株、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellular*)、非洲分枝杆菌(*M. africanum*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、海洋分枝杆菌(*M. marinum*)、溃疡分枝杆菌(*M. ulcerans*)、鸟分枝杆菌副结核分枝杆菌(*paratuberculosis*)亚种、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、马葡萄球菌(*Staphylococcus equi*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、伊氏利斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)、星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)、衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、疮疱丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)、和肠球菌属(*Enterococcus*)物种；以及革兰氏阴性细菌，例如，破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、大叶性肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、溶血巴斯德氏菌(*Pasteurella haemolytica*)、多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、鸚鵡热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、伯氏考克斯氏体(*Coxiella burnetii*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoea*)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、杜氏嗜血菌(*Haemophilus ducreyi*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、希拉肠球菌(*E. hirae*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、反刍类考德里氏体(*Cowdria ruminantium*)。

[0064] 这样，借助于代表性实例，生物膜可以包含属葡萄球菌属、假单胞菌属、军团菌属、分枝杆菌属、变形菌属、克雷伯氏菌属、梭杆菌属的细菌或其它肠道细菌或大肠细菌。

[0065] 生物膜还可以包含真菌，包括例如来自念珠菌属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)、肺孢子虫属(*Pneumocystis*)、青霉属(*Penicillium*)和镰刀菌属(*Fusarium*)的真菌。代表性的真菌物种包括但不限于白色念珠菌(*Candida albicans*)、都柏林念珠菌(*Candida dubliniensis*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、卡氏肺孢菌(*Pneumocystis carinii*)、马尔尼菲青霉菌(*Penicillium marneffi*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)。

[0066] 在生物膜中还可以包含藻类，代表性的藻类物种包括胶毛藻属(*Chaetophora*)、异养小球藻(*Chlorella protothecoides*)、鞘毛藻(*Coleochaete scutata*)、散生鞘毛藻(*Coleochaete soluta*)、单核红藻(*Cyanidioschyzon merolae*)、隐毛藻属(*Aphanochaete*)、胶带藻属(*Gloeotaenium*)、鞘藻属(*Oedogonium*)、卵囊藻属(*Oocystis*)、颤藻属(*Oscillatoria*)、帕亚都夏玛尔提属(*Paradoxia multisititia*)、席藻属

(Phormidium)、色球藻属(*Chroococcus*)、隐杆藻属(*Aphanothece*)、脆杆藻属(*Fragillaria*)、卵形藻属(*Cocconis*)、舟形藻属(*Navicula*)、桥弯藻属(*Cymbella*)、褐指藻属(*Phaeodactylum*)以及蓝藻目(*cyanobacteria*) (蓝绿藻)和硅藻属(*diatoms*) (例如,谷皮菱形藻(*Nitzschia palea*))。

[0067] 生物膜还能够包含其它生物体例如寄生物,例如,原生动物,如刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)等弓形虫属(*Toxoplasma*)物种、如镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)等疟原虫属(*Plasmodium*)物种、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、如硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)等利什曼原虫属(*Leishmania*)物种、如曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)等血吸虫属(*Schistosoma*)和溶组织内阿米巴虫(*Entamoeba histolytica*)。

[0068] 生物膜常常包含微生物的混合集落,因此本发明的藻酸盐低聚物所抗击的生物膜可以包含任何数量的上述物种。优选至少2种,更优选至少5种,最优选至少10种。

[0069] 生物膜集落优选包含来自以下属的至少一种的微生物:柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、哈夫尼菌属、沙雷氏菌属、耶尔森氏菌属、消化链球菌属、拟杆菌属、假单胞菌属、军团菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、链球菌属、克雷伯氏菌属、念珠菌属、变形菌属、伯克霍尔德氏菌属、梭杆菌属和分枝杆菌属,例如,金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、嗜肺军团菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德氏菌和酿脓链球菌。

[0070] 如上所述,生物膜可以存在于表面上。该表面不受限制,并且包括其上可以出现微生物的任何表面,特别是如上所述的暴露于水或湿气的表面。该表面可以是生物的或非生物的,并且无生命的(或非生物的)表面包括可能暴露于微生物接触或污染的任何表面。因此,所述表面特别包括机械、特别是工业机械上的表面,或暴露于水生环境(例如海事设备、或者船、艇或其零件或组件)的任何表面,或暴露于所述环境的任何部分的任何表面,例如管道或建筑物上。暴露于微生物接触或污染的所述无生命表面具体地包括以下的任何部分:食品或饮品加工、制备、贮存或配送机械或设备、空调设备、工业机械(例如,化学或生物技术加工厂中的工业机械)、储存罐和医学或外科手术设备。任何可能暴露于水或湿气的用于运载、运输或输送材料的装置或设备易受生物膜形成的影响。此类表面特别包括管道(本文该术语用于广义地包括任何导管或线路(*line*))。代表性的无生命或非生物表面包括但不限于食品加工、贮存、配送或制备设备或表面、罐、输送机、地板、排液装置、冷却器、冷冻器、设备表面、墙、阀、带、管道、空调导管、冷却装置、食品或饮品配送线、热交换器、艇壳或暴露于水的艇结构的任何部分、牙科水线(*dental waterlines*)、石油钻探导管、隐形眼镜和贮存箱。如上所述,医学或外科手术设备或装置代表特定的一类其上可以形成生物膜的表面。这类表面可以包括:任何种类的线路,包括导管(例如中心静脉导管和导尿管);假体装置,例如心脏瓣膜、人工关节、假牙、齿冠、齿帽(*dental caps*);和软组织植入物(例如胸部、臀部和唇部植入物)。任何种类的可植入(或“留置”)医疗装置(例如支架、子宫内装置、起搏器、插管、假体或假体装置、线路或导液管)都包括在内。“留置”医疗装置可包括其任何部分都被容纳于身体内的装置,即该装置全部或部分地留置。

[0071] 所述表面可由任何材料制造。例如其可以为金属,例如,铝、钢、不锈钢、铬、钛、铁及其合金等。所述表面还可以为塑料,例如,聚烯烃(例如聚乙烯、(超高分子量)聚乙烯、聚

丙烯、聚苯乙烯、聚(甲基)丙烯酸酯、丙烯腈、丁二烯、ABS、丙烯腈丁二烯等)、聚酯(例如聚对苯二甲酸乙二酯等)和聚酰胺(例如尼龙)及其组合等。其它实例包括缩醛共聚物、聚苯砜、聚砜、聚醚酰亚胺、聚碳酸酯、聚醚醚酮、聚偏二氟乙烯、聚(甲基丙烯酸甲酯)和聚(四氟乙烯)。所述表面还可以为砖、瓦、陶瓷、瓷器、木材、乙烯树脂、油毡或地毯及其组合等。所述表面还可以为食品,例如牛肉、家禽、猪肉、蔬菜、水果、鱼、贝类及其组合等。

[0072] 生物或有生命的表面可以包括在身体内或身体上的任何表面或界面。因此,如上所述其可以视为“生理性”或“生物性”表面。其可以为任何内部或外部身体表面,包括任何组织表面,所述组织可以包括血液组织或造血组织(例如,血液)。如上所讨论,死亡或垂死(例如坏死)组织或者受损(例如,发炎、断裂或破裂)组织特别易受生物膜生长的影响,并且此类组织被术语“有生命的”或“生物的”所涵盖。所述表面可以为粘膜或非粘膜表面。

[0073] 代表性的生物表面包括但不限于:在口腔中的任何表面(例如,牙齿、牙龈、龈缝、牙周袋)、生殖道(例如子宫颈、子宫、输卵管)、腹膜、中耳、前列腺、尿道、血管内膜、结膜、角膜组织、呼吸道、肺组织(例如支气管和肺泡)、心脏瓣膜、胃肠道、皮肤、头皮、指甲和伤口、特别是慢性伤口的内部(可以为局部或内部伤口)。

[0074] 在一方面所述表面不会是粘膜表面,或更具体地将不具有高粘性粘液包被(hyperviscous mucus coating)。本领域技术人员将能够确定给定表面处的粘液何时是高粘性的。在一个实施方式中,所述表面不是分泌粘液的组织的表面。更具体地,在此类实施方式中,所述表面不是由粘液包被的组织的表面。本领域技术人员将根据其公知常识识别分泌粘液的组织和由粘液包被的组织。

[0075] 因此可见,本发明提供了本文定义的藻酸盐低聚物用于治疗或预防受试对象中的生物膜感染(例如,由包括细菌、病毒、真菌或如原生动物的任何微生物引起的生物膜感染)的医学用途。所述感染可以为病原体感染。能够引起感染的微生物的代表性实例如上所述。应该注意的是由以下微生物引起的感染:柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、哈夫尼菌属、沙雷氏菌属、耶尔森氏菌属、消化链球菌属、拟杆菌属、假单胞菌属、军团菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、链球菌属、克雷伯氏菌属、念珠菌属、变形菌属、伯克霍尔德氏菌属、梭杆菌属和分枝杆菌属,例如,金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、嗜肺军团菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德氏菌和酿脓链球菌。由假单胞菌引起的感染,例如铜绿假单胞菌感染特别值得注意。

[0076] 本文广义地使用术语“在受试对象中”以包括在受试对象内部或在受试对象上(例如,外部身体表面上)出现的生物膜感染。生物膜感染可以为慢性的(即可以为慢性生物膜感染),例如持续至少5天或至少10天、尤其至少20天、更优选至少30天、最优选至少40天的感染。慢性感染通常表现为生物膜感染,但生物膜感染不必为此处限定的慢性感染。

[0077] 在本发明的该方面,生物膜感染可以出现在受试对象中或受试对象上的表面(即上文所讨论的生物表面)上和/或医疗装置、特别是可植入或“留置”医疗装置的表面上。

[0078] 因此,在该方面,本发明提供用于治疗或预防在受试对象中的生物膜感染的藻酸盐低聚物(其可以为如本文定义的任何藻酸盐低聚物)。

[0079] 作为另一种选择而言,本发明的这方面提供藻酸盐低聚物在制备用于治疗或预防受试对象中的生物膜感染的药物上的用途。

[0080] 本发明的该方面还提供用于治疗或预防受试对象中的生物膜感染的方法,所述方

法包括将药物有效量的藻酸盐低聚物施用至需要其的受试对象。

[0081] 本发明还提供藻酸盐低聚物在治疗或预防受试对象中的生物膜感染的用途。

[0082] 所述受试对象可以为任何人类或非人类动物受试对象,但更具体地可以为脊椎动物,例如哺乳动物受试对象、鸟类受试对象、鱼类或爬行类。优选人类受试对象,但是所述受试对象可以例如为任何家畜或家养动物,或者例如动物园中的动物。因此,代表性的动物包括狗、猫、兔、鼠、豚鼠、仓鼠、马、猪、绵羊、山羊、牛、鸟和鱼。因此本发明的兽医用途被涵盖在内。可以将所述受试对象视为患者。

[0083] 生物膜感染能够出现在任何受试对象中,但是某些受试对象对于感染比其它更易感。对生物膜易感的受试对象包括但不限于:其上皮和/或内皮屏障受到削弱或损害的受试对象,其针对微生物感染的基于分泌的防御已经被废除、破坏、削弱或逐渐损坏的受试对象,和免疫受损、免疫缺陷或免疫抑制的受试对象(即,其中免疫系统的任何部分没有正常地工作、或在亚常态工作的受试对象,换言之,无论由于疾病或临床干预或其它治疗或者任何方式所致,在所述受试对象中免疫响应的任何部分或免疫活性降低或受损)。

[0084] 对生物膜易感的受试对象的代表性实例包括但不限于:患有事先建立的感染(例如,细菌、病毒、真菌或如原生动物等寄生物引起的感染)的受试对象,特别是患有HIV的受试对象、患有脓毒症的受试对象和患有脓毒性休克的受试对象;患有免疫缺陷的受试对象,例如,准备进行或正在进行化学治疗和/或放射治疗或者正从化学治疗和/或放射治疗恢复的受试对象、器官(例如骨髓、肝、肺、心脏、心脏瓣膜、肾等)移植受试对象(包括自体移植、同种异体移植和异种移植患者)、患有AIDS的受试对象;在健康护理机构(例如医院)中驻留的受试对象,特别是在重症监护或危重监护中(即关注于为患者提供生命支持或器官支持系统的那些单位)的受试对象;遭受创伤的受试对象;具有灼伤的受试对象、具有急性和/或慢性伤口的受试对象;新生儿受试对象;老年受试对象;患有癌症(此处被广义地定义为包括任何恶性或非恶性的肿瘤性状况)的受试对象,特别是患有免疫系统癌症(例如白血病、淋巴瘤和其它血液学癌症)的那些受试对象;患有如类风湿性关节炎、I型糖尿病、克罗恩氏病等自身免疫疾病的受试对象,特别是经受针对这些疾病的免疫抑制治疗的那些受试对象;具有减少或废止的上皮或内皮分泌物(例如粘液、泪液、唾液)和/或分泌物清除的受试对象(例如,患有粘膜组织上的纤毛功能不良的受试对象,和/或具有高粘性粘液的患者(例如吸烟者和患有COPD、支气管炎、囊性纤维化、气肿、肺癌、哮喘、肺炎或鼻窦炎的受试对象));以及配备有医疗装置的受试对象。

[0085] 这样,根据本发明可以特别抗击生物膜感染的受试对象包括持续受到损伤(无论是由于灌注不良、反复性创伤、营养不良、给氧不足或白细胞障碍导致)的患者。

[0086] 特别值得注意的是已经经受物理创伤的受试对象。创伤自身可能引起受试对象上皮和/或内皮屏障的削弱或损害,或受试对象可能响应于创伤(休克响应)而变得免疫受损。术语“创伤”广义地指被外来物体的细胞攻击和/或细胞的物理损伤。外来物体包括微生物、颗粒物质和化学试剂等。物理损伤包括机械损伤;热损伤,例如由过热或过冷导致的损伤;电损伤,例如由与电势源接触导致的损伤;由例如在红外线、紫外线或电离辐射中长期、彻底的暴露引起的辐射损害。

[0087] 此外特别值得注意的是具有灼伤的受试对象。任何灼伤、特别是严重的灼伤,对受试对象的上皮和/或内皮屏障的完整性具有显著的影响,并且受试对象将通常响应于灼伤

(休克响应)而变得免疫受损。

[0088] 典型的引起灼伤的因素为极端温度(例如在极端温度的火和液体及气体)、电、腐蚀性化学品、摩擦和辐射。暴露的程度和持续时间以及因素的强度/力度导致不同严重性的灼伤。烫伤(即与高温液体和/或气体相关的创伤)被视为灼伤。

[0089] 表皮灼伤严重性通常以两种方式分类。最常见的是根据程度的分类。一级灼伤通常限于在整体损伤区域内的红斑(发红)和损伤位置处的白色斑块(white plaque)。这些灼伤的细胞创伤仅延伸至表皮深度。二级灼伤也显示出在整体损伤区域内的红斑,但具有表皮的浅表性起泡。二级灼伤的细胞损伤涉及浅表(乳头状)真皮,并且还可以涉及深的(网状)真皮层。三级灼伤为其中表皮丧失且皮下组织受损的那些灼伤。损伤通常是极端的,包括炭化。有时存在焦痂(干的黑色坏死组织)。三级灼伤可能需要进行移植。在四级灼伤中,发生皮下组织的灾难性损伤,例如皮下组织完全失去,伴随着损伤延伸至下面的肌肉、肌腱和韧带组织。观察到炭化和焦痂。如果证明灼伤并非致命的,则需要进行移植。

[0090] 另一常见的分类系统为通过厚度的分类。“浅层厚度”灼伤对应于一级灼伤。二级灼伤的范围由两类“部分厚度(partial thickness)”灼伤所覆盖。“部分厚度-浅层”为仅影响至乳头状真皮为止的表皮的灼伤。“部分厚度-深层”为影响至网状真皮为止的真皮的灼伤。“完全厚度”灼伤对应于三级和四级灼伤。

[0091] 一些物理损伤(例如一些灼伤)和被外来物体的细胞攻击导致伤口的形成。更具体地,可以认为伤口是组织中的裂口或组织的剥蚀(denudement)。伤口还可以由例如皮肤溃疡(例如,静脉性溃疡、糖尿病性溃疡或压力性溃疡)、肛裂或口腔溃疡等自发形成的病灶导致。

[0092] 伤口通常被定义为急性或慢性。急性伤口为依次经过愈合过程的三个公认阶段(即,炎性阶段、增殖阶段和重塑阶段)进行而时间过程未延长的伤口。然而,慢性伤口是由于伤口停滞在一个愈合阶段而没有完成愈合过程的生化事件的有序序列的那些伤口。通常,慢性伤口停滞在炎性阶段。根据本发明的一个特定方面,慢性伤口是在至少40天、尤其至少50天、更优选至少60天、最优选至少70天内尚未愈合的伤口。

[0093] 如上所述,伤口是包括生物膜感染的感染、特别是慢性生物膜感染的理想环境,这是因为它们缺乏上皮屏障,以及具有可用于建群和生物膜附着的基质和表面。问题在于,伤口的感染通常进一步延迟愈合,并因而使该伤口更易受生物膜形成和已建立的感染的影响。因此,本发明的藻酸盐可有效治疗和预防伤口的生物膜感染,并且慢性伤口的治疗代表了本发明的一个优选方面。

[0094] 因此,本发明的一个实施方式中提供了用于治疗或预防上述受试对象、特别是患有呼吸道疾病或病症(例如囊性纤维化)、伤口、灼伤和/或创伤的受试对象中的生物膜感染、特别是慢性生物膜感染的方法,所述方法包括对受试对象施用药物有效量的本文定义的藻酸盐低聚物。

[0095] 在一个特别重要的方面,藻酸盐低聚物可用于治疗或预防在伤口(例如灼伤)中的生物膜感染,例如用于治疗受感染的伤口(例如灼伤)。

[0096] 通过治疗和预防伤口的生物膜感染的能力,本文定义的藻酸盐低聚物可以除去伤口愈合的障碍之一,因此如上定义的藻酸盐低聚物也可有效促进急性和慢性伤口的愈合。

[0097] 促进愈合是指所述治疗加速了所述伤口的愈合过程(即伤口经过愈合过程的三个

公认阶段的进展)。愈合过程的加速可以表现为愈合阶段(即炎症阶段、增殖阶段和/或重塑阶段)中的一个、两个或全部的进展速率的增加。如果伤口为停滞在愈合阶段之一的慢性伤口,加速可以表现为停滞后线性、顺序愈合过程的重启。换言之,治疗将伤口从非愈合状态转变为其中伤口通过愈合阶段开始进展的状态。重启后的进展可以以正常速率或甚至与正常急性伤口愈合的速率相比稍慢的速率进行。

[0098] 藻酸盐低聚物可以用于治疗在身体中或身体上任何地方发生的生物膜感染。因此,在另一实施方式中,生物膜感染可以为医疗装置、特别是留置医疗装置的感染。

[0099] 如上所述,生物膜以例如牙菌斑的形式出现在牙齿上。根据本发明可将藻酸盐低聚物用作口腔保健剂,例如用于控制牙菌斑,如将其除去、使其减少、或者预防、降低或延迟其发展。它们还可以用于治疗 and 预防可能出现在口腔中的感染或感染性疾病,例如牙龈炎和牙周炎。

[0100] 虽然如上所述本发明通常涵盖肺和呼吸道以及身体所有区域的生物膜感染的治疗,但在一个实施方式中,本发明的医学用途不涉及(i)罹患COPD(慢性阻塞性肺病)的患者的呼吸道中、特别是鼻窦和肺中的生物膜的治疗,特别是囊性纤维化、慢性阻塞性肺病、气肿、支气管炎和鼻窦炎的治疗;(ii)在罹患胶耳的患者的中耳中的治疗;(iii)在患有生殖力受损的雌性患者的生殖道中的治疗;或(iv)在患有消化道功能障碍(例如便秘)的患者的消化道中的治疗。

[0101] 在本发明的具体实施方式中,藻酸盐低聚物可用于治疗自体瓣膜心内膜炎、急性中耳炎、慢性细菌性前列腺炎、肺炎、牙菌斑、牙周炎、呼吸道疾病(包括囊性纤维化和哮喘)中的生物膜感染以及与可植入或假体医疗装置相关的装置相关感染(例如,人工瓣膜心内膜炎,或者线路、导管、人工关节或组织替代物的感染)。

[0102] 藻酸盐的“药物有效”量是为所靶向的生物膜(如上定义)提供可量度的效果和/或对所靶向的病况提供可量度的效果的藻酸盐量。该量可以参考用于决定剂量的标准操作来确定,并且在其可利用的被设计来监测生物膜尺寸、结构、完整性和集落数量(例如上述那些)的例行测试和设计来监测所靶向的病况的测试的帮助下,本领域技术人员能够根据其经验来检测成功治疗的证据。

[0103] 藻酸盐的合适剂量根据受试对象的不同而有所变化,并且可以由医师和兽医从业者根据受试对象的体重、年龄、性别、病况的严重性、施用模式以及选择的具体藻酸盐低聚物而确定。通常将本发明的藻酸盐低聚物以至多10%、优选至多6%、更优选至多4%、最优选至多2%的局部浓度施用于生物膜。

[0104] 当与生物膜感染相关进行使用时(即与当与生物膜自身相关进行使用时相反,与受试对象中医学病况/感染的治疗相关),本文使用“治疗”来广义地包括任何治疗性效果,即对于病况或与生物膜感染相关的任何有益效果。因此治疗不仅包括感染的根除或消除或者受试对象或感染的治愈,还包括对受试对象的感染或病况的改善。因此,治疗包括例如感染的任何症状或体征的改善、或感染/病况的任何临床上接受的指标的改善(例如,在伤口尺寸的减小或愈合时间的加速)。因此,治疗包括对例如事先存在或已被诊断的感染/病况的治愈性和缓和性治疗,即反应性治疗。

[0105] 本文使用的“预防”是指任何预防性效果。因此,例如相对于预防性治疗之前的疾病或症状,预防包括对病况或病况的发病或者或其一种或多种症状的延迟、限制、减弱或预

防。因此,预防明确地包括绝对防止病况或其症状的出现或发展,以及对病况或症状的发作或发展上的任何延迟,或对疾病或症状的发展或进展的任何减弱或限制。

[0106] 具体地,本发明的藻酸盐可作为预防性治疗,例如用以预防生物膜感染(例如,病原体引起的生物膜感染)或至少使其风险最小化。本发明的该方面在护理住院患者上具有特定用途,因为能够使用本文定义的藻酸盐低聚物的预防性方案来使感染医院感染(常称为医院相关/获得性感染或健康护理相关感染)的风险最小化,所述医院感染例如金黄色葡萄球菌、二甲氧基苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)、铜绿假单胞菌、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、结核分枝杆菌和耐万古霉素肠球菌属。本发明的该方面还在遭受创伤的受试对象、具有灼伤的受试对象和具有伤口的受试对象的护理中具有特定用途,所有上述受试对象比未受到类似影响的受试对象对于病原体感染更易感。

[0107] 通常,需要本发明的治疗或预防的受试对象将被诊断为罹患目的疾病或有风险罹患目的疾病,或被鉴定为患有生物膜感染或有风险发生生物膜感染。

[0108] 具体地,本发明的藻酸盐低聚物可作为预防性治疗以预防发生生物膜感染的风险或至少使其最小化,所述生物膜感染包括例如伤口的感染、自体瓣膜心内膜炎、急性中耳炎、慢性细菌性前列腺炎、牙周炎、呼吸道和肺的感染(例如,囊性纤维化或其它呼吸道疾病)、牙菌斑、肺炎、或医学(例如留置)医疗装置的感染。

[0109] 在本发明的一个有利实施方式中,藻酸盐低聚物可与抗微生物剂联合或组合使用。在医学应用背景下,此类试剂可以是任何临床上有用的抗微生物剂,特别是抗生素。在非临床应用背景下,抗微生物剂也可以为用于该目的的任何抗微生物剂,例如任何消毒剂、防腐剂、清洁剂或杀菌剂。所述试剂可以分别使用,或在相同组合中同时地、依次地或分别地(例如以任何所需的时间间隔)使用。

[0110] 因此借助于代表性实例,抗微生物剂可以在藻酸盐低聚物之后使用,但是在某些情况下可能有益的是在其之前或同时使用。

[0111] 可以使用靶向处于靶标生物膜中的至少一种微生物的任何抗微生物剂。当然抗微生物剂的选择对于经受处理的表面而言必须合适,但是可以使用例如抗微生物剂(如抗生素、抗真菌剂、防腐剂)和/或如辐射(比如UV、X-射线、 γ)、极端温度和极端pH等灭菌条件。

[0112] 代表性的抗生素包括但不限于:氨基糖苷类(例如,阿米卡星(amikacin)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、新霉素(neomycin)、奈替米星(netilmicin)、链霉素(streptomycin)、妥布霉素(tobramycin));碳头孢烯类(carbacephems)(例如,氯碳头孢(loracarbef));1代头孢菌素类(例如,头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢唑林(cefazolin)、头孢氨苄(cephalexin));2代头孢菌素类(例如,头孢克罗(cefaclor)、头孢孟多(cefamandole)、头孢氨苄(cephalexin)、头孢西丁(cefroxitin)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢呋辛(cefuroxime));3代头孢菌素类(例如,头孢克肟(cefixime)、头孢地尼(cefdinir)、头孢托仑(cefditoren)、头孢哌酮(cefoperazone)、头孢噻肟(cefotaxime)、头孢泊肟(cefepodoxime)、头孢他啶(ceftazidime)、头孢布坦(ceftibuten)、头孢唑肟(ceftizoxime)、头孢曲松(ceftriaxone));4代头孢菌素(例如,头孢吡肟(cefepime));大环内酯类(例如,阿奇霉素(azithromycin)、克拉霉素(clarithromycin)、地红霉素(dirithromycin)、红霉素(erythromycin)、醋竹桃霉素(troleandomycin));单酰胺霉素类

(monobactams)(例如,氨曲南(aztreonam));青霉素类(例如,羟氨苄青霉素(amoxicillin)、氨苄青霉素(ampicillin)、羧苄青霉素(carbenicillin)、氯唑西林(cloxacillin)、双氯西林(dicloxacillin)、萘夫西林(nafcillin)、苯唑西林(oxacillin)、青霉素G、青霉素V、哌拉西林(piperacillin)、替卡西林(ticarcillin));多肽抗生素类(例如,杆菌肽(bacitracin)、粘杆菌素(colistin)、多粘菌素B(polymyxin B));喹诺酮类(例如,环丙沙星(ciprofloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、加替沙星(gatifloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、诺氟沙星(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、曲伐沙星(trovafloxacin));磺酰胺类(例如,磺胺米隆(mafenide)、磺胺醋酰(sulfacetamide)、磺胺甲二唑(sulfamethizole)、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、磺胺异恶唑(sulfisoxazole)、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑(trimethoprim-sulfamethoxazole));四环素类(例如,地美环素(demeclocycline)、强力霉素(doxycycline)、二甲胺四环素(minocycline)、土霉素(oxytetracycline)、四环素(tetracycline));碳青霉烯类(carbapenems)(例如,亚胺培南(imipenem)、美罗培南(meropenem)、厄他培南(ertapenem)、多利培南(doripenem)、帕尼培南/倍他米隆(panipenem/betamipron)、比阿培南(biapenem)、PZ-601);氯霉素;克林霉素(clindamycin)、乙胺丁醇;磷霉素(fosfomicin);异烟肼(isoniazid);利奈唑胺(linezolid);甲硝唑(metronidazole);呋喃妥因(nitrofurantoin);吡嗪酰胺(pyrazinamide);奎奴普丁/达福普汀(quinupristin/dalfopristin);利福平(rifampin);大观霉素(spectinomycin);和万古霉素(vancomycin)。优选抗生素为万古霉素、妥布霉素、美罗培南、环丙沙星、哌拉西林、粘杆菌素、氨曲南、环丙沙星和阿奇霉素。

[0113] 代表性的防腐剂包括但不限于:氯漂白剂(次氯酸钠)、季铵盐化合物(例如,苯扎氯铵、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基氯化吡啶)、过氧化氢、苯酚化合物(如TCP)、醇(例如乙醇)、Virkon™、碘化合物(如聚维酮碘)、银化合物(如元素银纳米颗粒/微粒)。

[0114] 代表性的抗真菌剂包括但不限于:多烯类(例如,那他霉素(natamycin)、龟裂杀菌素(rimocidin)、非律平(filipin)、制霉菌素(nystatin)、两性霉素B(amphotericin B)、坎狄辛(candicidin));咪唑类(例如,咪康唑(miconazole)、酮康唑(ketoconazole)、克霉唑(clotrimazole)、益康唑(econazole)、联苯苄唑(bifonazole)、布康唑(butoconazole)、芬替康唑(fenticonazole)、异康唑(isoconazole)、奥昔康唑(oxiconazole)、舍他康唑(sertaconazole)、硫康唑(sulconazole)、噻康唑(tioconazole));三唑类(例如,氟康唑(flucanazole)、伊曲康唑(itraconazole)、艾沙康唑(isavuconazole)、雷夫康唑(ravuconazole)、泊沙康唑(posaconazole)、伏立康唑(voriconazole)、特康唑(terconazole));烯丙胺类(例如,特比萘芬(terbinafine)、阿莫罗芬(amorolfine)、萘替芬(naftifine)、布替萘芬(butenafine));和棘球白素类(echinocandins)(例如,阿尼芬净(anidulafungin)、卡泊芬净(caspofungin)、米卡芬净(micafungin))。

[0115] 抗微生物剂可以在藻酸盐之前、同时或之后方便地应用。方便起见,抗微生物剂与藻酸盐基本上同时或随后应用。例如,在施用藻酸盐低聚物后至少1小时、优选至少3小时、更优选至少5小时且最优选至少6小时应用抗微生物剂。为了优化抗微生物剂的抗微生物效果,可以在对所用抗微生物剂而言合适的时间点反复给予(例如施用或输送)抗微生物剂。本领域技术人员能够设计合适的剂量或用量方案。在长期治疗中,也可以反复使用藻酸盐。

藻酸盐的使用的频率可以与抗微生物剂相同,但通常频率更低。所需频率将取决于生物膜感染的位置、集落成分和所用的抗微生物剂,本领域技术人员能够优化剂量或用量模式以优化结果。

[0116] 在一个有利的实施方式中,可以在从表面物理地除去或减少(例如清创)生物膜后使用或应用抗微生物剂。

[0117] 在除去或尝试除去生物膜后,使表面与藻酸盐低聚物接触0~24小时、尤其2~12小时、更尤其4~8小时、最优选5~7小时,例如,6小时。随后,如果需要可以应用抗微生物剂。在临床环境下,此类情况可能是期望的或特别适合的。在受生物膜感染的伤口的病情中,培养(incubation)的持续时间能够方便地进行设计从而对应于伤口敷料的预定变化。

[0118] 生物膜的物理去除能够使用任何合适的外科手术、机械或化学手段进行。方便起见,所述手段可以是使用液体、凝胶、凝胶溶胶、半固体组合物或加压下施加至生物膜的气体、超声、激光或利用研磨工具。之前、期间或其后自身或作为洗涤溶液用于所述去除的组合物可以方便地包含藻酸盐低聚物。

[0119] 因此,在一个具体实施方式中,提供了清创或洗涤组合物,例如,包含藻酸盐低聚物、特别是如本文定义的任何藻酸盐低聚物的伤口用溶液。此类清创组合物通常为无菌溶液、特别是无菌水溶液或油类无菌溶液,并且还可以包含蛋白水解酶(例如,胶原酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶)、研磨剂固相(例如,胶态二氧化硅、浮石粉、磨碎的植物外壳或磨碎的动物外壳)。

[0120] 组合或联合使用其它生物膜破坏剂可能是有益的。生物膜破坏剂包括但不限于:蛋白酶,例如,丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶(这些蛋白酶类型的实例列于EP0590746中,本文通过参考并入其全部内容);核酸酶,例如,DNA酶I和II, RNA酶A、H、I、II、III、P、PhyM、R;脂肪酶和能够降解多糖的酶、凝溶胶蛋白、巯基还原剂、乙酰半胱氨酸、不带电的低分子量多糖(例如右旋糖苷);或阴离子聚氨基酸(例如聚ASP或聚GLU)。

[0121] 特别可以举出藻酸盐裂解酶,并且其与本文定义的藻酸盐低聚物的组合使用代表本发明这方面的一个可能的具体实施方式。

[0122] 在临床环境下处理生物膜时,组合或联合使用免疫刺激剂也可能是有益的。这些免疫刺激剂可以在对应于上文关于抗微生物剂所述时间点的时间点方便地使用,并且可以在必要时与藻酸盐低聚物和抗微生物剂组合使用。合适的免疫刺激剂包括但不限于如TNF、IL-1、IL-6、IL-8等细胞因子和免疫刺激性藻酸盐(例如,如US 5,169,840、W091/11205和W003/045402中所述的高M含量藻酸盐,本文通过参考明确地并入其全部内容,但是包括任何具有免疫刺激性质的藻酸盐)。

[0123] 藻酸盐低聚物与生长因子(例如,PDGF、FGF、EGF、TGF、hGF)和酶的组合或联合使用在本发明的医学用途上也可能是有益的。合适的酶的代表性实例包括但不限于:蛋白酶,例如,丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶(这些蛋白酶类型的实例列于EP0590746中,本文通过参考引入其全部内容);核酸酶,例如,DNA酶I和II, RNA酶A、H、I、II、III、P、PhyM、R;脂肪酶和能够降解多糖的酶。

[0124] 藻酸盐低聚物与生理学耐受的粘膜粘度降低剂组合或联合使用也可能是有益的,例如,核酸裂解酶(例如,如DNA酶I等DNA酶)、凝溶胶蛋白、巯基还原剂、乙酰半胱氨酸、氯化钠、不带电的低分子量多糖(例如右旋糖苷)、精氨酸(或其它一氧化氮前体或合成刺激剂)、

或阴离子聚氨基酸(例如聚ASP或聚GLU)。重要的具体粘液溶解剂(mucolytics)是氨溴索(Ambroxol)、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、多米奥醇(domiodol)、依普拉酮(eprazinone)、厄多司坦(erdosteine)、来托司坦(letosteine)、巯乙磺酸钠(mesna)、奈替克新(neltenexine)、索布瑞醇(sobrerol)、司替罗宁(stepronin)、硫普罗宁(tiopronin)。特别优选使用DNA酶。

[0125] 如上所讨论,必要时可将藻酸盐低聚物与可能需要使用的任何其它治疗活性剂(例如抗炎剂)一起使用。与其它治疗活性剂(例如抗微生物剂或抗炎剂)组合使用的藻酸盐低聚物可以有利地使得其它治疗活性剂的剂量(例如通常或正常的剂量)减少,例如,可以将其以正常或通常剂量、或更低的剂量(例如,其正常剂量的至多50%(或正常剂量的50%))使用。

[0126] 本发明涵盖了单一藻酸盐低聚物或不同藻酸盐低聚物的混合物(多种/复数种)的应用。因此,可以使用例如不同藻酸盐低聚物(例如,两种或多种)的组合。

[0127] 在医学应用的情况下,可以以任何便利形式或通过任何便利手段(例如,通过局部、口腔、胃肠外、肠内、胃肠外途径或通过吸入)来对受试对象施用本发明的藻酸盐。优选将藻酸盐通过局部、口腔或胃肠外途径施用或通过吸入施用。

[0128] 本领域技术人员将能够根据本领域已知和广泛地描述于文献中的任何常规方法将本发明的藻酸盐配制成适合这些施用途径的药物组合物。仅作为指导起见,实施例11和12描述了两种可能的组合物(局部组合物和清创液)。

[0129] 因此,本发明还提供用于治疗或预防生物膜感染的药物组合物,所述药物组合物包含本文定义的藻酸盐低聚物以及至少一种药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0130] 所述活性成分、必要时与其它活性剂一起可以与一种或多种常规载体、稀释剂和/或赋形剂混合以生产常规盖伦制剂(galenic preparation),例如,片剂、丸剂、粉末剂(例如吸入粉末)、锭剂、袋剂(sachet)、扁囊剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(作为固体或处于液体介质中)、喷雾剂(例如鼻喷雾剂)、用于雾化器的组合物、膏剂、软和硬凝胶胶囊、栓剂、无菌注射液和无菌包装的粉末剂等。

[0131] 合适的载体、赋形剂和稀释剂的实例为乳糖、右旋葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、惰性藻酸盐、黄芪胶、凝胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水糖浆(water syrup)、水、水/乙醇、水/乙二醇、水/聚乙烯、高渗盐水、乙二醇、丙二醇、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油或脂肪物质(例如硬脂)或其合适的混合物。优选的赋形剂和稀释剂为甘露醇和高渗盐水。

[0132] 另外,该组合物还可以包含润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、甜味剂和调味剂等。

[0133] 如上讨论,提出用于本发明的藻酸盐低聚物可以与其它治疗剂组合使用,例如,用来在单一的药物制剂或组合物中共同施用,或分别施用(即分别、依次或同时地施用)。因此,本发明的藻酸盐可以与第二(或更多的)治疗活性剂组合,例如,在药物试剂盒或作为组合的(“组合”)产品。

[0134] 因此,本发明的另一方面提供了包含本文定义的藻酸盐低聚物和第二活性剂作为组合制剂的产品,所述组合制剂被分别、同时或依次应用于生物膜和/或施用至受试对象以用于抗击生物膜和/或治疗或预防受试对象中的生物膜感染或本文定义的任何病况。

[0135] 如上关于组合治疗所述,药物组合中可以包含其它治疗活性剂。

[0136] 胃肠外施用形式(例如静脉内溶液)应该为无菌的,并且不含生理学上不能接受的试剂,以及应该具有较低摩尔渗透压浓度以便使刺激或施用时的其它副作用最小化,因此溶液应该优选为等渗溶液或稍微高渗的溶液,例如高渗盐水。合适的载剂包括通常用于胃肠外溶液施用的水性载剂,例如,氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋葡萄糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、乳酸化林格氏注射液,以及如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版,Easton:Mack Publishing Co.,第1405-1412页和第1461-1487页(1975)和The National Formulary XIV,第14版,Washington:American Pharmaceutical Association (1975)中所述的其它溶液。所述溶液可以包含传统上用于胃肠外溶液的防腐剂、抗微生物剂、缓冲液和抗氧化剂以及赋形剂与其它添加剂,其与生物聚合物相容并且不干扰产品的制造、贮存或使用。

[0137] 为进行局部施用,可将藻酸盐低聚物加入霜剂、膏剂、凝胶剂和透皮贴剂等中。还可以将藻酸盐低聚物加入医用敷料中,例如,如织造(例如纤维)敷料或非织造敷料(例如凝胶或具有凝胶成分的敷料)等伤口敷料。藻酸盐聚合物在敷料中的使用是已知的,并且可以将本发明的藻酸盐低聚物加入此类敷料或实际上任何敷料中。

[0138] 因此,在另一个具体实施方式中,本发明还提供包含藻酸盐低聚物(其可以为本文定义的任何藻酸盐低聚物)的伤口敷料。

[0139] 设想的另一个合适的局部系统是原位药物输送系统,例如,其中固体、半固体、无定形或液晶凝胶基质原位形成并且可以包含藻酸盐低聚物的凝胶。可以方便地将此类基质设计来控制藻酸盐低聚物从基质的释放,例如能够在选定的时期使释放延迟和/或持续。此类系统仅当与生物组织或流体接触时才可以形成凝胶。该凝胶通常是生物粘附性的。通过此类输送技术能够针对向任何身体位置的输送,所述输送能够保持或适合保持前凝胶(pre-gel)组合物。此类系统描述于W02005/023176。

[0140] 对于对口腔、面颊和牙齿表面的应用,特别可举出牙膏和漱口剂。因此,在一个特定方面,本发明包括包含藻酸盐低聚物(其可以为本文定义的任何藻酸盐低聚物)的口腔保健组合物或口腔卫生组合物、特别是漱口剂或牙膏。

[0141] 如上所述,本发明的优选组合物为用于清创过程中除去生物膜(例如,从组织中除去生物膜)的清创组合物。此类组合物通常是液体,但是可以使用凝胶、凝胶溶胶、半固体组合物。该组合物可用于清除生物膜(例如通过在压力下应用于组织)和/或可以用于在借助其它手段(例如通过外科手术、机械或化学方法)进行清创之前、期间和/或之后冲洗组织。本领域技术人员能够容易地配制本发明的清创组合物。

[0142] 在无生命表面上的生物膜的情形中,可以以任何便利的组合物或制剂或者通过任何便利手段将藻酸盐低聚物应用至待处理表面。因此,藻酸盐低聚物可以为液体、凝胶、凝胶溶胶、半固体或固体形式(例如溶液剂、悬浮剂、均匀混合剂(homogenate)、乳剂、糊剂、粉末剂、气雾剂、蒸汽剂)。用于处理此类无生命表面生物膜的组合物通常是非药物可接受的组合物。组合物形式的选择将由生物膜结构以及集落组成和位置决定。例如,如果生物膜的位置为流体线,则应用流体组合物可能较为方便。此外可能优选的是使用持续作用于待处理表面上但不会浸入正常使用的流体的组合物,例如粘合性凝胶。本领域技术人员能够根据其公知常识容易地制备合适的组合物。例如,可以将藻酸盐低聚物添加至涂料制剂,并应

用于待处理表面(例如,艇壳或暴露于水的艇结构的其它部分),或应用于建筑物或其任何部分、罐(例如贮存罐或处理罐),或实际上可应用于任何工业机械的任何部分。如上所述,此类组合物还可以方便地包含抗微生物剂,例如氯漂白剂、TCP、乙醇、Virkon™、聚维酮碘、银化合物等。由于该组合物不必为药物可接受的,因而考虑到表面损伤、环境污染、用户安全和受处理表面的污染以及与组合物其它成分的相互作用,能够使用苛刻的抗微生物剂。

[0143] 通过使用本领域已知的方法可以将本发明的组合物配制来以便在施用至受试对象/表面后提供对活性成分的快速、持续或延迟释放。优选粘合性组合物。粘合性的、持续和/或延迟释放的制剂可能是特别方便的。

[0144] 在另一方面,本发明提供了已对其易感表面用本文定义的藻酸盐低聚物进行预处理的、易受生物膜建群影响的产品。易受生物膜建群影响的产品和表面的非限制性实例如上所述。特别可以举出食品或饮品加工、贮存或配送设备和医疗装置。预处理能够通过任何方便的手段来实现,例如将藻酸盐低聚物应用至表面的任何形式、特别是对表面进行涂布(例如,喷雾干燥、用包含藻酸盐低聚物的聚合物进行聚合物涂布、和使用包含藻酸盐低聚物的涂料、清漆或漆进行喷涂、涂清漆或涂漆)。此类包含藻酸盐低聚物的“涂布”组合物(例如油漆、清漆或漆)代表本发明的又一个方面。作为另一种选择,可将藻酸盐低聚物引入制造表面的材料中。该方法适合由例如塑料和硅酮等聚合物制造的表面,例如,如上所述的医疗装置。

附图说明

[0145] 参考以下的非限制性实施例将进一步描述本发明,其中:

[0146] 图1显示在产生过夜、然后用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0、1%、2%或6%)处理过夜、用阿米卡星(4096 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌生物膜中的细菌生长。

[0147] 图2显示在产生过夜、然后用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0、1%、2%或6%)处理过夜、用土霉素(4096 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌生物膜中的细菌生长。

[0148] 图3显示在使用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0、1%、2%或6%)产生过夜,用土霉素(4096 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌生物膜中的细菌生长。

[0149] 图4显示在使用粘蛋白(2.5g/L)产生6小时、然后用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0或6%)处理、用阿米卡星、妥布霉素、土霉素或“阿米卡星+土霉素”(4096 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ~0 $\mu\text{g ml}^{-1}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌生物膜中的细菌生长。

[0150] 图5显示在不使用粘蛋白产生6小时、然后用G片段(0或6%)但不用粘蛋白处理、用阿米卡星(4096 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或妥布霉素(1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌PA01生物膜中的细菌生长。

[0151] 图6显示在使用粘蛋白(2.5g/L)产生6小时、然后用粘蛋白(2.5g/L)和“G-嵌段#0802”(0或6%)处理过夜、用阿米卡星(4096 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ~0 $\mu\text{g ml}^{-1}$)或妥布霉素(1024 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ~0 $\mu\text{g ml}^{-1}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的假单胞菌PA01生物膜中的细菌生长。

[0152] 图7显示在使用粘蛋白(2.5g/L)产生6小时、然后用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0或

6%)处理过夜、用土霉素($4096\mu\text{g ml}^{-1}\sim 0\mu\text{g ml}^{-1}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的金黄色葡萄球菌菌株ATCC 6538生物膜中的细菌生长。

[0153] 图8显示在使用粘蛋白(2.5g/L)产生6小时、然后用粘蛋白(2.5g/L)和G片段(0或6%)处理额外过夜、用妥布霉素($1024\mu\text{g/ml}\sim 0\mu\text{g/ml}$)处理过夜后0小时、6小时和24小时时的MRSA伤口分离株‘1103’生物膜中的细菌生长。

[0154] 图9显示在用粘蛋白(2.5g/L)和0或2%的G片段处理过夜的生物膜中G片段和粘蛋白对白色念珠菌ATCC 90028和都柏林念珠菌CD36^T的附着的影响。

[0155] 图10显示用粘蛋白(2.5g/L)处理6小时然后用粘蛋白(2.5g/L)和0或2%的G片段处理24小时的假单胞菌生物膜的电子显微照片。

具体实施方式

[0156] 实施例

[0157] 实施例1:材料和标准方法

[0158] 细菌菌株

[0159] 将两种培养收集菌株铜绿假单胞菌PA01(ATCC 15682,伤口分离株)和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)与来自慢性下肢静脉性溃疡的临床分离株(金黄色葡萄球菌(MRSA)‘1103’)共同用于MBEC测试。将两种念珠菌型菌株(白色念珠菌ATCC 90028和都柏林念珠菌CD36^T)用于附着测试。

[0160] 化学药品和细菌培养基

[0161] 细菌菌落在补充有5%绵羊血的2号血液琼脂基质(BA;Lab15,LabM,Bury,英国)上生长,并用于接种胰蛋白胨大豆肉汤(TSB,CM0129,Oxoid,Basingstoke,英国)以生长过夜。在经阳离子调节的米勒-海顿(Mueller-Hinton)肉汤(CAMHB;Lab114,LabM)中产生了生物膜。所用的所有抗生素均为医药级(Sigma-Aldrich,Gillingham,英国),并且包括阿米卡星、土霉素和妥布霉素。猪胃粘蛋白糖蛋白(由Jeff Pearson,Newcastle University纯化)和藻酸盐低聚物CF-5/20(“G-片段”;2600Da,%G 90~95)和G-嵌段(G-block)#0802(6400Da,%G 91)由挪威Sandvika的Algipharma AS提供。

[0162] 最小生物膜根除浓度测试(MBEC)

[0163] 所用的MBEC方法改编自Moskowitz SM等,(2004)J Clin Microbiol42:1915-1922。从-80℃贮存器中取出后,使细菌分离株在BA上生长,然后在TSB中生长过夜。将细菌培养物在具有或不具有粘蛋白(2.5g/L)的CAMHB中稀释至0.5麦克法兰(McFarland)后,将100μl转移至平底96孔微量滴定板的孔中。在实施例3中,将细菌培养物稀释至在具有粘蛋白(2.5g/L)和藻酸盐的CAMHB中的0.5麦克法兰后,将100μl转移至平底96孔微量滴定板的孔中。

[0164] 然后将平板包在石蜡膜(parafilm)中以防止脱水,并在37℃温育以使得可以形成生物膜。温育时间和条件如下所述而有所不同。

[0165] 生物膜形成后,除去浮游细胞和上清液,然后用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤各孔。洗涤后,将细胞在100μl CAMHB中用藻酸盐和/或抗生素的组合并使用或不使用粘蛋白(2.5g/L)进行处理。然后将平板包在石蜡膜中,并在37℃温和翻转下温育。温育时间和条件如下所述而有所不同。所用的抗生素和浓度范围如下所示。

[0166] 将孔用PBS洗涤,然后一式两份地添加100 μ l每种浓度的抗生素在CAMHB中的连续稀释液。将平板再次包在石蜡膜中,并在37 $^{\circ}$ C温和翻转下温育过夜。

[0167] 在所有MBEC测试中,如下评估最终的细胞数量。将孔用PBS洗涤,使生物膜通过剧烈的移液器混合(pipetting)而重悬于100 μ l CAMHB中。在微孔板阅读仪(FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH)上立即(0小时)和在37 $^{\circ}$ C温育后在6h和24h时测定620nm处的光密度(OD₆₂₀)。

[0168] MBEC值是测试样品中抑制细菌的所有生长的抗生素的浓度。细菌生长根据样品吸光度的增加而测定。因此,MBEC值的降低表明样品对抗生素的敏感性的增加(即需要更少的抗生素来避免细菌生长)。

[0169] 所用的抗生素和浓度范围

	抗生素	浓度范围 (μ g ml ⁻¹)
[0170]	阿米卡星	4~4096
	阿米卡星+土霉素	4~4096
[0171]	土霉素	4~4096
	妥布霉素	4~4096

[0172] 不使用粘蛋白的最小生物膜根除浓度(MBEC)测试

[0173] 将铜绿假单胞菌PA01(ATCC 15682)用于确定不添加粘蛋白的MBEC值。遵循上述执行MBEC方案,但将粘蛋白添加至生长培养基。对阿米卡星和妥布霉素两种抗生素进行测试。

[0174] 酵母附着测试

[0175] 所用的附着测试改良自Djordjevic等,(2002)Appl Environ Microbiol68:2950-2958。白色念珠菌ATCC 90028和都柏林念珠菌CD36^T是用于附着测试的念珠菌属毒株。念珠菌属在沙氏右旋葡萄糖琼脂(Sabourauds dextrose agar)(Lab33,LabM)中生长,并且在沙氏(Sabourauds)液体培养基(Lab9,LabM)中生长过夜肉汤培养物。添加5 μ l过夜培养物后,将95 μ l具有添加的粘蛋白(2.5g/l)和G-片段(浓度为0、2%、6%或10%)的CAMHB添加至各孔。将平板包在石蜡膜中,并且在37 $^{\circ}$ C温育过夜以使生物膜可以形成。

[0176] 将浮游细胞和上清液从孔中除去,其后用无菌dH₂O洗涤(3 \times)所得的生物膜。然后将平板在56 $^{\circ}$ C干燥45分钟。然后用150 μ l的1%(体积比)结晶紫(水溶液)对各孔染色45分钟。将平板再次用dH₂O洗涤(3 \times),然后添加200 μ l 95%乙醇。5分钟后,从各孔转移100 μ l至新的微量滴定板。然后在540nm在平板阅读仪上测定OD。

[0177] 成像用生物膜的生长

[0178] 从-80 $^{\circ}$ C贮存器取出后,使细菌分离株在BA上生长,然后在TSB中生长过夜。将细菌培养物稀释至具有粘蛋白(2.5g/l)的CAMHB中的0.5麦克法兰后,将100 μ l转移至平底96孔微量滴定板的孔中。然后将平板包在石蜡膜中以防止脱水,并在37 $^{\circ}$ C温育6小时以使生物膜形成。生物膜形成后,除去浮游细胞和上清液,然后用无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤各孔。洗涤后,将细胞用100 μ l CAMHB中的G片段和粘蛋白(2.5g/l)处理。然后将平板包在石蜡膜

中,并在37°C温和翻转下温育24小时。

[0179] 假单胞菌生物膜的扫描电子显微分析(SEM)

[0180] 将戊二醛(2%)添加至G片段处理的生物膜,并且在室温固定24小时。使样品在梯度浓度系列乙醇溶液中脱水,在临界点干燥器(Balzers CPD 030,德国)中干燥,在铝柱上固定,在溅射涂布机(EMscope,AE 1231型,英国)中用金涂布,然后在扫描电子显微镜(FEI-Philips XL-20,荷兰)上观察。

[0181] 使用BODIPY[®]630/650-X SE的未干扰生物膜的共焦显微分析

[0182] 将G片段处理的生物膜用无菌蒸馏水洗涤,并用BODIPY[®]630/650-X SE染色剂(BODIPY[®]630/650-X SE,Invitrogen Ltd)染色,该染色剂选择性地对假单胞菌生物膜中的基质成分(EPS)进行染色。

[0183] 将BODIPY[®]630/650-X SE添加(100 μ l(10 μ g/ml))至各生物膜样品。将制剂在黑暗中温育1小时,然后通过CLSM分析。

[0184] 实施例2:用G片段预处理的过夜铜绿假单胞菌生物膜的MBEC值的测定

[0185] 进行如上所述的MBEC测试。不使用粘蛋白使生物膜在平板中产生过夜。用PBS洗涤后,将生物膜与0%、1%、2%或6%的G片段和粘蛋白一起温育过夜。用PBS洗涤后,将细胞与抗生素(阿米卡星或土霉素)而不与粘蛋白一同温育过夜。结果如图1和2中所示,以及列于下表2和3中。可见,对于阿米卡星或土霉素而言,用G片段过夜预处理的生物膜引起在6小时和24小时的MBEC值的减小。对于阿米卡星和土霉素而言的6小时的MBEC值被1%G片段减半,被2%和6%G片段减为四分之一。对于土霉素而言的24小时的MBEC值被所有浓度的G片段减半。对于阿米卡星而言的24小时的MBEC值减小,但无法将该减小定量。这表明使用G片段的过夜预处理增加生物膜中的铜绿假单胞菌对这些抗生素的敏感性。

[0186] 表2:在抗生素中暴露过夜后6小时的MBEC值的总结。假单胞菌生物膜过夜产生。将粘蛋白(2.5g/L)和0、1%、2%或6%的G片段添加至已建立的生物膜。值表达为以 μ g/ml计的抗生素。

	[G 片段]	阿米 卡星	土 霉素
	0	2048	51
			2
[0187]	1%	1024	25
			6
	2%	512	12
			8
	6%	512	12
			8

[0188] 表3:在抗生素中暴露过夜后24小时的MBEC值的总结。假单胞菌生物膜过夜产生。将粘蛋白(2.5g/L)和0、1%、2%或6%的G片段添加至已建立的生物膜。值表达为以 μ g/ml计的抗生素。

	[G 片段]	阿米卡星	土霉素
	0	>40	20
		96	48
[0189]	1%	4096	10
	2%	4096	10
	6%	4096	10
			24
			24

[0190] 图例

[0191]  MBEC值从0%G减小

[0192] 实施例3:G片段存在时产生的铜绿假单胞菌生物膜的MBEC值的测定

[0193] 进行如上所述的MBEC测试。使生物膜在粘蛋白和0、1%、2%或6%的G片段的存在下在平板中产生过夜。洗涤后,将生物膜暴露于土霉素(无粘蛋白)中过夜。结果如图3所示,且列于下表4和5中。可见,在受测G片段的所有浓度,在G片段存在下产生的生物膜使24小时MBEC值减半。当使用2%和6%G片段时,6小时MBEC值减半。1%G片段不能引起MBEC值的减小。这些数据显示,在G片段存在下产生的生物膜中的铜绿假单胞菌比在不存在G片段时产生的生物膜中的铜绿假单胞菌对土霉素更易感。

[0194] 表4:在抗生素中暴露过夜后6小时的MBEC值的总结。假单胞菌生物膜使用粘蛋白(2.5g/L)和0、1%、2%或6%的G片段产生。值表达为以µg/ml计的抗生素。

	[G 片段]	土霉素
	0	512
[0195]	1%	512
	2%	256
	6%	256

[0196] 表5:在抗生素中暴露过夜后24小时的MBEC值的总结。假单胞菌生物膜使用粘蛋白(2.5g/L)和0、1%、2%或6%的G片段产生。值表达为以µg/ml计的抗生素。

	[G 片段]	土霉素
	0	4096
[0197]	1%	2048
	2%	2048
	6%	2048

[0198] 图例

[0199]  MBEC 值从 0% G 减小
 MBEC 值从 0% G 无变化

[0200] 实施例4:产生6小时并用G片段预处理的铜绿假单胞菌生物膜的MBEC值的测定

[0201] 接下来进行如上所述的MBEC测试,其中粘蛋白始终存在。生物膜在6小时的温育期间在粘蛋白的存在下产生,将其洗涤并与G片段和粘蛋白一起温育过夜。用PBS洗涤后,将培养物暴露于抗生素(阿米卡星、妥布霉素、土霉素或阿米卡星和土霉素的组合)而不使用粘蛋白。结果如图4所示,且列于下表6和7中。可见,使用6%G片段的6小时生物膜的预处理对

于所有受测抗生素而言均导致6小时MBEC值减少至至少四分之一,即在这些生物膜中的铜绿假单胞菌对于所述抗生素的敏感性至少提高四倍。实际上,6%G片段对于土霉素而言导致6小时MBEC值减小至对照值的1/8。对于阿米卡星和妥布霉素而言24小时MBEC值减半。对于土霉素和阿米卡星/土霉素混合物而言24小时MBEC值没有显示出MBEC值的变化。

[0202] 表6:暴露于抗生素过夜后6小时的MBEC值的总结。假单胞菌生物膜在添加有粘蛋白的培养基中产生6小时,暴露于0或6%G片段过夜,然后暴露于抗生素。值表达为以 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 计的抗生素。

[0203]

[G 片段]	阿米卡星	土霉素	妥布霉素	阿米卡星+土霉素
0	64	512	32	128
6%	16	64	8	64

[0204] 表7:暴露于抗生素过夜后24小时时MBEC值的总结。假单胞菌生物膜在添加有粘蛋白的培养基中产生6小时,暴露于0或6%G片段过夜,然后暴露于抗生素。值表达为以 $\mu\text{g/ml}$ 计的抗生素。

[0205]

[G 片段]	阿米卡星	土霉素	妥布霉素	阿米卡星+土霉素
0	>4096	1024	512	1024
6%	4096	1024	256	1024

[0206] 图例

[0207]  MBEC 值从 0% G 减小
MBEC 值从 0% G 无变化

[0208] 实施例5:不使用粘蛋白产生6小时并使用G片段而不用粘蛋白预处理的铜绿假单胞菌生物膜的MBEC值的测定

[0209] 使用妥布霉素和阿米卡星但不添加粘蛋白来重复实施例4的方案。结果如图5所示。可见,在不存在粘蛋白时,除了对于阿米卡星而言的24小时MBEC值以外,G片段仍然能够使全部的MBEC值减半。这表明粘蛋白在以上实施例中所见效果中不起显著作用。

[0210] 实施例6:产生6小时并使用不同的藻酸盐低聚物预处理的铜绿假单胞菌生物膜的MBEC值的测定

[0211] 使用替代性的藻酸盐低聚物,G嵌段(#0802)(6400MW,与2600MW的CF-5/20G片段对比)以及使用妥布霉素和阿米卡星重复实施例4中描述的MBEC测试。通过使用G嵌段(#0802)预处理生物膜,对于阿米卡星在24小时的MBEC值减少至四分之一。相同的处理导致对于妥布霉素的24小时MBEC值减半。这些数据显示,另一藻酸盐低聚物能够引起生物膜中的铜绿假单胞菌PA01对妥布霉素和阿米卡星的敏感性的增加。

[0212] 实施例7:使用G片段预处理的包含其它细菌的6小时生物膜的MBEC值的测定

[0213] 使用实施例4中所述MBEC测试和土霉素来研究G片段对金黄色葡萄球菌生物膜的影响。在图7中可见,对于土霉素而言,使用6%G片段对包含金黄色葡萄球菌ATCC 6538的生物膜的预处理使在6小时和24小时的MBEC值减半。在图8中可见,对于妥布霉素而言,使用6%G片段对包含MRSA伤口分离株‘1103’的生物膜的预处理使在24小时的MBEC值减半。这些数据显示,通过使用G片段预处理这些生物膜,能够使得在生物膜中常见的其它细菌对土霉

素和妥布霉素更易感。

[0214] 实施例8:G片段对生物膜中的酵母附着的影响

[0215] 利用上述附着测试来研究G片段对生物膜中的白色念珠菌和都柏林念珠菌的附着的影响。与仅粘蛋白对照相比,当包含这些酵母的生物膜在2%G片段和粘蛋白的存在下形成时,观察到两种念珠菌属物种的附着的降低(图9)。这些数据显示,G片段能够影响发展中的生物膜中的酵母细胞的附着。

[0216] 实施例9:假单胞菌生物膜结构的显微分析和G片段的影响

[0217] 接下来进行使用扫描电子显微镜(SEM)对假单胞菌生物膜的整体结构的分析。图10显示2%G片段对生物膜结构的影响。包被细胞表面的细胞外多糖(EPS)似乎被2%G片段破坏。

[0218] 实施例10:假单胞菌生物膜结构的显微分析和G片段的影响

[0219] 使用用荧光染料BODIPY®630/650-X SE标记的未干扰生物膜的共焦显微分析来研究G片段对假单胞菌生物膜基质的结构的影响。该染料选择性地将假单胞菌生物膜中的基质成分(EPS)染色。当与“仅粘蛋白”相比时,随着G片段浓度的增加而明显出现生物膜基质的细微碎裂。

[0220] 实施例11:包含藻酸盐低聚物的局部组合物

[0221] 使用以下组分制备包含藻酸盐低聚物的局部组合物(增湿护肤身体洗涤剂)的实例。

[0222] 油相:

矿物油 3%

环聚甲基硅氧烷 4%

肉豆蔻酸异丙酯 3%

[0223]

硬脂酸 1.8%

鲸蜡醇 1.0%

硬脂酸甘油酯 1.5%

[0224] 水相:

卡波姆 984 (Carbomer 984) 0.10%

甘油 3%

[0225] 三乙醇胺 0.90%

藻酸盐低聚物 0.1%

水 81.60%。

[0226] 实施例12:包含藻酸盐低聚物的清创组合物

[0227] 使用以下组分制备包含藻酸盐低聚物的液体清创组合物的实例。

	蓖麻油	77.8%
	秘鲁香脂(精制级)	10%
	胶原酶	0.2%
[0228]	ZnCl	0.5%
	水	5%
	聚氧乙烯(10)油烯基醚	4%
	胶态二氧化硅	2%
	藻酸盐低聚物	0.5%

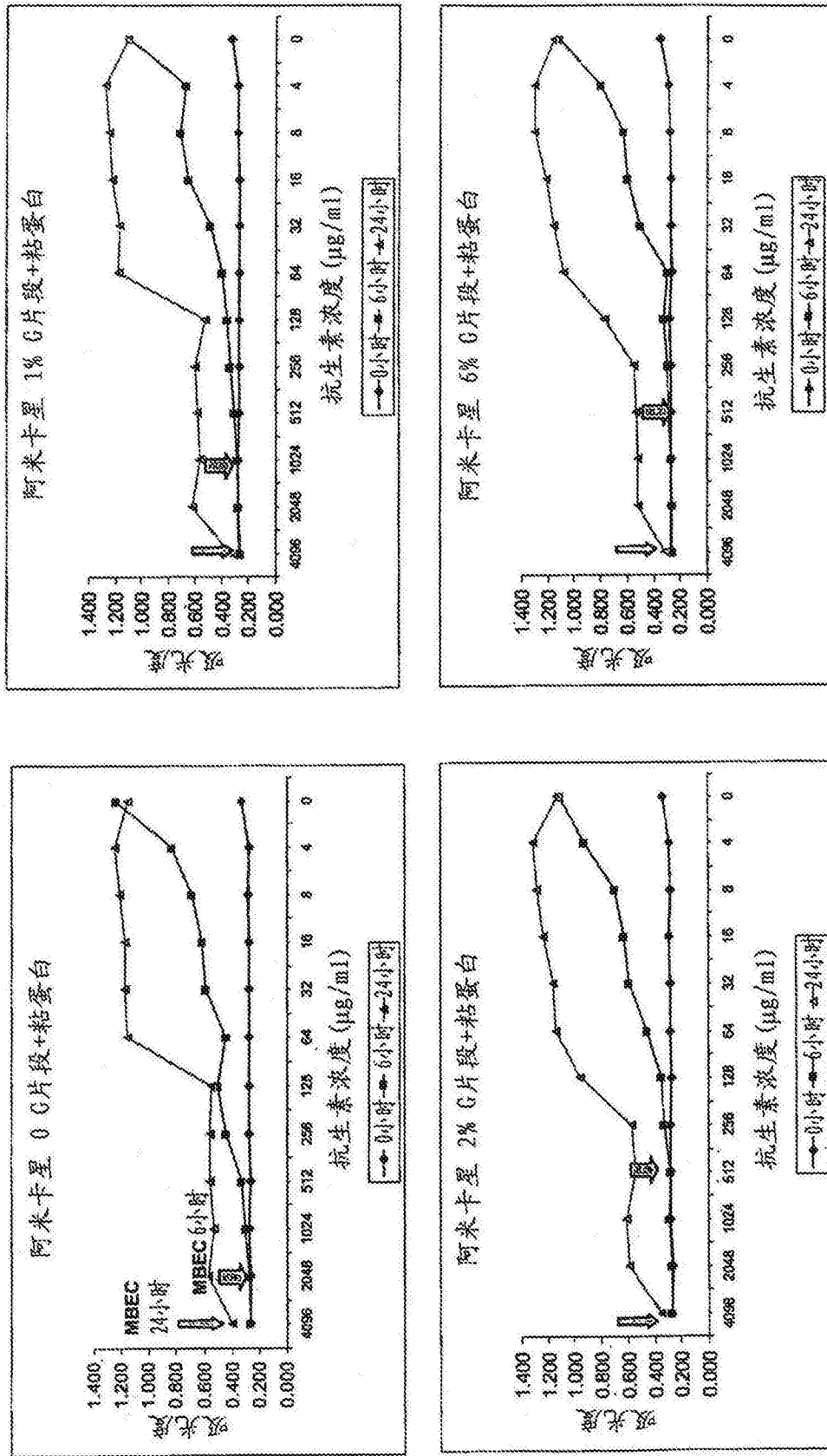


图1

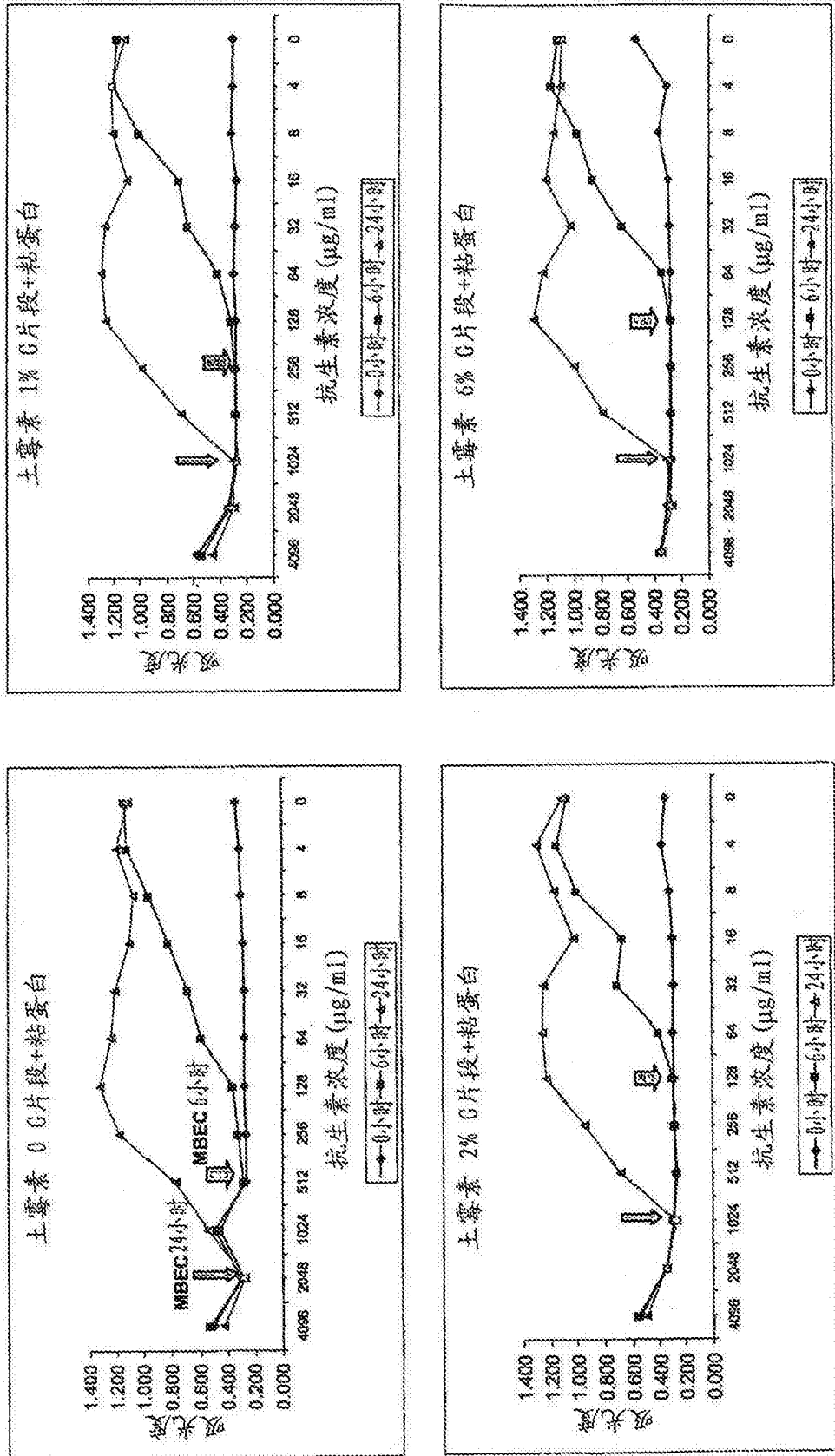


图2

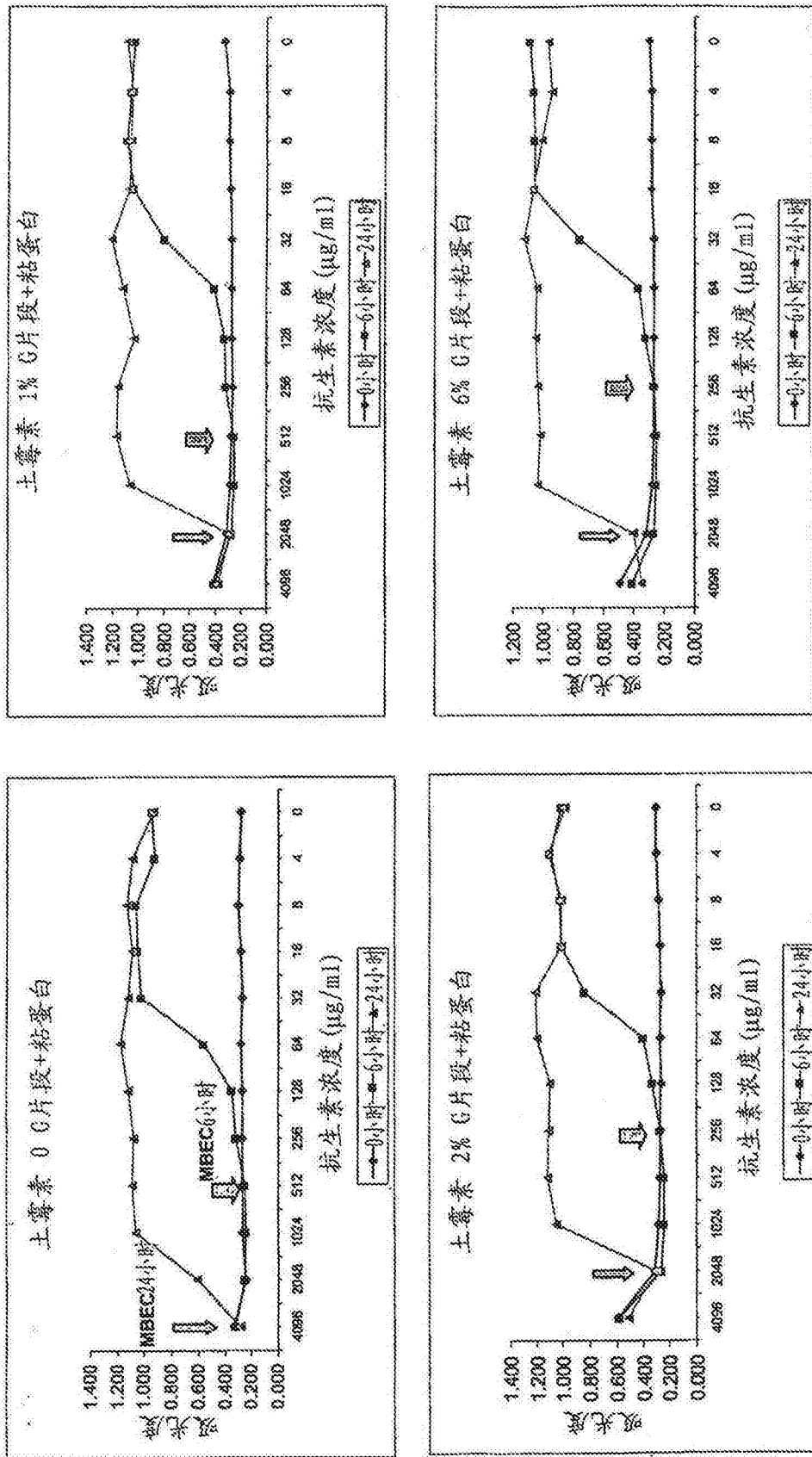


图3

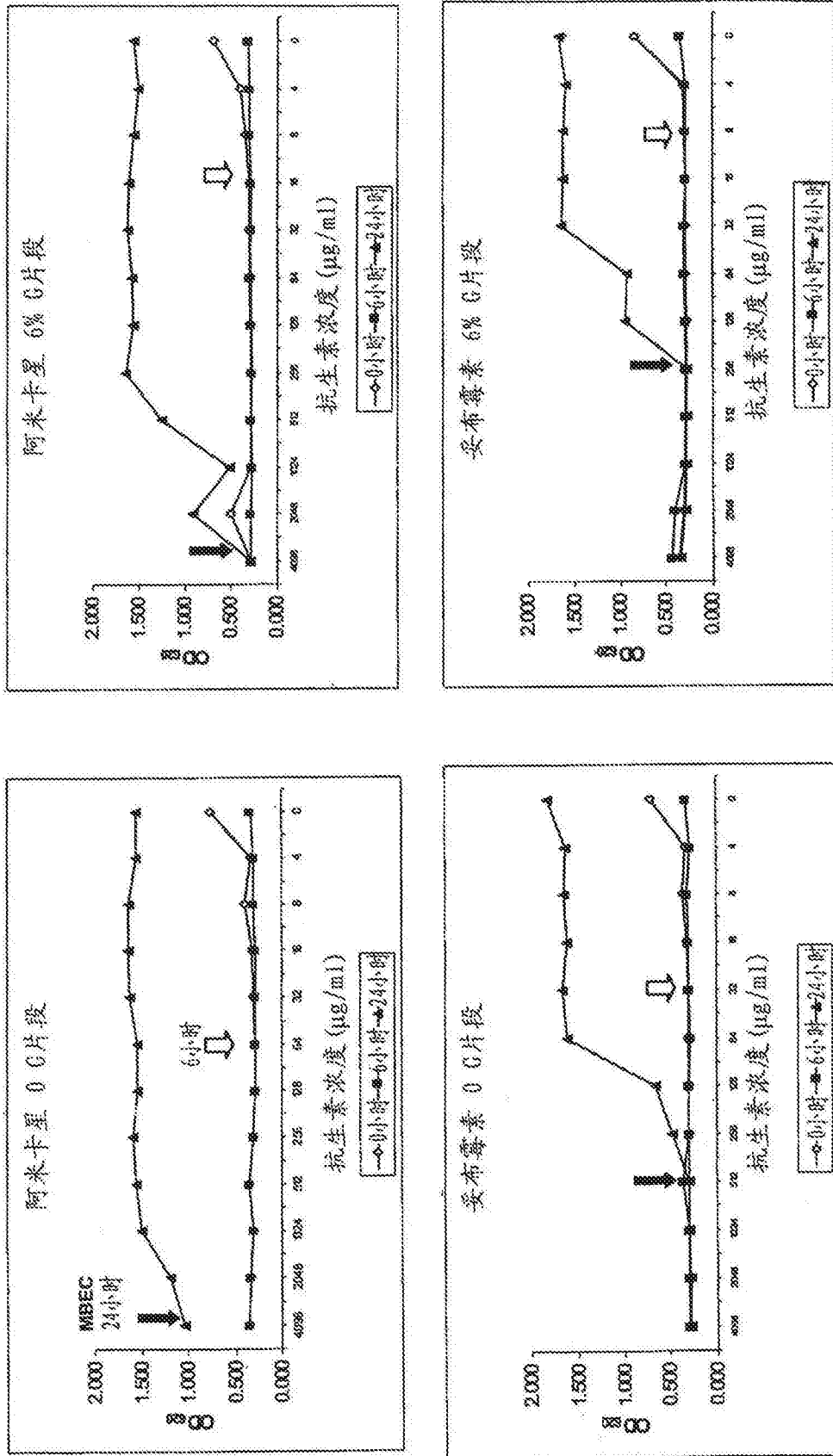


图4

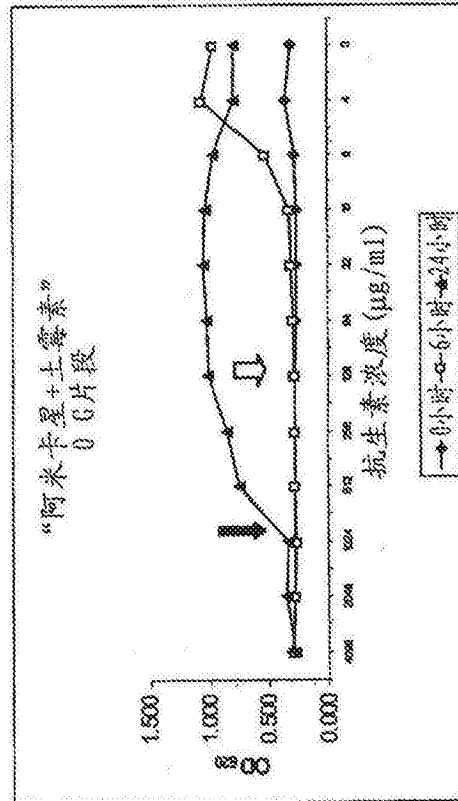
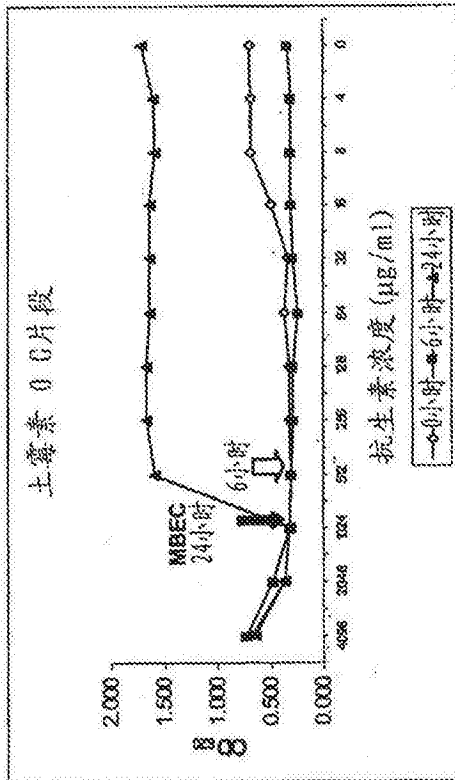
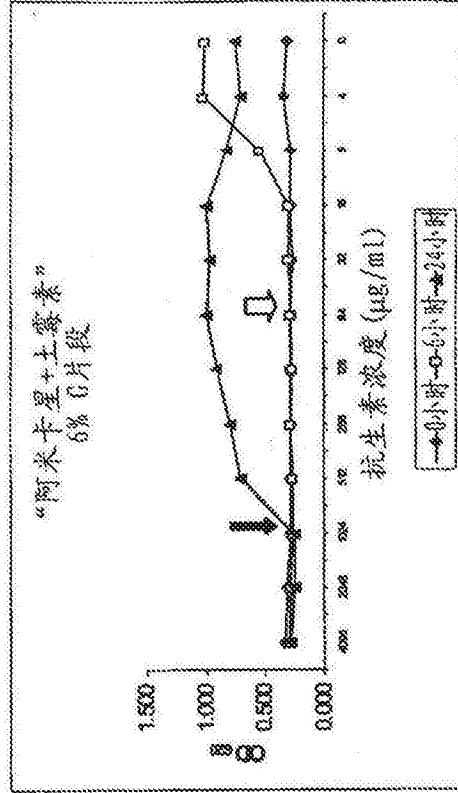
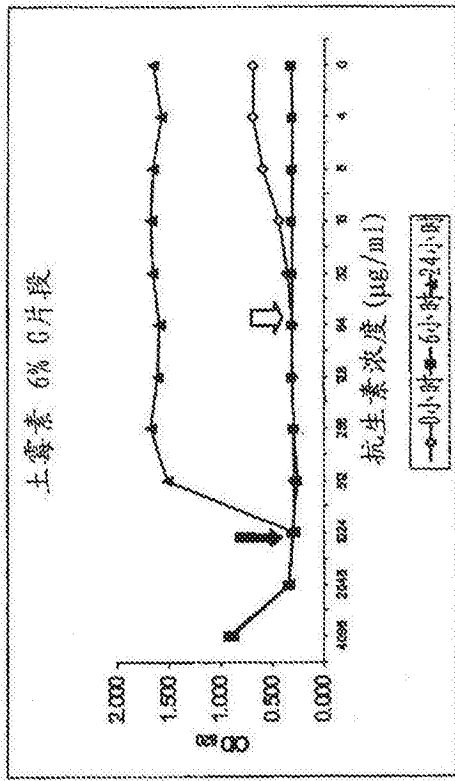


图4(续)

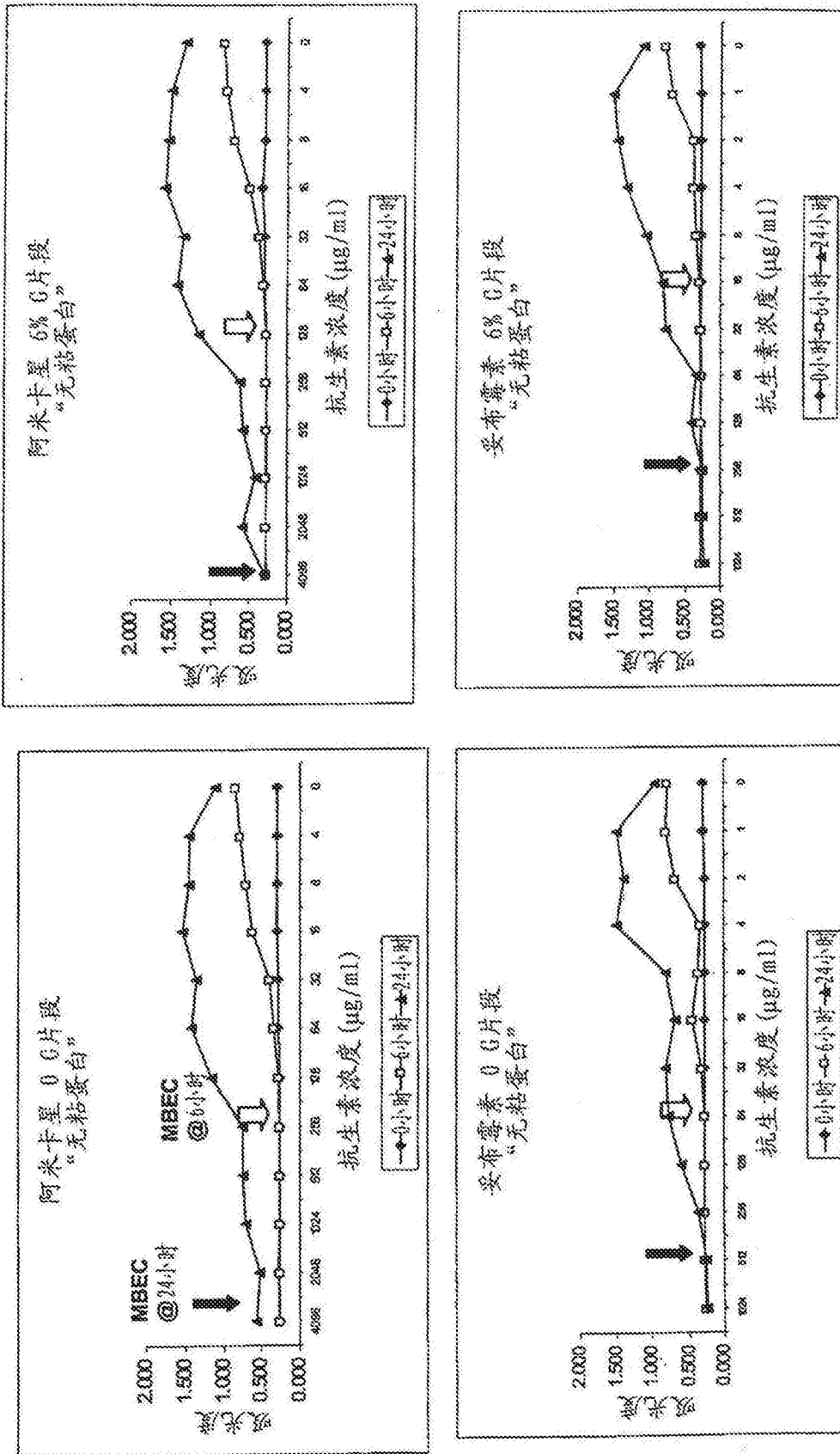


图5

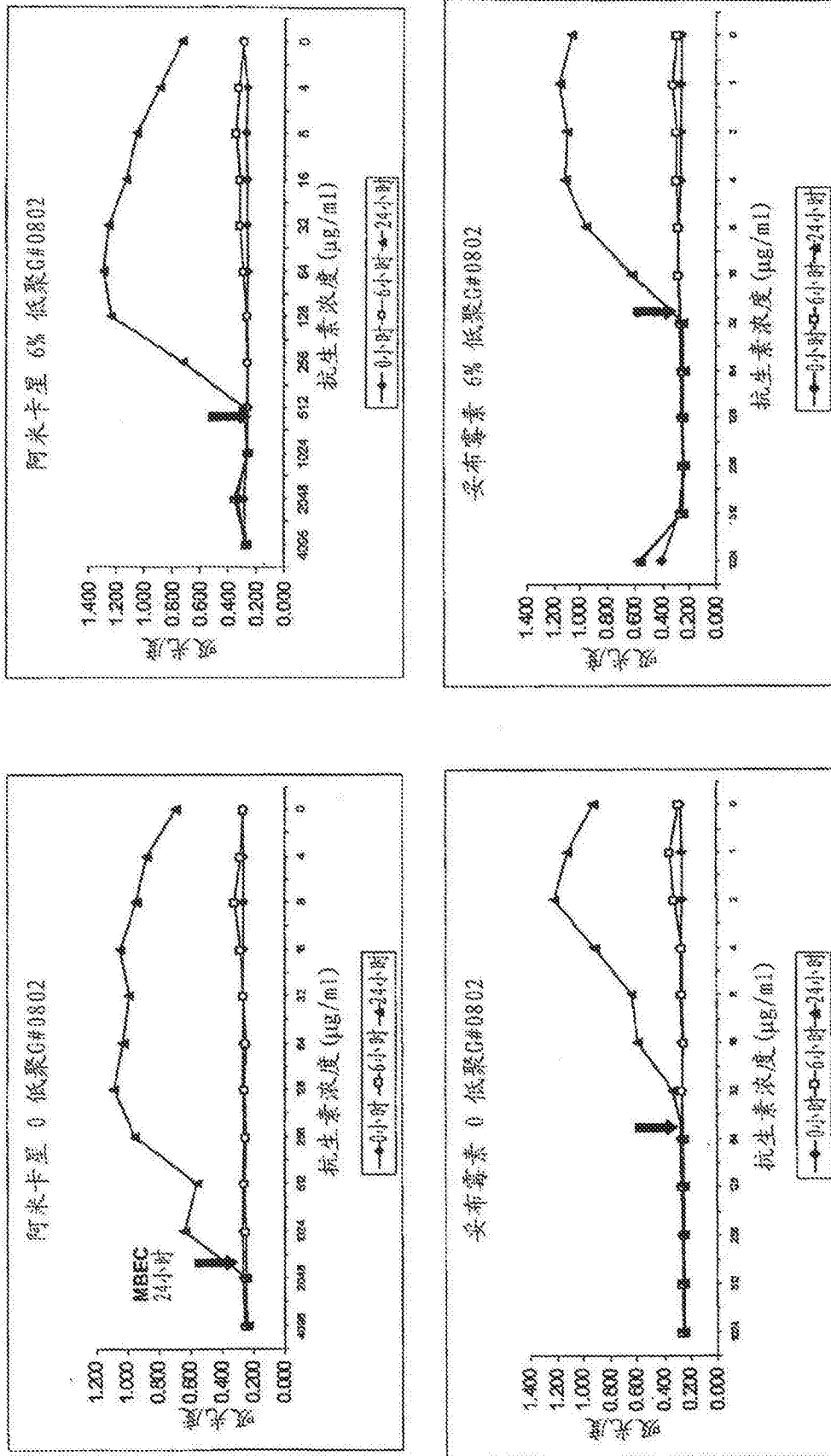


图6

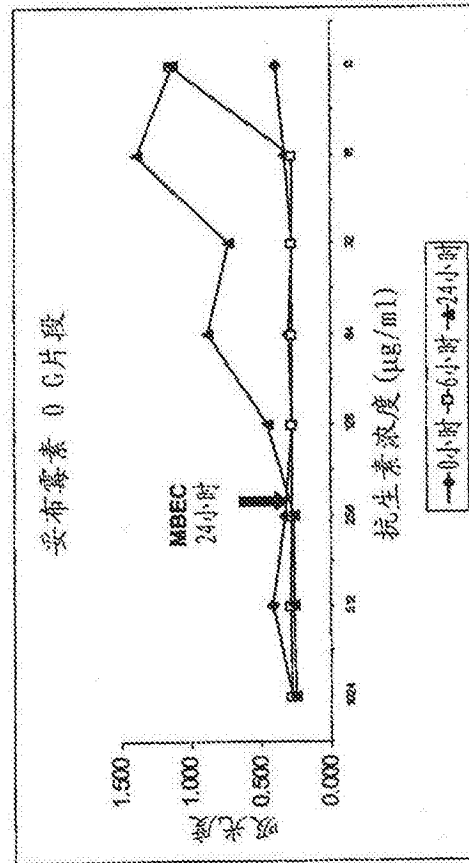
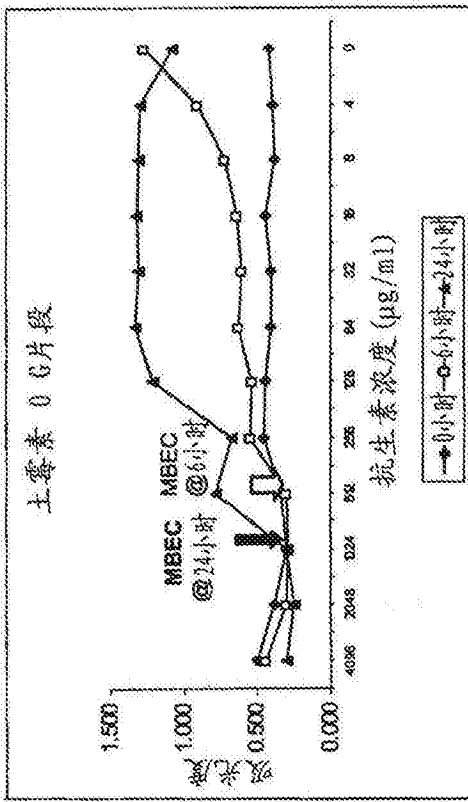
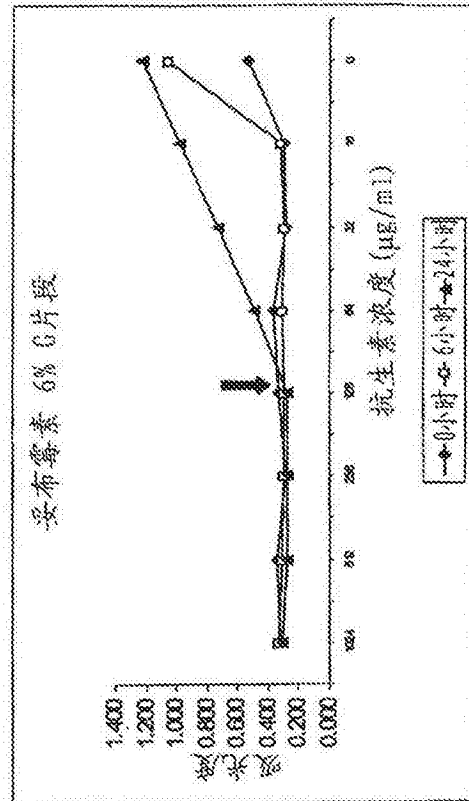
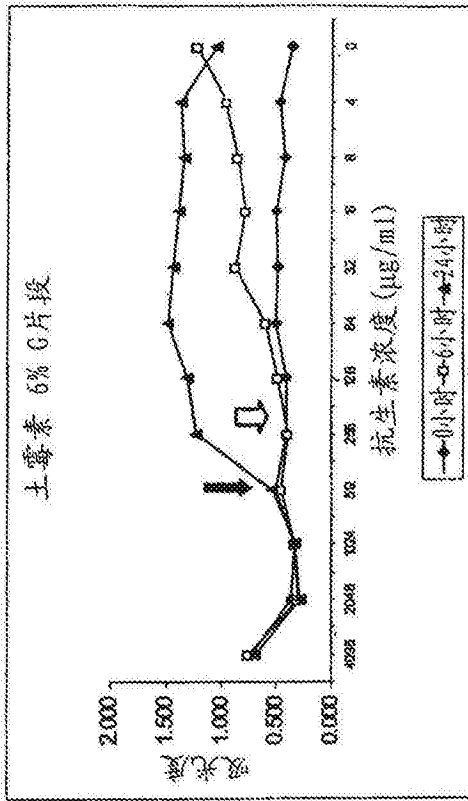


图7

图8

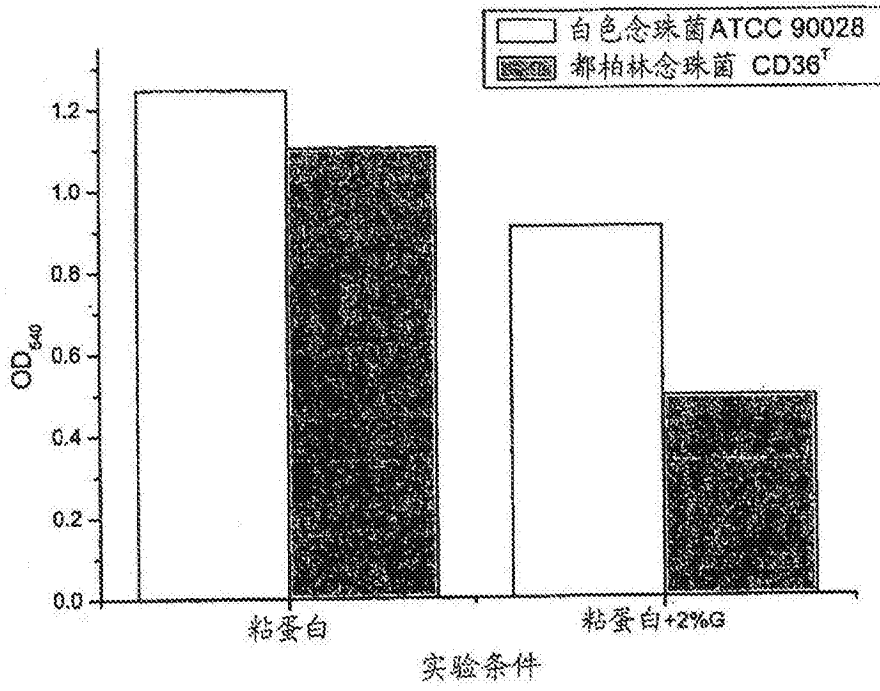


图9

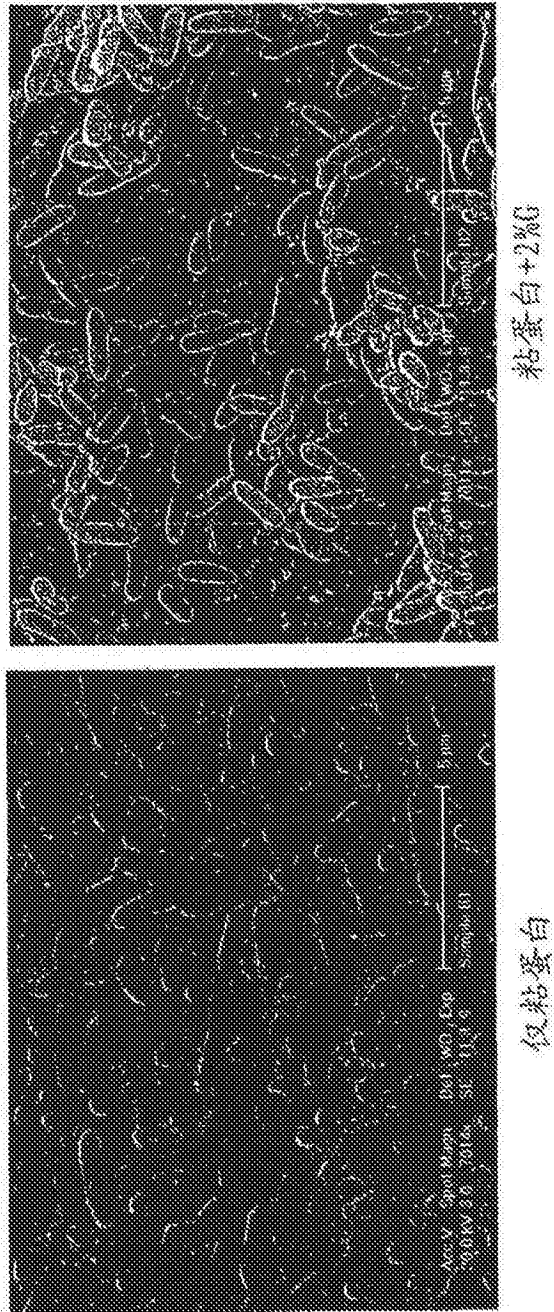


图10