

## 国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

请按照“注意事项”正确填写本表各栏。

此框内容由国家知识产权局填写

<b>⑤</b> 专利代理机构案卷号	TPD00855A	<b>①</b> 国家申请号				
<b>⑥</b> 国际申请号	PCT/RU2018/000346					
<b>⑦</b> 国际申请日	2018-05-29	<b>②</b> 递交日				
<b>⑧</b> 优先权日	2017-06-08					
<b>⑨</b> 国际公布号	W02018/226119	<b>③</b> 费减审批				
<b>⑩</b> 国际公布日	2018-12-13					
<b>⑪</b> 国际公布语言	英语	<b>④</b> 挂号号码				
<b>⑫</b> 发明名称	用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法					
<b>⑬</b> 发明人	发明人 1	S·I·切尔内什 <input type="checkbox"/> 不公布姓名				
	发明人 2	N·A·戈迪亚 <input type="checkbox"/> 不公布姓名				
<b>⑭</b> 第一发明人	国籍 俄罗斯联邦	居民身份证件号码				
<b>⑮</b> 申 请 人	申 请 人 (1)	姓名或名称: S·I·切尔内什	用户代码	申请人类型 个人		
		居民身份证件号码或统一社会信用代码/组织机构代码		电子邮箱		
		<input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案				
		国籍或注册国家(地区)	俄罗斯联邦	经常居所地或营业所所在地 俄罗斯联邦		
		省、自治区、直辖市				
		市县				
		详细地址 俄罗斯联邦圣彼得堡				
	邮政编码		电话			
	申 请 人 (2)	姓名或名称:	用户代码	申请人类型		
		居民身份证件号码或统一社会信用代码/组织机构代码		<input type="checkbox"/> 请求费减且已完成费减资格备案		
		国籍或注册国家(地区)		经常居所地或营业所所在地		
		省、自治区、直辖市				
		市县				
		详细地址				
邮政编码		电话				
<b>⑯</b> 联 系 人	姓 名		电 话			
	省、自治区、直辖市					
	市县					
	详细地址					
	邮政编码		电子邮箱			

## 国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

<b>⑰ 代表人</b>		为非第一署名申请人时声明		特声明第	署名申请人为代表人	
<b>⑱ 专利代理机构</b>	<input type="checkbox"/> 声明已经与申请人签订了专利代理委托书且本表中的信息与委托书中相应信息一致					
	名称北京唐颂永信知识产权代理有限公司			机构代码11755		
	代理人 (1)	姓名刘伟		代理人 (2)	姓名	
		执业证号1175508136.0			执业证号	
	电话010-62167650			电话		
<b>⑲ 提前处理</b>						
<input checked="" type="checkbox"/> 自优先权日起 30 个月的期限尚未届满，请求国家知识产权局根据专利法实施细则第 111 条提前处理和审查本国际申请。 <input type="checkbox"/> 本国际申请尚未国际公布，请求国家知识产权局作为指定局要求国际局传送国际申请文件副本。 <b>*自优先权日起 30 个月的期限尚未届满，申请人不要求提前处理本国际申请，请取消上述默认选项。</b>						
<b>⑳</b> <input type="checkbox"/> 提前公布 根据专利法第 34 条的规定，请求早日公布该专利申请。						
<b>㉑ 审查基础文本声明</b>						
<input checked="" type="checkbox"/> 以原始国际申请文件中的译文为审查基础 <input type="checkbox"/> 以下列申请文件为审查基础						
<input type="checkbox"/> 说明书	第	页，按原始国际申请文件的中文译文				
	第	页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文				
	第	页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 权利要求	第	项，按原始国际申请文件的中文译文				
	第	项，按专利合作条约第 19 条修改的中文译文				
	第	项，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文				
	第	项，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 附图	第	页，按原始国际申请文件的中文译文				
	第	页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件的中文译文				
	第	页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<input type="checkbox"/> 核苷酸和/或氨基酸序列表	第	页，按原始国际申请文件				
	第	页，按专利性国际初步报告（PCT 第二章）附件				
	第	页，按专利合作条约第 28/41 条提出的修改				
<b>㉒ 要求优先权声明</b>	序号	原受理机构名称		在先申请日	在先申请号	<b>㉓ 关于遗传资源的说明</b> <input type="checkbox"/> 本国际申请涉及的发明创造是依赖于遗传资源完成的
	1	俄罗斯联邦		2017-06-08	2017120258	
	2					
	3					
	4					
	5					
	7					

## 国际申请进入中国国家阶段声明（发明）

8														
<p>②4 关于援引加入的说明</p> <p><input type="checkbox"/> 本国际申请在国际阶段含有援引加入项目或部分，提交的中文译文中未包含援引加入项目或部分。</p> <p><input type="checkbox"/> 本国际申请在国际阶段含有援引加入项目或部分，提交的中文译文中包含下列援引加入项目或部分，请求修改相对于中国的申请日：</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 说明书 第 _____ 页，国际阶段提交援引加入的时间为 _____ ；</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 权利要求 第 _____ 项，国际阶段提交援引加入的时间为 _____ ；</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 附图 第 _____ 页，国际阶段提交援引加入的时间为 _____ 。</p>														
<p>②5 生物材料样品保藏</p> <p><input type="checkbox"/> 本国际申请涉及的生物材料样品的保藏已在专利合作条约实施细则第 13 条之 2.4 规定的期限内以下列形式作出记载：</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">保藏编号</th> <th style="width: 15%;">保藏日期</th> <th style="width: 25%;">保藏单位代码</th> <th style="width: 25%;">说明书译文第_页_行 或 PCT/RO/134 表</th> <th style="width: 20%;">是否存活</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>					保藏编号	保藏日期	保藏单位代码	说明书译文第_页_行 或 PCT/RO/134 表	是否存活					
保藏编号	保藏日期	保藏单位代码	说明书译文第_页_行 或 PCT/RO/134 表	是否存活										
<p>②6 不丧失新颖性宽限期声明</p> <p><input type="checkbox"/> 已在中国政府主办或承认的国际展览会上首次展出，并在提出国际申请时作出过声明。</p> <p><input type="checkbox"/> 已在规定的学术会议或技术会议上首次发表，并在提出国际申请时作出过声明。</p>														
<p>②7 复查请求</p> <p><input type="checkbox"/> 申请人于 _____ 年 _____ 月 _____ 日收到下列通知：</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 受理局拒绝给予国际申请日 <input type="checkbox"/> 国际局按专利合作条约第 12 条（3）作出认定</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 受理局宣布申请被认为撤回</p> <p><input type="checkbox"/> 根据专利合作条约第 25 条特此向国家知识产权局提出复查请求，并且</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 已请求国际局将档案中有关文件传送国家知识产权局；</p> <p style="margin-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 已依照专利法实施细则第 103 条的规定办理进入中国国家阶段的手续。</p>														
<p>②8 申请文件清单</p> <p>1. 国际申请进入中国国家阶段声明（PCT） 共4页</p> <p>2. 说明书摘要 共0页</p> <p>3. 权利要求书 共0页</p> <p>4. 说明书 共0页</p> <p>5. 说明书核苷酸和氨基酸序列列表 共5页</p> <p>权利要求的项数 15 项</p>		<p>②9 附加文件清单</p> <p>1. 核苷酸或氨基酸序列列表计算机可读载体 共0页</p> <p>2. 实质审查请求书 共1页</p> <p>3. 专利代理委托书（中英文） 共2页</p> <p>证明文件备案编号 _____</p>												
<p>③0 申请人或专利代理机构签章</p> <p>北京唐颂永信知识产权代理有限公司</p> <p style="text-align: right;">2020年02月06日</p>		<p>③1 国家知识产权局审核意见</p> <p style="text-align: right;">_____ 年 _____ 月 _____ 日</p>												

## 附页

### 【发明人】

发明人 3	A·Y·雅科夫列夫	<input type="checkbox"/> 不公布姓名
-------	-----------	--------------------------------

# 实 质 审 查 请 求 书

请按照“注意事项”正确填写本表各栏

本框由国家知识产权局填写

① 专 利 申 请	申请号 PCT/RU2018/000346  发明创造名称 用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法  申请人 (*应当填写第一署名申请人) S· I· 切尔内什	递交日  申请号条码  挂号条码
②请求内容:  根据专利法第 35 条的规定, 请求对上述专利申请进行实质审查。		
③放弃主动修改权利 <input type="checkbox"/> 申请人声明, 放弃专利法实施细则第 51 条规定的主动修改的权利。		④请求延迟审查 <input type="checkbox"/> 请求对本申请延迟审查, 延迟期限为 1 年。 <input type="checkbox"/> 请求对本申请延迟审查, 延迟期限为 2 年。 <input type="checkbox"/> 请求对本申请延迟审查, 延迟期限为 3 年。
⑤附件清单          		
⑥备注 <input checked="" type="checkbox"/> 该申请为 PCT 国际申请, 实质审查费不予减免 <input type="checkbox"/> 该申请为 PCT 国际申请, 已由欧洲专利局、日本专利局、瑞典专利局作出国际检索报告, 实质审查费减免 20% <input type="checkbox"/> 该申请为 PCT 国际申请, 已由中国作出国际检索报告及专利性国际初步报告, 实质审查费减免 100% <input type="checkbox"/>		
⑦申请人或专利代理机构签字或者盖章  北京唐颂永信知识产权代理有限公司    2020年02月06日		⑧国家知识产权局处理意见          年 月 日

## 专 利 代 理 委 托 书 （ 中 英 文 ）

请按照“注意事项”正确填写本表各栏

专 利 申 请	国家申请号/国际申请号：PCT/RU2018/000346		
	发明创造名称：用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法		
委 托 人	序号	中文姓名或名称	英文姓名或名称
	1	S·I·切尔内什	CHERNYSH, Sergej Ivanovich
被 委 托 专 利 代 理 机 构	代理机构代码	11755	
	代理机构名称	北京唐颂永信知识产权代理有限公司	
	代理人 1	刘伟	
	代理人 2		
委托事项： <input checked="" type="checkbox"/> 根据专利法第 19 条的规定，委托上述专利代理机构代为办理在中华人民共和国申请专利以及在专利权有效期内的全部专利事宜。			
声明： <input checked="" type="checkbox"/> 填写的专利代理委托信息与专利代理委托书（中英文）扫描文件是一致的。			

# 专利代理委托书 (中英文)

【此处插入专利代理委托书扫描文件】


【图片描述】 专利代理委托书


**专利代理委托书**  
**POWER OF ATTORNEY**

我是俄罗斯联邦的公民, 根据中华人民共和国专利法第 19 条的规定, 兹委托北京唐颂永信知识产权代理有限公司 (机构代码 **11755**), 并由该机构指定其专利代理人刘伟代为办理名称为 用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法, 申请号 (或专利号) / 国际申请号为 PCT/RU2018/000346 的专利申请在中华人民共和国的全部事宜。

Pursuant to the Article 19 of the Patent Law of the People's Republic of China, I, citizen of RU hereby authorize BEIJING TANGSONG IP FIRM (Code: 11755) to appoint its patent attorney(s) LIU Wei to handle all patent affairs related to the application with title as METHOD FOR DISRUPTING BACTERIAL BIOFILMS AND PREVENTING BACTERIAL BIOFILM FORMATION USING A COMPLEX OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF INSECTS and application number(or patent number)/international application number as PCT/RU2018/000346 in the PRC.

委托人姓名或名称 S·I·切尔内什  
Authorized by (Name) CHERNYSH, Sergej Ivanovich

委托人签字或盖章  
Signature 

被委托专利代理机构盖章  
Seal of the Instructed CN Patent Agency 

委托日期  
Date of Authorization 14.06.2020

100021  
2010.2

## 说明书摘要

---

本发明涉及医学、卫生、美容和兽医领域，可用于防止细菌生物膜形成并破坏由多种病原性和条件致病性细菌在生物体的皮肤和其他表面、植入物和医疗装置表面上形成的生物膜。本发明的优选应用领域是防止形成对抗生素和抗菌作用有抗性的生物膜，并破坏那些生物膜。本发明基于用样品处理感染的表面，该样品包含红头丽蝇 (*Calliphora vicina*) (双翅目，丽蝇科) 或双翅目中住区食腐动物其他物种，特别是黑颊丽蝇 (*C. vomitoria*)、丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*)、家蝇 (*Musca domestica*)、亮斑扁角水虻 (*Hermetia illucens*) 的抗菌肽，与抗生素或抗菌剂联用的复合物。为此目的使用的抗生素或抗菌剂选自：氨基糖苷类、 $\beta$ -内酰胺类、糖肽类、大环内酯类、林可酰胺类、氟喹诺酮类、胺酰醇类 (amphenicoles) 和四环素类或季铵盐类，或与抗菌肽的复合物具有协同或累加作用的其他抗菌物质。该新方法可以：减少破坏生物膜和防止生物膜形成所需的抗生素或抗菌剂浓度；减少细菌感染化疗的不良后果；扩展了适用于治疗生物膜感染、用于消毒植入物、出于卫生目的以及从全身性施用抗生素改变为将抗生素直接局部施用于感染性病灶的一系列抗生素。



## 权 利 要 求 书

---

1. 一种破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法，所述方法包括使细菌与昆虫抗菌肽和抗生素或抗菌剂联用的复合物接触的步骤，所述肽包括防御素、天蚕素、双翅抗菌肽和富含脯氨酸的肽。

5       2. 根据权利要求1所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物是由来自丽蝇科(*Calliphoridae*)、蝇科(*Moscidae*)和水虻科(*Stratiomyidae*)的双翅目的昆虫产生的。

3. 根据权利要求2所述的方法，其中来自双翅目的昆虫属于红头丽蝇(*Calliphora vicina*)、丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)、家蝇(*Musca domestica*)或亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens*)。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物包括氨基酸序列 SEQ ID No.1-11 或与限定这些肽的抗菌活性的同源结构域具有至少80%同一性的其变体。

5. 根据权利要求1所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物是通过化学或基因工程合成的氨基酸序列 SEQ ID No.1-11 或与限定这些肽的抗菌活性的同源结构域具有至少80%同一性的其变体而产生的。

6. 根据权利要求1所述的方法，其中所述抗生素或抗菌剂由以下一种或多种的组合代表：氨基糖苷类、 $\beta$ -内酰胺类、糖肽类、大环内酯类、林可酰胺类、氟喹诺酮类、胺酰醇类和四环素类或季铵盐类。

7. 根据权利要求6所述的方法，其中所述抗生素或抗菌剂选自与昆虫抗菌肽的复合物组合并且在破坏细菌生物膜或防止细菌生物膜形成的过程中具有协同或累加作用的化合物，所述肽包括防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽。

8. 根据权利要求1所述的方法，包括使昆虫抗菌肽的复合物与皮肤、粘膜、伤口表面、糜烂或溃疡表面的细菌接触的步骤，所述肽包括防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽。

9. 根据权利要求1所述的方法，包括使昆虫抗菌肽的复合物与医疗装置、导管或植入物的表面的细菌接触的步骤，所述肽包括防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中将所述抗生素或抗菌剂施加在经昆虫的防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物处理的皮肤、伤口表面、糜烂或溃疡表面。

5 11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中将所述抗生素经肠胃外、口服、经皮、经粘膜、吸入或以气雾剂形式施用于生物体。

12. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述生物膜由以下细菌形成：金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

10 13. 根据权利要求 1 所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物是设计用于治疗细菌感染的药物组合物的一部分。

15 14. 根据权利要求 1 所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物是设计施加在皮肤、粘膜、伤口表面、糜烂或溃疡表面的医疗装置的一部分。

15 15. 根据权利要求 1 所述的方法，其中防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽的复合物是用于皮肤护理的化妆品一部分。

# 说明书

## 用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法

5 本发明涉及医学，卫生，美容和兽医学领域，并可用于破坏由在皮肤和其他生物体表面，医疗产品表面，植入物和导管上的多种细菌形成的致病生物膜。

多种对细菌有毒的属于不同有机化合物类别( $\beta$ -内酰胺类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺酰胺类、酰胺基糖苷类、咪唑类、  
10 肽类化合物、季铵盐等)的抗生素和抗菌剂被用于医学和兽医学。目前已知的大多数抗生素和抗菌剂在浮游生物(独立生存)细菌形式的情况下都是有效的。当形成生物膜(被基质包围并且粘附在宿主生物或无生命物体的外部或内部表面的一个多细胞细菌群落)时，细菌获得对抗生素和抗菌剂的抗性[1, 2]，并且变得无法被免疫系统细胞破坏[3]。因此，  
15 治疗和预防由生物膜促进的疾病非常困难[4, 5]。众所周知，生物膜引起约 80% 的人类细菌感染[6]，以及多种炎症性疾病和与之相关的自身免疫和肿瘤性疾病、心血管系统损害。结果，生物膜成为全世界疾病发病率和死亡率的主要原因之一。生物膜对外部作用的高抵抗力产生了消毒医疗产品、支持个人和专业卫生、治疗农场动物和宠物的问题。  
20 因此，开发破坏细菌生物膜的方法是现代医学、兽医和相关卫生服务领域中最相关的问题之一。

天然和合成抗菌肽的使用被认为是解决这一问题的高级趋势之一 [6-9]。但是，该想法的实际实现遇到了相当大的困难，这些困难涉及对这些肽使用中的低效率、高成本，在细菌中对人和动物内源性抗菌  
25 肽产生交叉耐药性的风险，以及许多其他问题[10-12]。为了提高治疗效率，有人提出创建抗菌肽和常规抗生素的组合，其中所述肽和抗生素的组合对生物膜显示出协同作用。特别是，有人提出将合成抗菌肽与多种抗生素组合使用以治疗细菌生物膜引起的感染[13]。出于相同的  
30 目的，建议噬菌体赖氨酸蛋白和抗生素结合使用[14]。这种破坏生物膜的方法(RU 2014149348 A, 05.09.2013, “Method for preventing,

disrupting and processing a biofilm with bacteriophage lysine (使用噬菌体赖氨酸预防、破坏和处理生物膜的方法) )是本申请要求保护的发明最接近的技术方案并被选为原型，其中蛋白质合成的肽(蛋白)产物被用作抗生素增效剂。需要强调的是，上述两项发明都使用了一种具有肽性质的单独化合物(合成肽[13]或天然蛋白[14])，而破坏生物膜的方法是将该化合物与某种抗生素结合使用。由于开发这种组合的技术复杂性和制造成本高，至今为止一直没有使用这种多组分的组合。同时，众所周知，多细胞动物遗传免疫的天然机制包括抗菌肽的复合聚集体。这提供了单个抗菌肽和抗生素所没有的多种关键优势，特别是防止了细菌耐药性的发展[16]。

本发明的技术问题在于开发一种使用抗菌肽和已知抗生素的天然复合物的协同作用或相继作用来破坏生物膜的方法。本发明的技术方案在于提高治疗由致病生物膜引起的人和动物疾病的效率。由于在抗菌肽复合物的作用下增加了生物膜对抗生素的敏感性，降低了抗生素的治疗有效浓度，从而降低了其对患者的毒性水平，因此获得了该结果。为了解决该问题，有人提出了使用由双翅目昆虫的培养物合成的抗菌肽的纯化的天然复合物。所获得的样品与选自对给定细菌种类有毒的抗生素或抗菌剂中的抗菌手段(或抗菌手段的组合)协同或相继使用。因此，当在给定物种的生物膜上进行体外测试时，优选与抗菌肽复合物一起显示出协同作用的抗菌手段。

### 要求保护的发明的实质

已知有两种基本形式对大多数细菌具有特异性：浮游生物形式(提供宿主生物体感染的独立生存细胞)和生物膜(浸入由这些微生物释放的基质中的一种或多种微生物的多细胞群落，所述群落附着在多种表面上)。作为生物膜的一部分，细菌菌落可以在宿主生物体中无限期地持续存在，并在必要时形成浮游生物细胞并将感染从原发部位传播出去[1-5]。

治疗细菌感染(包括生物膜)的主要手段是抗生素。但是，如上所述，与同一菌株的浮游生物形式相比，大多数抗生素针对生物膜的活动性低或为零。对抗生素具有遗传抗性的菌株广泛传播，甚至极大程度

地限制了治疗生物膜感染的可能性。为了解决该问题，在文献中提出了抗菌肽作为增效剂，以增强抗生素的抗生物膜活性[6-9, 13,14]。目前对协同作用的估计(“棋盘格方法”)主要用于开发二元组合物(1种肽+ 1种抗生素)。这从本质上限制了目前可用于破坏细菌生物膜的方法的可能性。特别地，这样的组合具有窄谱的治疗活性。因此，使用噬菌体赖氨酸[14]仅适用于由金黄色葡萄球菌类型的革兰氏阳性细菌形成的生物膜，而对革兰氏阴性细菌无效。

与已知方法一样，本申请要求保护的破坏生物膜的方法是基于抗菌肽和抗生素协同作用的用法。主要区别在于建议将双翅目昆虫的抗菌肽纯化复合物用作抗生素增效剂，而不是单独的抗菌肽(例如合成阳离子肽[13]或噬菌体赖氨酸[14])。该想法是基于本发明的作者在昆虫，尤其是丽蝇幼虫红头丽蝇(*Calliphora vicina*)的免疫学领域的研究。作者已经指出，这种类型的幼虫响应细菌污染，同时合成并在血淋巴中积聚抗菌肽的复合物，所述抗菌肽包括防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽 [15, 16]。这些肽中的某些选择性地破坏了革兰氏阳性(防御素)和革兰氏阴性(双翅杀菌肽、天蚕素)细菌的细胞壁，另一些则干扰了细菌细胞中蛋白质和 RNA 的合成(富含脯氨酸的肽)。这四个类别对于双翅目昆虫的免疫系统都是典型的[15]。因此，如实施例 1 和 2 中给出的实时测试结果所示，从多种物种获得的抗菌肽的复合物可以用于体现本申请要求保护的发明。除了红头丽蝇外，为此目的，可使用的种类包括黑颊丽蝇(*C. vomitoria*)、丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)、叉叶绿蝇(*L. Caesar*)(双翅目丽蝇科)、家蝇(*Musca domestica*)(双翅目蝇科)、亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens*)(双翅目水虻科)。如红头丽蝇那样，这些物种具有独特的特征，即它们全部都属于住区食腐动物双翅类昆虫，其生活在最大限度地充满人类、农场动物和宠物致病微生物菌群的环境中。因此，就该种类的微生物菌群而言，住区食腐动物的抗菌复合物表现出高活性[15-16]。红头丽蝇和其他上面列出的双翅目食腐昆虫的生态学特征，使其可以在工业规模上以廉价的饲喂基质进行培养，这使得本申请要求保护的抗菌复合物的生物合成在技术上和经济上都可以实现。

如红头丽蝇所示例的昆虫抗菌肽复合物的独特特征，是其组合物的复杂性。实施例 3 中总结的所进行的研究的结果表明，在该复合物的组合物中存在不少于 11 种参与该昆虫的免疫应答的抗菌肽。该事实导致红头丽蝇和双翅目的近似物种对于实现本申请要求保护的破坏生物膜和防止生物膜形成的方法特别有利。然而，天然免疫机制的进化保守性，允许假设其他生物体的抗菌肽复合物也可以用于实现本申请要求保护的方法。

众所周知，红头丽蝇的抗菌肽复合物能够破坏由多种细菌形成的生物膜，但这需要产生高浓度的复合物(1.5-7.6 g/l，取决于细菌种类)[18]。这一事实从本质上限制了将该复合物用于医学和其他领域的可能性。从理论上讲，可以通过将抗菌肽的天然复合物和抗生素或抗菌剂结合在一起形成协同剂对(synergist pair)来消除这种局限性。但是，该假设没有在文献中考虑，也没有经过实验研究。分别地，基于将双翅目昆虫的抗菌肽复合物与其他抗菌手段结合使用来破坏细菌生物膜的方法是未知的。该问题是本发明的作者第一次提出并解决。在特定的实施方案中给出了相应实验研究的结果。

考虑到这一目标，作者研究了红头丽蝇抗菌肽的复合物(CAMP)与来自氨基糖苷类、 $\beta$ -内酰胺类、糖肽类、大环内酯类、林可酰胺类、氟喹诺酮类、胺酰醇类(amphenicoles)和四环素类的抗生素，以及来自西曲铵类(季铵盐类)的抗菌剂联用的抗生物膜活性。实验的详细描述在实施例 4-5 中给出。研究的主要技术是分析体外系统中多种抗菌手段的相互作用，该分析被广泛用于进行类似研究(“棋盘格”技术)。对抗生素具有抗性的生物膜被用作生物学模型，该生物膜是由细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)形成。这些细菌形成的生物膜会引起大多数临床上重要的细菌感染。表 1 总结了显示抗菌肽复合物对抗生素和抗菌剂的抗生物膜活性影响的数据。MBIC<sub>90</sub> 值(标准 TTC 测试中，抑制 90%代谢活性的抗生素浓度)为抗生物膜活性的定量标准。

在所研究的 20 种具有不同类别抗菌手段的 CAMP 组合的变体中，

有 8 种组合表现出累加效应(FICI> 0.5), 有 11 种组合表现出协同效应(FICI<0.5)。仅在一种情况下(大肠杆菌生物膜上的多粘菌素 B), 未显示出抗生素效力增强作用。两种类型的相互作用都允许破坏生物膜并降低抗生素的治疗有效浓度。实验研究获得的结果明显表明、证明并证实了用于破坏生物膜的本申请要求保护的方法的独立权利要求 1 的 14 个从属权利要求。应根据生物膜的类型提取本发明的几个最先进的实施方案。

因此, 金黄色葡萄球菌的生物膜对  $\beta$ -内酰胺美罗培南、阿米卡星和卡那霉素的氨基糖苷类药物(MBIC<sub>90</sub>> 500  $\mu$ g/ml)、林可酰胺克林霉素(MBIC<sub>90</sub>> 250  $\mu$ g/ml)的作用绝对不敏感。那些抗生素在 CAMP 存在下表现出高的抗生物膜活性(分别为 MBIC<sub>90</sub>< 0.1、1.5、3 和 12  $\mu$ g/ml)。因此, 本申请要求保护的发明允许使用那些抗生素来治疗最广泛的细菌感染组, 即金黄色葡萄球菌的生物膜。在被特别危险的耐甲氧西林(MRSA)和耐万古霉素(VRSA)的金黄色葡萄球菌污染的情况下, 扩大治疗这类感染的抗生素范围尤其重要。根据获得的数据, 在 VRSA 感染的情况下, CAMP +氨基糖苷的组合有望破坏 MRSA 的生物膜, 还有 CAMP + 林可酰胺类。

在研究中使用的某些抗生素对金黄色葡萄球菌的浮游生物细胞有毒性, 当以较高的浓度使用时, 对于该物种的生物膜也保持活性。在这一组中, 应该特别提及万古霉素和氨苄青霉素, 它们的 CAMP 充当强大的增效剂并可将抑制金黄色葡萄球菌生物膜的浓度从 38-24 降至 1  $\mu$ g/l 以下。使用 CAMP 与那些抗生素的组合抑制金黄色葡萄球菌生物膜的便利性似乎很明显。应该注意的是, 较低的放大系数值(C<sub>a</sub><10)可以大大改善对金黄色葡萄球菌生物膜感染的治疗。

因此, 像其他抗菌剂一样, 用于消毒伤口表面的苯扎氯铵抗菌剂显示出高毒性。在保持抗生物膜活性的同时将其浓度降低 8 倍的可能性, 允许降低其对伤口周围组织的毒性作用, 从而改善伤口感染治疗方案。

由另一种广泛的病原体肠杆菌大肠杆菌形成的生物膜对所有研究的抗生素表现出相对的敏感性(尽管与该细菌的浮游生物细胞相比有

所降低)。在这些情况下，其与 CAMP 的组合可为所有研究的抗生素提供增强作用。但是，应注意 CAMP 与美罗培南和头孢噻肟这种  $\beta$ -内酰胺类的协同作用水平特别高(有效浓度分别降低 187 倍和 62 倍以上)。根据该指数，CAMP 与美罗培南和其他  $\beta$ -内酰胺类的组合似乎特别有希望。CAMP 与美罗培南的组合还显示出对由其他广泛分布的病原体如铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌形成的生物膜的协同作用。

将 CAMP 与抗生素结合也可以提供另一个技术上重要的结果，即降低 CAMP 的有效浓度。从破坏金黄色葡萄球菌的生物膜的角度来看，将 CAMP 与阿米卡星(有效浓度降低 48 倍以上)以及万古霉素、卡那霉素和四环素(有效浓度降低 16 倍到超过 24 倍)联合使用展示了最好的结果。关于由其他研究细菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、鲍曼不动杆菌)形成的生物膜，根据细菌种类和抗生素类型，与多种类别的抗生素联合使用还可以将 CAMP 的有效浓度降低 2 倍到 43 倍以上。

除了破坏成熟的生物膜外，本申请要求保护的方法还提供了另一项技术上重要的结果，即去除了细菌的独立生存(浮游生物)细胞，并因此防止了这些细胞形成生物膜(实施例 6)。CAMP 和抗生素对浮游生物培养物的协同或累加作用，同时采取预防措施，可显著降低防止生物膜形成所必需的抗生素的治疗有效浓度，从而避免与施用大剂量抗生素有关的不良后果。

应当指出，抗菌肽和抗生素的复合物可以被包括在一种药物组合物中并同时被施加到生物膜表面上。取而代之的是，可以经肠胃外、口服或通过医学上接受的任何其他方法，将抗生素独立于包含抗菌肽复合物的样品而引入生物体，并确保抗生素与要被破坏的生物膜接触。

还可以通过将昆虫的抗菌肽复合物引入多种医疗装置(伤口和烧伤治疗覆盖物、导管、植入物等)的组合物中来破坏致病生物膜并防止其形成，从而实现本申请要求保护的方法。

此外，可以通过将昆虫的抗菌肽的复合物引入皮肤护理化妆品的组合物中以防止由生物膜形成引起的皮肤损害来实现本申请要求保护的方法。



同样明显的是，本申请要求保护的方法可以在兽医中用于治疗类似于人类疾病的动物细菌感染。

总体上，本申请要求保护的方法允许全面地显著扩大用于医学和相关领域治疗细菌感染的技术范围，并提高其效率。本申请要求保护的  
5 方法的主要优点在于：

1. 由于使用了抗菌肽的天然复合物，因此有可能产生多组分组合物。作为这种复合物，可以使用双翅目昆虫的抗菌肽组合，该组合包含四种不同类别的肽(防御素、天蚕素、双翅杀菌肽和富含脯氨酸的肽)，每种肽均由几种不同形式代表。现在已知的破坏生物膜的方法受  
10 到“一种肽加一种抗生素”方案的限制，该方案的特征是抗菌活性谱窄，在细菌中产生耐药性的风险增加。

2. 由于昆虫的抗菌肽复合物的增强(协同或累加)作用，有可能降低破坏生物膜所需的抗生素浓度。这样可以减少抗生素的治疗剂量，并因此降低了因施加抗生素而产生不良反应的风险。

3. 扩大了适用于破坏生物膜的抗生素的范围。特别是，科学研究的  
15 结果和具体的测试示例表明，在 CAMP 存在的情况下， $\beta$ -内酰胺类抗生素和氨基糖苷类表现出抗生物膜活性，现在认为这两种关键的抗生素对治疗生物膜感染收效甚微。这是个新的有希望的研究领域。

4. 改变抗生素的施用方式。目前，大多数抗生素通过肠胃外或口服施用全身使用。抗生素的局部施用受限于临床效率不足。在全身性施用中，为了在感染的病灶中产生所需的浓度，使用了大剂量的抗生素，这会导致患者的正常菌群死亡，并有引发其他不良事件(肾毒性、神经毒性、心脏毒性等)的风险。本申请要求保护的方法允许增加抗生素的效率，同时直接施用于感染的病灶(例如，通过施加在生物膜表面  
25 上)，因此在某些经实验证实的情况下可以消除其全身性施用的必要性。

5. 所研究的抗生素继而增强了昆虫的抗菌肽复合物的抗生物膜作用，从而允许降低其治疗有效浓度并扩大了可能的应用范围。

6. 目前，在实验上证明了 19 种 CAMP 和抗生素的组合是合理的，  
30 并证实了所获得的结果。从实践中可以肯定的是，在以后的科学和实

验研究中，此清单将从现在开始得到显著扩大。本申请要求保护的方法还允许改变 CAMP 和抗生素的治疗剂量和施用方式之间的平衡。

7. 总结所有上述情况，本申请要求保护的方法考虑到患者的特征和疾病的特征，能够实质上并急剧地扩大个性化治疗细菌感染的可能性。

通过下面给出的具体的示例性实施例来证实大量测试的结果。

### 实施例 1

**制备包含双翅目昆虫抗菌肽的精制复合物的样品，并分析其抗菌活性。**

产生样品的技术与先前描述的程序相对应[16]。为此目的，使用了来自双翅目的四种昆虫，包括来自丽蝇科红头丽蝇(*Calliphora vicina*)、黑颊丽蝇(*C. vomitoria*)和丝光绿蝇(*Lucilia sericata*)的三种丽蝇以及来自蝇科的家蝇(*Musca domestica*)。制备样品的步骤如下。通过  
15 将细菌细胞悬浮液引入体腔来免疫幼虫，并温育 24 小时。在那段时间结束后，通过表皮的切口从幼虫中收集血淋巴，并用于释放抗菌肽的复合物。为此目的，将收集的血淋巴用 0.1% 三氟乙酸(TFA)酸化，并通过离心除去不溶的沉淀物。将获得的上清液施加到具有用 0.05% TFA 预稳定的 C-18 吸附剂的柱子上(Waters, 35 CC SepPack 柱)，用  
20 0.05% TFA 洗涤并用 50% 乙腈/0.05% TFA 洗脱。将洗脱液冻干，并在该实施例和以下实施例中用作抗菌肽的纯化复合物。使用系列稀释技术确定复合物的抗菌活性[19]。在三个独立的测量中，浮游生物培养物大肠杆菌 774.1 的最小抑菌浓度(MIC)的平均值示于表 2。所有四种复合物均表现出所表达的抗菌活性。据此，在来自红头丽蝇的复合物  
25 中发现了最大的活性。该样品已被选择用于以下研究，作为本发明的最佳实施方案。

### 实施例 2

**亮斑扁角水虻(*Hermetia illucens*)样品的抗菌活性**

根据实施例 1 中描述的技术制备了包含来自亮斑扁角水虻的抗菌

肽复合物的样品。使用琼脂平板的方法确定复合物的抗菌活性[19]。为此目的，将 7.5 ml 带有琼脂糖(Invitrogen)的 Luria-Bertany 营养溶液(1%的细菌用胰蛋白胨，0.5%的酵母提取物，1%NaCl)嵌入无菌的培养皿中(直径 9 cm)。在固化之前，将  $2 \times 10^5$  个细胞的相应菌株的细菌浮游生物培养物(表 3)引入温暖的培养基中。将测试材料以 2  $\mu$ l 的体积施  
5 加到固化培养基的表面。将培养皿在+ 37°C 下温育 24 h，并测量细菌生长抑制区的直径。来自红头丽蝇的样品用作参考样品。表 3 中的数据表明，在给定实验的条件下，来自亮斑扁角水虻的样品不同于来自红头丽蝇的样品，对铜绿假单胞菌表现出活性。因此，来自亮斑扁角  
10 水虻的样品可以在治疗由给定细菌诱导的细菌感染方面具有优势。

### 实施例 3

#### 抗菌肽复合物的组成分析

根据实施例 1 中描述的技术生产包含来自红头丽蝇的抗菌肽复合物的样品。使用较早描述的技术，如液相色谱法、质谱法和转录组分析  
15 法研究抗菌肽的组合物[18]。已经确定了负责复合物抗菌活性的 11 种肽的结构(表 4)。其中，较早地表征了 5 个肽(Seq. ID No. 1、2、4、9、11)[18, 20]，而其他 6 个肽则属于科学新发现。此外，该组合物包括分子量 6773-6973 道尔顿的抗菌肽，其结构现在尚未被破解，并且可能  
20 其他小组分还具有抗菌活性。根据文献[21, 22]中接受的分类，来自红头丽蝇的活性组合属于四类昆虫抗菌肽：防御素(Seq. ID No. 1)、天蚕素(Seq. ID No. 2、3)、双翅杀菌肽(Seq. ID No. 4-8)和富含脯氨酸的肽(Seq. ID No. 9-11)。

### 实施例 4

#### 当与来自红头丽蝇的 CAMP 和多种抗生素接触时，致病细菌形成的生物膜被破坏。TTC 测试

在本研究中，使用了菌株大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 203、铜绿假单胞菌 ATCC 27583、肺炎克雷伯氏菌 145、鲍曼不动杆  
30 菌 28，这些菌株具有增强的形成生物膜的能力[18]。生产该生物膜的

技术与该出版物中描述的技术相对应。生物膜在 96 孔微孔板中产生。用细胞浓度为  $5 \times 10^5$  CFU / ml 的细菌悬浮液填充孔，并将该悬浮液在 37°C 下温育 24 h。LB 营养液(Invitrogen)用作阴性对照。根据实施例 1 中描述的方案来制备红头丽蝇 CAMP 样品。使用改良的交叉滴定技术

5 研究红头丽蝇 CAMP 与抗生素的组合在生物膜上的相互作用。为此目的，将微孔板中的 24 小时生物膜用 200 $\mu$ l 的 PBS 溶液洗涤 3 次并干燥。在另一个 96 孔微孔板中制备红头丽蝇 CAMP 和抗生素的组合，方法是将样品的两倍稀释液置于水平行的孔中，并将抗生素的两倍稀释液置于垂直行的孔中。此外，将来自该微板每个孔的 100 $\mu$ l 内容物转移

10 至带有生物膜的微板上，并在 37°C 下温育 24 h。通过用氯化四唑(TTC) 对其进行染色来评价生物膜的形成。为此目的，将 11  $\mu$ l 的 0.2% TTC 溶液添加到所述板的所有孔中。在 37°C 下温育 1 h 后，使用酶标仪 Epoch (BioTek)的读数器测量 OD<sub>540</sub>。没有经历过抗菌化合物的 48 h 生物膜的 OD<sub>540</sub> 值作为对照。所有实验均进行两次重复。生物膜的最小

15 抑制浓度(MBIC)被评估为 MBIC<sub>90</sub>，即抑制 90% 细胞活力的样品浓度。根据以下表达式确定组合中每种序列的部分抑制浓度指数(FICI): FICI = FICA + FICB，其中 FICA 等于抗生素 A 与另一种抗生素组合的最小抑制浓度(MIC)除以单独使用抗生素 A 的 MIC，而 FICB 等于将抗生素 B 与另一种抗生素组合的最小抑制浓度(MIC)除以单独使用抗生素

20 B 的 MIC。FICI 的解释如下: FICI <0.5 时的协同作用，FICI >0.5  $\leq$  1 时的累加效应，FICI > 1  $\leq$  4 时无相互作用，FICI > 4 时有拮抗作用。已使用 TTC 测试研究了总共 1470 种 CAMP 和抗生素组合的抗生物膜活性。

结果总结在表 5 中。金黄色葡萄球菌的实验表明，与 CAMP 的组

25 合对氨基糖苷类(阿米卡星和卡那霉素)、 $\beta$ -内酰胺类(氨苄青霉素和美罗培南)、糖肽万古霉素、大环内酯红霉素、林可酰胺克林霉素、氟霉素的抗生物膜活性具有明显的协同作用。CAMP 对苯唑西林和诸如苯扎氯铵的抗菌剂的效力产生累加作用。因此，CAMP 在金黄色葡萄球菌的生物膜上增强了所有研究的抗生素和抗菌剂的作用。在大肠杆菌

30 的实验中已经确定 CAMP 发挥了作用: 美罗培南和头孢噻肟对这种生

物膜的破坏具有协同作用，对庆大霉素、环丙沙星、氯霉素和四环素的功效具有累加作用。还已经确定，当破坏铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌形成的生物膜时，CAMP 显示出与美罗培南的协同作用，以及对肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)的累加作用。在所有研究的 9 种不同类型的 15 种抗生素和抗菌剂中，CAMP 仅在多粘菌素 B 的效率上没有发挥增强作用。

因此，CAMP 实际上是增强抗生素的抗生物膜活性的通用手段。考虑到生物膜的类型，减少抗生素治疗剂量的阈值和/或改变将其施用于感染病灶的方法，可以以多种组合实现本申请要求保护的用 CAMP 和抗生素的组合破坏生物膜的方法。

### 实施例 5

**当与来自红头丽蝇的 CAMP 和多种抗生素接触时，致病细菌形成的生物膜被破坏。 CV 测试**

在此实施例中，使用了另一种分析抗生物膜活性的技术—结晶紫对生物膜染色(CV 测试)，研究了红头丽蝇 CAMP 与抗生素之间的相互作用。分析技术对应于先前描述的一种技术[18]。与 TTC 测试根据细胞代谢活性降低的水平评价效果不同，CV 测试允许根据生物膜结合的着色剂的数量评估生物膜破坏的程度(厚度)。CAMP、抗生素或其多种组合的最小抑制浓度用作效率标准，与对照(BIC<sub>90</sub>)相比，该浓度将结合的 CV 量降低了 90%。将在 96 孔板孔中培养 24 h 的生物膜用 200 $\mu$ l 无菌 PBS 溶液洗涤 3 次，并在空气中干燥。通过将 CAMP 和抗生素在 PBS 中进行两次稀释来制备无菌系列，分别在每个孔中加入 100 $\mu$ l 的每种浓度，并将所述板在 37 $^{\circ}$ C 下温育 24 h。然后，除去培养基残留物，并将所述孔用 200 $\mu$ l 的 PBS 洗涤 3 次，在空气中干燥，并在 2 min 内用 0.1% 的 CV 水溶液(Lenreaktiv, 俄罗斯)染色。将染色的生物膜用 200 $\mu$ l 的 PBS 洗涤 3 次，在空气中干燥，然后在 1 h 内用 200 $\mu$ l 95% 的乙醇稀释着色剂。然后，在仪器 Epoch 读数器(BioTek)上在 570nm 波长测量由生物膜结合的着色剂溶液的光密度。每次测量均进行两次独立的重复。

获得的数据总结在表 6 中。如在 TTC 测试中(表 5), 与 CAMP 的组合增强了针对所有研究菌株的生物膜的抗生素活性。因此, 在 8 例中增强了协同作用, 在 2 例中增加了累加作用。在所有测试实施例中, TTC 和 CV 测试中揭示的相互作用类型的评价都一致。因此, CV 测试的数据证实了基于 TTC 测试结果得出的结论, 即 CAMP 是增强抗生  
5 生素的抗生物膜活性的通用手段。TTC 和 CV 测试结果的比较还表明, 本申请要求保护的破坏生物膜的方法同时提供细菌细胞的去除和破坏包括基质的生物膜成分。最后一个事实证明了所提出的方法的另一个重要优点—加速去除细菌代谢产物的可能性, 并因此减少了伴随生物  
10 膜感染的炎症和过敏反应。

## 实施例 6

### *防止细菌的浮游生物形式与红头丽蝇 CAMP 和多种抗生素的接触时生物膜的生长*

15 生物膜是由存在于生物或非生物物体表面的独立生存(浮游生物)细菌细胞形成的。感染病灶中浮游生物细胞的去除是防止生物膜形成的最可靠方法。目前, 为此目的使用了抗生素和抗菌剂。在该实施例中讨论的实验目的是确定来自红头丽蝇的 AMPV 与抗生素和抗菌剂组合施用对致病细菌的浮游生物细胞的杀菌作用。在这些实验中, 使  
20 用了大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 203、铜绿假单胞菌 ATCC 27583、肺炎克雷伯氏菌 145、鲍曼不动杆菌 28 的菌株, 它们均具有形成生物膜的能力[18]。浮游生物培养物是通过在 37° C 下于液体 LB 营养液(Invitrogen)中温育细胞过夜来产生的。使用交叉滴定技术研究浮游生物培养物中红头丽蝇的 CAMP 与抗生素组合之间的相互作用。  
25 为此目的, 在 96 孔微孔板中的 50  $\mu$ l 液体营养液中制备红头丽蝇 CAMP 和抗生素的组合, 将样品的两倍稀释液置于水平行的孔中, 然后将两个将抗生素的两倍稀释液放置在垂直行的孔中。此外, 将 50  $\mu$ l 细胞浓度为 10<sup>6</sup> CFU/ml 的细菌悬浮液与样品一起引入每个孔中, 并将所述板在 37°C 下温育 24 h。通过用氯化四唑(TTC)对其进行染色来评价细胞  
30 的生长。为此目的, 将 11  $\mu$ l 的 0.2% TTC 溶液添加到所述板的所有孔

中。在 37°C 下温育 1 h 后，使用酶标仪 Epoch(BioTek)的读数器测量 OD<sub>540</sub>。没有经历过抗菌化合物的 48 h 悬浮培养物的 OD<sub>540</sub> 值作为对照。所有实验均进行两次重复。浮游生物培养物的最小抑菌浓度(MIC)评价为 MIC<sub>90</sub>，即抑制 90% 细胞活力的样品浓度。

5 结果总结在表 7 中。金黄色葡萄球菌的实验表明，与 CAMP 的组合对氯霉素和四环素的抗生素活性具有明显的协同作用。CAMP 对阿米卡星、卡那霉素、氨基青霉素、美罗培南、万古霉素、红霉素、克林霉素和苯扎氯铵杀菌剂有累加作用。因此，CAMP 在金黄色葡萄球菌的浮游生物培养物中增强了几乎所有研究的抗生素和抗菌剂的作用。在大肠杆菌的实验中已经确定，CAMP 对多粘菌素和头孢噻肟的活性具有协同作用，对环丙沙星、氯霉素和四环素的功效具有累加作用。还已经确定，CAMP 表现出与美罗培南在抑制鲍曼不动杆菌的浮游细胞的生长中的协同作用，以及对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌的累加作用。

15 因此，CAMP 显著增强了所有研究的抗生素对细菌浮游细胞的杀菌作用。

如以实时模式和在真实条件下进行的测试结果所示，本申请要求保护的方法允许在形成成熟生物膜之前在感染过程的早期防止生物膜生长，如上所述，这实际上对于预防、治疗多种疾病具有重要的科学和现实意义。

### 采用的信息来源

1. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35: 322-332.
- 25 2. Dufour D, Leung V, Levesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012;22: 2-16.
3. Leid JG. Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*. 2009;4(2): 66-70

4. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies (Review). *J Intern Med.* 2012;272: 541- 561.

5 5. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention— a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 2015; 198(1): 1-15.

6. Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin in Microbiol.* 2016;33 : 35-40.

10 7. Luca M, Maccari G, Nifosi R. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis.* 2014;70: 257-270.

8. Stempel N, Strehmel J, Overhage J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des.* 2015;21(1): 67-84.

15 9. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(5): 1044-60.

10. Bell G, Gouyon PH. Arming the enemy: the evolution of resistance to self-proteins. *Microbiology.* 2003; 149: 1367-1375.

20 11. Habets MG, Brockhurst MA. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biol Lett.* 2012;8: 416-418.

12. Napier BA, Burd EM, Satola SW, Cagle SM, Ray SM, McGann P, et al. Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Aci-netobacter baumannii*. *mBio.* 2013;4(3). Available from:  
25 <http://mbio.asm.Org/content/4/3/e00021-13.full>

13. Patent Application WO 2015/038339 Al Small cataio ic anti-biofilm and IDR peptides

14. Patent Application WO2013/170022 BIOFILM PREVENTION, DISRUPTION AND TREATMENT WITH BACTERIOPHAGE LYSIN:  
30 3a\*B-Ka Ha H3o6peTeHHe RU2014149348, 09.05.2013 "Method for



preventing, disrupting and processing biofilm with bacteriophage lysin" (prototype).

15. Chernysh S.I., Gordya N.A. Immune system of larvae *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) as a source of medicinal substances. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2011 , Vol. 47, No. 6, pp. 444-452

16. Chernysh S., Gordya N., Suborova T. Insect Complex of antimicrobial peptides Prevent Resistance Development in Bacteria. *PLOS ONE*, 2015 DOI: 10.1371/journal.pone.0130788 July 15, 2015

17. Patent RU 2447896 Antimicrobial substance

18. Natalia Gordya, Andrey Yakovlev, Anastasia Kruglikova, Dmitry Tu-lin, Evdokia Potolitsina, Tatyana Suborova, Domenico Bordo, Camillo Rosano, Sergey Chernysh Natural complex of antimicrobial peptides in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots *PLoS ONE* 12(3): e0173559.doi: 10.1371/journal.pone.0173559

19. Chernysh S. I, Gordja N. A, Simonenko N. P. Diapause and Immune Response: Induction of Antimicrobial Peptides Synthesis in the Blowfly, *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae). *Entomological science*, 2000, v. 3, No 1, p. 139-144

20. Yakovlev AY, Nesin AP, Simonenko NP, Gordya NA, Tulin DV, Kruglikova AA, Chernysh SI Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016 Sep 1. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s 11626-016-0078- 1

21. Bulet P, Stocklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005; 12(1): 3-11

22. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2016;371(1695).

表 1. 红头丽蝇(*C. vicina*)抗菌肽的复合物(CAMP)对抗生素的抗生物膜活性的影响

抗生素	抗生素类别	放大系数 $C_a$ (抗生素的 $MBIC_{90}$ / 抗生素的 $MBIC_{90}$ + CAMP)
金黄色葡萄球菌		
美罗培南	BL	>500
阿米卡星	AG	>333
卡那霉素	AG	>167
万古霉素	GP	32
氟苄青霉素	BL	>24
克林霉素	LA	>21
苯唑西林	BL	11
氟霉素	AM	8
苯扎氯铵	BC	8
红霉素	ML	4
四环素	TC	>1.5
大肠杆菌		
美罗培南	BL	>187
头孢噻肟	BL	62
庆大霉素	AG	10
环丙沙星	FQ	>3
氟霉素	AM	>6
四环素	TC	5
多粘菌素 B	PM	1
铜绿假单胞菌		
美罗培南	BL	8
肺炎克雷伯菌		
美罗培南	BL	4
鲍曼不动杆菌		

美罗培南	BL	16
------	----	----

AG-氨基糖苷类, AM-胺酰胺醇类, BL-β 内酰胺类, FQ-氟喹诺酮类, GP-糖肽类, LA-林可酰胺类, ML-大环内酯类, PM-多粘菌素, TC-四环素, BC-苯扎氯铵

5 表 2. 从双翅目不同昆虫物种获得的制剂的抗菌活性

生产者物种	MIC, mg/L (均值±均值误差)
红头丽蝇( <i>C. vicina</i> )	250 ± 0.0
黑颊丽蝇( <i>C. vomitoria</i> )	420 ± 80
丝光绿蝇( <i>L. sericata</i> )	420 ± 80
家蝇( <i>M. domestica</i> )	2000 ± 0

表 3. 红头丽蝇和亮斑扁角水虻的抗菌复合物的比较活性

菌株	抑制区的直径, mm	
	红头丽蝇	亮斑扁角水虻
藤黄微球菌( <i>M. luteus</i> )	19	14
大肠杆菌 D31	14	12
金黄色葡萄球菌 203	6.5	8
铜绿假单胞菌 ATCC27853	0	6.5

表 4. 红头丽蝇中所含抗菌肽的结构

肽	分子量, Da (单一同位素的)	UniProt ID	氨基酸序列
防御素			
Seq ID No.1	4032.0	C0HJX7	ATCDLLSGTGANHSACAAHCLLRGNRGGYCNGKAVCVCRN
天蚕素			
Seq ID	4156.0	C0HJX8	GGWLKKIGKKIERVQHQHTRDATIQGLAVAQQAAN

No.2			VAATAR
Seq ID No.3	6743.7		MNFHKVFIFVALILAVFAGQSQAGWLKKIGKKIER VGQHTRDATIQGLAVAQQAANVAATARG
双翅杀菌肽			
Seq ID No.4		C0HJX9	DSKPLNLVLPKEEPNNPQTYGGGGGSRKDDFD VVLQGAQXEV...(N-末端)
Seq ID No.5	11991.0		MKFVYLLAISALCMAAMVKAQNKPFKLTLPKEEP KNLPQLYGGGGGSRKQGFVSLGAQQKVVESQN KRHSVDVNAGYSQHLGGPYGNSRPAYNGGVGYTY KLVNDCTISG
Seq ID No.6	4463.3		DSKPLNLVLPKEEPKNLPQLYGGGGGSRK- DGFVSLGAQQRV
Seq ID No.7	7363.5		NLPQLYGGGGGSRKDGFDVSLGAQQKVVESQNK RHSVDVNAGYAQHLSGPYGNSRPAYSGGASYTYRF G
Seq ID No.8			MNSFIFGNLCFSVAALAKADSKPLNLVLPKEEP- KNLPQLYGGGGGSRKDGFDVNLGAQQRVWE- SETNVIQ
富含脯氨酸的肽			
Seq ID No.9		C0HJY0	FVDRNRIPRSNNGPKIPIISNP...(N-末端)
Seq ID No.10	6205.0		MCGKKFFFFVLMALMALTTQLASASPFVDRSRRP NSNNGPKIPIISNPPFNPNARP
Seq ID No.11	4442.2		SRDARPVQPRFNPPPKRERPIIYDAPIRRP GPKT MYA

表 5. 红头丽蝇 CAMP 制剂对抗生素的抗生物膜活性的影响。

TTC 测试

抗生素	菌株	MBIC <sub>90</sub> 抗 生素, mg/L	MBIC <sub>90</sub> * 抗 生素	FICI*	相互作用 类型
-----	----	----------------------------------	------------------------------	-------	------------

			+CAMP , mg/L		
阿卡米星	金黄色葡萄球菌 203	>500	1.5	0.087	协同作用
卡那霉素	金黄色葡萄球菌 203	>500	3.0	0.107	协同作用
庆大霉素	大肠杆菌 ATCC25922	6.25	0.6	0.765	累加作用
苯唑西林	金黄色葡萄球菌 203	0.11	0.01	0.583	累加作用
氟苄青霉素	金黄色葡萄球菌 203	24.0	< 1.0	0.208	协同作用
头孢噻肟	大肠杆菌 ATCC25922	3.75	0.06	0.179	协同作用
美罗培南	金黄色葡萄球菌 203	>50	< 0.1	0.168	协同作用
	大肠杆菌 ATCC25922	3.75	< 0.02	0.297	协同作用
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	19.0	2.4	0.28	协同作用
	肺炎克雷伯菌 145	9.4	2.3	0.583	累加作用
	鲍曼不动杆菌 28	18.8	1.2	0.247	协同作用
万古霉素	金黄色葡萄球菌 203	38.0	1.2	0.165	协同作用
红霉素	金黄色葡萄球菌 203	9.4	2.4	0.422	协同作用
克林霉素	金黄色葡萄球菌 203	>250	12.0	0.355	协同作用
多粘菌素	大肠杆菌	9.4	9.4	1	无相互作用

	ATCC25922				用
环丙沙星	大肠杆菌 ATCC25922	0.06	< 0.02	0.542	累加作用
氯胺苯醇 (氯霉素)	大肠杆菌 ATCC25922	3.0	< 0.5	0.667	累加作用
	金黄色葡萄球菌 203	6.0	0.75	0.417	协同作用
苯扎氯铵	金黄色葡萄球菌 203	12.0	1.5	0.749	累加作用
四环素	大肠杆菌 ATCC25922	0.8	0.15	0.708	累加作用
	金黄色葡萄球菌 203	0.15	< 0.1	0.749	累加作用

\*-研究的 CAMP 红头丽蝇和相应抗生素组合的 MBIC<sub>90</sub> 和 FICI 的最小值

表 6. 含有红头丽蝇抗菌肽复合物的制剂对多种类型抗生素的抗生物膜活性

5 的影响。结晶紫测试

抗生素	菌株	MBEC <sub>90</sub> * 抗生素, mg/L	MBEC <sub>90</sub> ** 抗 生 素 +CAMP, mg/L	FICI**	C <sub>a</sub> ***	CAMP 和 抗 生 素 相互作用类型	
						结 晶 紫 测 试	TTC 测 试(来自 表 5 的 数据)
美罗培 南	金黄色葡萄 球菌 203	>50	< 0.1	0.169	>500	协 同 作 用	协 同作 用
	大肠杆菌 ATCC25922	1.88	0.03	0.349	62.7	协 同 作 用	协 同作 用
	铜绿假单胞 菌	9.4	0.3	0.159	31.3	协 同 作 用	协 同作 用

	ATCC27853						
	鲍曼不动杆菌 28	9.4	0.59	0.291	15.9	协同作用	协同作用
	肺炎克雷伯菌 145	6.25	1.17	0.687	5.3	累加作用	累加作用
头孢噻肟	大肠杆菌 ATCC25922	1.88	0.12	0.397	15.7	协同作用	协同作用
阿米卡星	金黄色葡萄球菌 203	>250	< 1.0	0.024	>250	协同作用	协同作用
卡那霉素	金黄色葡萄球菌 203	>500	4.0	0.137	>125	协同作用	协同作用
环丙沙星	大肠杆菌 ATCC25922	0.06	< 0.02	0.583	>3.0	累加作用	累加作用
氯胺苯醇 (氯霉素)	金黄色葡萄球菌 203	2.0	< 0.5	0.438	>4.0	协同作用	协同作用

\*最小生物膜清除浓度

\*\*-研究的 CAMP 红头丽蝇和相应抗生素组合的 MBIC<sub>90</sub> 和 FICI 的最小值

\*\*\*扩增系数(抗生素的 MBEC<sub>90</sub> / 抗生素的 MBIC<sub>90</sub>+ CAMP)

5 表 7. 针对浮游生物细胞, 红头丽蝇 CAMP 对不同种类抗生素活性的影响。TTC 测试

抗生素	菌株	MBIC <sub>90</sub> 抗生素, mg/L	MBIC <sub>90</sub> * 抗 生素 +CAMP, mg/L	FICI**	相互作用类型
阿米卡星	金黄色葡萄球菌 203	1.88	0.48	0.833	累加作用
卡那霉素	金黄色葡萄球菌	3.1	< 0.1	0.527	累加作用

	203				
氟苄青霉素	金黄色葡萄球菌 203	0.045	0.006	0.542	累加作用
头孢噻肟	大肠杆菌 ATCC25922	0.09	0.011	0.415	协同作用
美罗培南	金黄色葡萄球菌 203	0.023	< 0.002	0.667	累加作用
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	0.96	0.48	0.516	累加作用
	肺炎克雷伯菌 145	0.012	< 0.002	0.833	累加作用
	鲍曼不动杆菌 28	0.75	0.045	0.393	协同作用
万古霉素	金黄色葡萄球菌 203	0.47	0.12	0.589	累加作用
红霉素	金黄色葡萄球菌 203	0.94	0.03	0.589	累加作用
克林霉素	金黄色葡萄球菌 203	75	4.7	0.729	累加作用
多粘菌素 B	大肠杆菌 ATCC25922	2.4	< 0.1	0.375	协同作用
环丙沙星	大肠杆菌 ATCC25922	0.03	0.015	0.667	累加作用
氯胺苯醇 (氯霉素)	大肠杆菌 ATCC25922	4.7	0.3	0.67	累加作用
	金黄色葡萄球菌 203	4.7	0.6	0.418	协同作用
苯扎氯铵	金黄色葡萄球菌 203	0.3	0.15	0.75	累加作用
四环素	大肠杆菌 ATCC25922	0.47	0.03	0.729	累加作用



	金黄色葡萄球菌 203	0.12	0.03	0.416	协同作用
--	----------------	------	------	-------	------

\*-研究的 CAMP 红头丽蝇和相应抗生素组合的 MBIC<sub>90</sub> 和 FICI 的最小值

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

---

序列表

<110> S·I·切尔内什

<120> 用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法

<130> TPD00855A

<141> 2020-02-06

<150> 2017120258

<151> 2017-06-08

<160> 4

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Defensin (防御素)

<400> 1

Ala Thr Cys Asp Leu Leu Ser Gly Thr Gly Ala Asn His Ser Ala Cys

1 5 10 15

Ala Ala His Cys Leu Leu Arg Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys Asn Gly

20 25 30

Lys Ala Val Cys Val Cys Arg Asn

35 40

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Cecropin (天蚕素)

<400> 2

Gly Trp Leu Lys Lys Ile Gly Lys Lys Ile Glu Arg Val Gly Gln His

1 5 10 15

Thr Arg Asp Ala Thr Ile Gln Gly Leu Ala Val Ala Gln Gln Ala Ala

20 25 30

Asn Val Ala Ala Thr Ala Arg

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

---

35

<210> 3

<211> 63

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<400> 3

Met Asn Phe His Lys Val Phe Ile Phe Val Ala Leu Ile Leu Ala Val

1 5 10 15

Phe Ala Gly Gln Ser Gln Ala Gly Trp Leu Lys Lys Ile Gly Lys Lys

20 25 30

Ile Glu Arg Val Gly Gln His Thr Arg Asp Ala Thr Ile Gln Gly Leu

35 40 45

Ala Val Ala Gln Gln Ala Ala Asn Val Ala Ala Thr Ala Arg Gly

50 55 60

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Diptericin, N-terminal sequence(双翅杀菌肽, N-末端序列)

<400> 4

Asp Ser Lys Pro Leu Asn Leu Val Leu Pro Lys Glu Glu Pro Pro Asn

1 5 10 15

Asn Pro Gln Thr Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Asp Asp Phe

20 25 30

Asp Val Val Leu Gln Gly Ala Gln...

35 40

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Diptericin(双翅杀菌肽)

<400> 5

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

---

Met Lys Phe Val Tyr Leu Leu Ala Ile Ser Ala Leu Cys Met Ala Ala

1 5 10 15

Met Val Lys Ala Gln Asn Lys Pro Phe Lys Leu Thr Leu Pro Lys Glu

20 25 30

Glu Pro Lys Asn Leu Pro Gln Leu Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg

35 40 45

Lys Gln Gly Phe Asp Val Ser Leu Gly Ala Gln Gln Lys Val Trp Glu

50 55 60

Ser Gln Asn Lys Arg His Ser Val Asp Val Asn Ala Gly Tyr Ser Gln

65 70 75 80

His Leu Gly Gly Pro Tyr Gly Asn Ser Arg Pro Ala Tyr Asn Gly Gly

85 90 95

Val Gly Tyr Thr Tyr Lys Leu Val Asn Asp Cys Thr Ile Ser Gly

100 105 110

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Calliphora vicina (红头丽蝇)

<220>

<223> Diptericin(双翅杀菌肽)

<400> 6

Asp Ser Lys Pro Leu Asn Leu Val Leu Pro Lys Glu Glu Pro Lys Asn

1 5 10 15

Leu Pro Gln Leu Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Asp Gly Phe

20 25 30

Asp Val Ser Leu Gly Ala Gln Gln Arg Val

35 40

<210> 7

<211> 69

<212> PRT

<213> Calliphora vicina (红头丽蝇)

<220>

<223> Diptericin(双翅杀菌肽)

<400> 7

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

---

Asn Leu Pro Gln Leu Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Asp Gly

1 5 10 15

Phe Asp Val Ser Leu Gly Ala Gln Gln Lys Val Trp Glu Ser Gln Asn

20 25 30

Lys Arg His Ser Val Asp Val Asn Ala Gly Tyr Ala Gln His Leu Ser

35 40 45

Gly Pro Tyr Gly Asn Ser Arg Pro Ala Tyr Ser Gly Gly Ala Ser Tyr

50 55 60

Thr Tyr Arg Phe Gly

65

<210> 8

<211> 70

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Diptericin(双翅杀菌肽)

<400> 8

Met Asn Ser Phe Ile Phe Gly Asn Leu Cys Phe Ser Val Ala Ala Leu

1 5 10 15

Ala Lys Ala Asp Ser Lys Pro Leu Asn Leu Val Leu Pro Lys Glu Glu

20 25 30

Pro Lys Asn Leu Pro Gln Leu Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys

35 40 45

Asp Gly Phe Asp Val Asn Leu Gly Ala Gln Gln Arg Val Trp Glu Ser

50 55 60

Glu Thr Asn Val Ile Gln

65 70

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> *Calliphora vicina* (红头丽蝇)

<220>

<223> Proline-rich peptide, N-terminal sequence(富含脯氨酸的肽, N-末端序列)

<400> 9

## 说明书核苷酸和氨基酸序列表

---

Phe Val Asp Arg Asn Arg Ile Pro Arg Ser Asn Asn Gly Pro Lys Ile

1 5 10 15

Pro Ile Ile Ser Asn Pro...

20

<210> 10

<211> 56

<212> PRT

<213> Calliphora vicina (红头丽蝇)

<220>

<223> Proline-rich peptide(富含脯氨酸的肽)

<400> 10

Met Cys Gly Lys Lys Phe Phe Phe Phe Val Leu Met Ala Leu Met Ala

1 5 10 15

Leu Thr Thr Gln Leu Ala Ser Ala Ser Pro Phe Val Asp Arg Ser Arg

20 25 30

Arg Pro Asn Ser Asn Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ile Ile Ser Asn Pro

35 40 45

Pro Phe Asn Pro Asn Ala Arg Pro

50 55

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> Calliphora vicina (红头丽蝇)

<220>

<223> Proline-rich peptide(富含脯氨酸的肽)

<400> 11

Ser Arg Asp Ala Arg Pro Val Gln Pro Arg Phe Asn Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

Lys Arg Glu Arg Pro Ile Ile Tyr Asp Ala Pro Ile Arg Arg Pro Gly

20 25 30

Pro Lys Thr Met Tyr Ala

35



## 电子申请回执

电子申请注册用户提交的专利申请文件已由国家知识产权局接收。经核实，国家知识产权局确认信息如下：

接收案件编号：335007018

代理机构内部编号：TPD00855A

国际申请号：PCT/RU2018/000346

发明创造名称：用昆虫抗菌肽复合物破坏细菌生物膜并防止细菌生物膜形成的方法

提交人姓名或名称：北京唐颂永信知识产权代理有限公司

国家知识产权局收到时间：2020-02-06 13:33:18

### 国家知识产权局收到文件情况：

- 1、国际申请进入中国国家阶段声明（发明） XML 格式 文件大小 12k
- 2、权利要求书 PDF 格式 文件大小 200k
- 3、说明书 PDF 格式 文件大小 321k
- 4、说明书摘要 PDF 格式 文件大小 194k
- 5、专利代理委托书（中英文） XML 格式 文件大小 362k
- 6、核苷酸或氨基酸序列计算机可读载体 TXT 格式 文件大小 7k
- 7、实质审查请求书 XML 格式 文件大小 2k
- 8、说明书核苷酸和氨基酸序列列表 XML 格式 文件大小 13k

### 提示：

1. 申请人收到电子申请回执之后，可以登录国家知识产权局电子申请网站 <http://cponline.cnipa.gov.cn> 查询。
2. 申请人认为电子申请回执上记载的内容与申请人所提交的相应内容不一致时，可以向国家知识产权局请求更正。
3. 申请人办理进入中国国家阶段的手续除了提交专利法实施细则第 104 条规定的文件外，还应当自优先权日起 30 个月内以国际申请号缴纳该条款规定的费用，未在该期限内缴纳的，可以在缴纳宽限费后，自优先权日起 32 个月内缴纳规定的费用。要求了优先权的，应当自进入日起 2 个月内缴纳专利法实施细则第 110 条规定的费用。



# 国家知识产权局

---

国家知识产权局

2020年02月06日