

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2022/079315 A1

(43) Date de la publication internationale
21 avril 2022 (21.04.2022)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/46 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01) *A61P 41/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 38/14* (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01) *A61K 8/66* (2006.01)
A61L 12/08 (2006.01) *A61K 38/48* (2006.01)

(71) **Déposants** : **ONELIFE S.A.** [BE/BE] ; Avenue Albert Einstein 15, 1348 Louvain-la-Neuve (BE). **UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN** [BE/BE] ; Place de l'Université 1, 1348 Ottignies Louvain-la-Neuve (BE).

(72) **Inventeurs** : **FONTAINE, Lactitia** ; Rue Almez, 4, 1325 Corroy-le-Grand (BE). **LARDINOIS, Aline** ; Avenue Saint-Pancrace 19/11, 1950 Kraainem (BE). **CHALHOUB, Houssein** ; Avenue de l'Idéal 7, BP 101, 1200 Woluwé-Saint-Lambert (BE). **VAN BAMBEKE, Françoise** ; Avenue Emmanuel Mounier 73 B1.73.05, 1200 Bruxelles (BE). **RUIZ-SORRIBAS, Albert** ; Avenue Emmanuel Mounier 73 B1.73.05, 1200 Bruxelles (BE).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2021/078824

(22) Date de dépôt international :

18 octobre 2021 (18.10.2021)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

2020/5726 16 octobre 2020 (16.10.2020) BE

(74) **Mandataire** : **CALYSTA NV** ; Lambroekstraat 5A, 1831 Diegem (BE).

(54) **Title**: PARAPHARMACEUTICAL OR PHARMACEUTICAL COMPOSITION ADMINISTRABLE TO A LIVING BEING, PREFERABLY A HUMAN BEING, COMPRISING AT LEAST ONE ENZYME FOR THE TREATMENT AND/OR PREVENTION OF BACTERIAL INFECTIONS INVOLVING BIOFILM FORMATION

(54) **Titre** : COMPOSITION PARA-PHARMACEUTIQUE OU PHARMACEUTIQUE ADMINISTRABLE À UN ÊTRE VIVANT, DE PRÉFÉRENCE UN ÊTRE HUMAIN COMPRENANT AU MOINS UNE ENZYME POUR LE TRAITEMENT ET/OU LA PRÉVENTION D'INFECTIONS BACTÉRIENNES IMPLIQUANT LA FORMATION DE BIOFILM

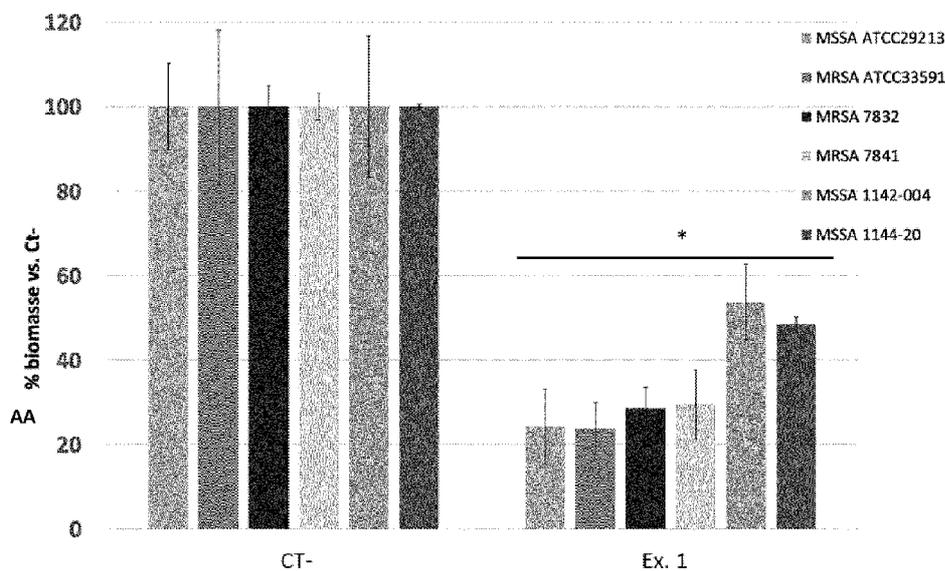


Figure 1

AA biomass vs. Ct-

(57) **Abstract**: A parapharmaceutical or pharmaceutical composition administrable to living beings, in particular to human beings, comprising at least one endoribonuclease enzyme chosen from the EC 3.1.30 and EC 3.1.31 classes, preferably in a content of from 10 to 1000 U/ml, preferably 50 to 500 U/ml, preferably from 100 to 500 U/ml, for use in a curative or preventive treatment for dermatological

[Suite sur la page suivante]



WO 2022/079315 A1

(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))

infections or for infections which develop on superficial or deep burns and wounds.

(57) **Abrégé** : Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain comprenant au moins une enzyme endoribonucléase choisie parmi les classes EC 3.1.30 et EC 3.1.31, de préférence à une teneur de 10 à 1000U/ml, de préférence 50 à 500U/ml, de préférence de 100 à 500U/ml pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif des infections dermatologiques ou d'infections se développant sur des brûlures et des plaies superficielles ou profondes.

**COMPOSITION PARA-PHARMACEUTIQUE OU PHARMACEUTIQUE ADMINISTRABLE
À UN ÊTRE VIVANT, DE PRÉFÉRENCE UN ÊTRE HUMAIN COMPRENANT AU MOINS
UNE ENZYME POUR LE TRAITEMENT ET/OU LA PRÉVENTION D'INFECTIONS
BACTÉRIENNES IMPLIQUANT LA FORMATION DE BIOFILM**

La présente invention se rapporte à une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant et en particulier humain comprenant au moins une enzyme ainsi qu'à son utilisation en tant que
5 potentialisateur dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm, comme par exemple les infections post-implantatoires, liées aux implants médicaux *in situ*, et donc implantés, et les infections diverses du corps comme les infections aiguës ou chroniques des plaies, des brûlures, les infections de la cavité orale, du tractus digestif, du système urinaire, du système
10 respiratoire.

Un biofilm est une pellicule visqueuse qui se développe sur toutes les surfaces, suite à l'adhésion de microorganismes sur ces surfaces et à la sécrétion par ceux-ci de polymères qui les recouvrent et facilitent leur adhésion. Les biofilms constituent ainsi une couche de protection autour des microorganismes et
15 représentent une source récurrente de contamination du milieu environnant qui pose des problèmes majeurs en termes de santé, par exemple dans les milieux hospitaliers.

Plus spécifiquement, l'accumulation de polymères sécrétés par les bactéries crée une matrice composée essentiellement de polysaccharides, d'ADN, de protéines ainsi que de lipides qui protège ces microorganismes des agressions
20 extérieures et qui présente une très forte résistance aux procédures de nettoyage et de désinfection conventionnelles. Les microorganismes se développent donc aisément au sein de cette matrice protectrice et contaminent le milieu environnant en constituant un réservoir particulièrement critique et difficile à éliminer.

25 Il est reconnu que la problématique de la présence de biofilms est double. Premièrement, comme indiqué plus haut, ceux-ci représentent une source de contamination permanente et très difficile à éliminer par des moyens conventionnels, même les plus agressifs. En effet, les désinfectants classiques sont très souvent inefficaces car il est observé qu'ils ne parviennent pas à atteindre les

microorganismes qui sont protégés par la matrice du biofilm composée de polysaccharides, d'ADN, de protéines et de lipides.

Deuxièmement, un biofilm est mixte, en ce sens qu'il est initialement développé par certaines souches bactériennes mais qu'il peut en abriter d'autres, ces souches vivant et se développant en colonies. Or, ces colonies favorisent la communication entre bactéries et, entre-autre, l'échange et la propagation de gènes de résistance portés par certaines bactéries. Les biofilms résultant de ces échanges de gènes sont alors encore plus difficiles à éliminer et il faut recourir à des moyens de désinfection ou de traitement de plus en plus puissants qui se heurtent toutefois fréquemment à des problèmes de résistance et/ou de tolérance majeurs.

La matrice de protection des bactéries formant les biofilms est si résistante qu'elle constitue une véritable barrière protégeant les bactéries des agents microbicides (antibiotiques et/ou biocides) qui pourraient agir contre les microorganismes et donc contre les infections liées à la présence de biofilms, dont les infections du corps humain associées à la présence de biofilm. Actuellement, les traitements classiques à base de différents antibiotiques et/ou de différents biocides (désinfectants,...), même lorsqu'ils sont, dans certains cas, en association avec d'autres composés (détergents formulés et/ou séquestrants et/ou dispersants et/ou tensioactifs), n'agissent pas de manière suffisamment efficace car ils ne pénètrent pas ou seulement de façon limitée le biofilm dans son épaisseur. Par ailleurs, les microbicides peuvent être inhibés par certaines molécules composant cette matrice. Par conséquent, les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces, et agissent uniquement à la surface du biofilm, la matrice du biofilm protégeant efficacement les bactéries de phénomènes de déshydratation, de l'action des antibiotiques et des biocides (et plus généralement des molécules microbicides), de la phagocytose et des acides. En ce sens, il est d'ailleurs généralement admis que les biofilms présentent une résistance jusqu'à 1000 fois supérieure aux microbicides par rapport à une bactérie planctonique (non protégée par un biofilm).

On comprend donc que le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilms est un véritable défi car les bactéries sont protégées des agents microbicides et des agressions extérieures.

En milieu hospitalier, dentaire ou vétérinaire, la situation est d'autant plus critique que de nombreux microorganismes responsables de la formation de

biofilms sont détectés en de nombreux endroits, tant au niveau des individus patients/ animaux (plaies, blessures, brûlures, système respiratoire, ...) qu'au niveau de l'environnement (salle d'opération, cabinet et matériel de dentisterie, matériel chirurgical, équipements de maintenance de ce matériel, endoscopes, sondes urinaires, cathéters, implants ou prothèses dentaires, équipement médical, appareil de dialyse ou de ventilation assistée des individus, ...) et des surfaces (sols, murs, tables d'opération, ...).

En parallèle, le traitement des plaies, domaine en pleine évolution est également largement concerné par les infections bactériennes impliquant la formation de biofilms. Présents dans plus de 90% des plaies chroniques, le biofilm est un obstacle majeur à la guérison, en augmentant la réponse inflammatoire et en retardant le processus de cicatrisation.

Les plaies/blessures aiguës ou chroniques comprennent les plaies chirurgicales, les brûlures, les ulcères veineux et artériels de la jambe, les ulcères diabétiques du pied, les ulcères de pression (escarres), les brûlures... Les ulcères chroniques sont extrêmement douloureux et difficilement traitables. Une plaie est dite chronique lorsqu'aucun signe de cicatrisation n'est apparent après 4 à 6 semaines.

Le traitement des plaies comprend deux segments : le segment traitement traditionnel des plaies et le traitement actif avancé des plaies. Le traitement traditionnel des plaies concerne tout ce qui est pansement dans un environnement sec pour couvrir les plaies et les protéger de l'environnement.

Le traitement actif avancé des plaies/blessures concerne tous les traitements qui apportent un vrai support à la cicatrisation, à la guérison des plaies en incluant parfois le débridement des tissus endommagés. Ce traitement va permettre une stimulation de la croissance des nouveaux tissus et permet de contrôler l'infection et la douleur.

Le domaine des soins d'hygiène corporelle ou cosmétique est également concerné par les infections bactériennes liées à la formation de biofilms. On a cité précédemment les cabinets de dentisterie pour les infections post-implantatoires suite à la pose de prothèses dentaires (peri-implantites). Toutefois, il existe d'autres applications dans lesquelles les biofilms ont un impact négatif sur la santé. Par exemple, on sait que les dents, les gencives, et les prothèses dentaires sont

des supports de choix pour les bactéries vu l'environnement buccal humide et riche en microorganismes dans lequel ils sont localisés. On rapporte que le biofilm qui compose la plaque dentaire est un facteur de risque majeur de complications comme les caries, les maladies parodontales et gingivites et il est reconnu que
5 lorsque le biofilm devient épais, il représente une résistance aux produits chimiques (antibiotiques, désinfectants). En outre, les maladies respiratoires sont souvent liées aux maladies parodontales par transfert de microorganismes de la bouche vers les voies respiratoires. Pourtant, il est possible de réduire les risques de santé liés à la plaque dentaire en prévenant et/ou réduisant sa formation par une action
10 mécanique.

A ce sujet, Kaplan et al. décrivent une dispersive B mutée qui est une β -N-acetylglucosaminidase (de la classe EC 3.2.1.52) dans des produits d'hygiène buccale comme des dentifrice ou des eaux buccales. Un autre exemple réside dans le traitement des onychomycoses (infection des ongles) ou des lentilles oculaires où
15 des biofilms sont également impliqués voire même de l'acné. Par exemple, WO 2020/0185685 décrit une composition pour le traitement de l'acné, qui peut contenir « un inhibiteur d'ARN ».

De tout ceci, il ressort que les biofilms constituent un réel enjeu, tout particulièrement dans le domaine des soins, en particulier des soins de santé
20 (hôpitaux, cabinets dentaires, ...) et des soins vétérinaires voire des soins d'hygiène.

Cette problématique est d'autant plus critique que les biofilms impliquent des bactéries responsables d'infections potentiellement mortelles chez les individus, par exemple chez des individus développant une infection provoquée par les bactéries du genre Staphylocoques ou encore les Entérobactéries qui se
25 révèlent être multi-résistantes à des antibiotiques de dernière génération. Il convient donc de prendre toutes les précautions possibles afin d'éviter la formation et le développement de biofilms.

Il est bien connu de l'état de la technique des compositions comprenant au moins une enzyme pour disperser un biofilm. Par exemple, les
30 documents US2009/0130082 et WO2009/121183 portent sur des compositions comprenant une DNase I bovine (endodéoxyribonucléase I de la classe EC 3.1.21) pour disperser le biofilm et un antibiotique (agent microbicide) pour tuer les bactéries libérées. Selon ces documents antérieurs, ces compositions sont

notamment utilisées lors de la fabrication/préparation de dispositifs médicaux pour traiter des plaies. A cette fin, les dispositifs médicaux sont revêtus (coatés) ou imprégnés avec une composition comprenant une DNase I et un antibiotique. Plus spécifiquement, ces documents antérieurs enseignent essentiellement que de telles compositions sont utilisées pour préparer les dispositifs médicaux et pour désinfecter la peau ou le milieu environnant avant insertion ou implantation d'un dispositif médical. En ce sens, les compositions divulguées dans ces documents antérieurs sont essentiellement utilisées comme revêtements (coatings) ou comme solutions de rinçage pré-procédures avant une chirurgie par exemple.

10 US 10 328 129 décrit l'utilisation de nucléases pour le traitement d'affections de l'œil.

WO 01/93875 décrit une composition pour le traitement d'un biofilm comprenant une première composante enzymatique munie d'un ancrage pour la dégradation des structures des biofilms et une seconde composante enzymatique munie d'un ancrage ayant un effet bactéricide direct. Les DNases sont renseignées comme appartenant à cette seconde catégorie enzymatique.

US 2017/355930 décrit un produit détergent comprenant une nucléase et une amine.

20 Dans cette optique, on connaît la demande EP 3468583 qui décrit une composition comprenant au moins une enzyme comme par exemple une DNase I et au moins une molécule microbicide pour la prévention ou le traitement d'infections à biofilm post-implantatoires.

25 Par ailleurs la problématique des infections à biofilms n'est pas seulement limitée aux infections à biofilm post-implantatoires. En effet, les biofilms sont également impliqués dans des infections chroniques du corps animal. Comme expliqué plus haut, ces infections peuvent être présentes, par exemple, au niveau de plaies/blessures présentes à la surface du corps humain ou du corps de mammifères.

30 On connaît aussi la demande de brevet WO2006/133523 qui décrit une composition comprenant au moins une enzyme utilisée dans le traitement des problèmes dermatologiques et des plaies. Cette composition comprend au moins

une peroxydase dans le but de générer des radicaux hypothiocyanite antimicrobien à partir de H₂O₂ et de thiocyanate pour le traitement des infections.

Malheureusement, comme on peut le constater, l'état de la technique est riche d'enseignements vu la diversité des infections, comme par exemple celle dans lesquelles des biofilms sont impliqués. Dans certains cas, les auteurs de travaux de recherche ont cherché à identifier une enzyme qui aura une action spécifique et/ou ciblées vis-à-vis des biofilms alors que d'autres se sont focalisés sur une action antimicrobienne sans prendre en compte la matrice du biofilm.

Alternativement, on connaît des solutions commerciales comme par exemple l'EnziQure® qui est un détergent multi-enzymatique permettant la dissolution curative du biofilm et le nettoyage en profondeur des instruments chirurgicaux et des endoscopes. EnziQure® est un produit formulé qui contient une base tensioactive non-ionique, des agents dispersants et séquestrants et un cocktail enzymatique contenant 7 enzymes pour pouvoir dégrader la matrice du biofilm de nombreuses espèces bactériennes (son action anti-biofilm a été démontrée sur plus de 15 souches), les enzymes étant présentes dans des concentrations élevées pour assurer une efficacité maximale.

Bien que très efficace pour le nettoyage des instruments médicaux, cette solution est un dispositif médical de Classe I qui n'est pas administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain de par sa composition détergente et enzymatique qui n'a pas le grade pharmaceutique requis pour son utilisation comme substance active (médicament).

Il existe donc un besoin actuellement de mettre au point des formulations alternatives qui peuvent être appliquées au corps d'un être vivant, en particulier au corps humain ou animal, en particulier pour le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm et présentant une efficacité similaire à celle du produit EnziQure® de la demanderesse de la présente demande de brevet.

La présente invention a donc pour objet de procurer une composition enzymatique qui peut être administrée à l'être humain tant en usage externe qu'en usage interne et dont l'efficacité est similaire à celle du produit détergent EnziQure®

vis-à-vis de la dissolution de la matrice des biofilms et présentant une polyvalence d'utilisation.

Par les termes « utilisation polyvalente » ou « polyvalence d'utilisation », on entend une utilisation sur un large panel de souches de bactéries et pour une diversité d'application, à savoir une utilisation qui présente un large spectre d'actions.

En effet, pour qu'il soit possible d'exploiter industriellement une formulation pour le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm, il est avantageux de disposer d'une formulation à large spectre d'action, c'est-à-dire capable de dissocier différents types de biofilm associés à différents types d'infection. En effet, la composition d'un biofilm varie en fonction des bactéries qui le composent, et donc de la localisation et du type d'infection. Une telle formulation serait donc adaptée à diverses applications, et éviterait la nécessité de créer différentes formulations en fonction du type d'infection ciblé, car cette démarche implique une complexité logistique pénalisant une exploitation industrielle d'une telle formulation. La possibilité d'obtenir une formulation qui est active dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilms issus d'un large panel de souches bactérienne et à destination de différentes applications permet au moins la fabrication d'un concentré qui peut être ensuite diversifié pour certaines applications ou bien de formuler une composition polyvalente.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention une utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain comprenant au moins une enzyme endoribonucléase choisie dans le groupe constitué des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (par exemple EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et EC 3.1.31 et leur mélange, pour potentialiser un agent microbicide, en particulier un antibiotique, un phage, un antifongique, ou un désinfectant, dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm.

A titre d'exemple, une telle enzyme est la denarase® ou la benzonase endonucléase®. Elles sont de préférence présente à raison de 10 à 1000U/ml, de préférence 50 à 500U/ml, de préférence de 100 à 500U/ml.

Des concentrations selon la présente invention de ladite au moins une enzyme endoribonucléase choisie dans le groupe constitué des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et EC 3.1.31 vaut par exemple de 200 U/ml à 650 U/ml, plus particulièrement de 250 U/ml à 550 U/ml, de manière préférée de 300 U/ml, voire de 350 U/ml à 500 U/ml. Lorsque plusieurs endoribonucléases sont utilisées ensemble, soit chacune présente à la concentration susdite, soit ensemble, elles présentent la concentration susdite.

La concentration est exprimée selon la présente invention en termes d'U/ml. Une unité (U) est égale à la quantité de protéine qui induit un changement d'absorbance à 260nm de 1.0 en 30 minutes à 37°C.

Comme on le constate, la composition utilisée selon la présente invention est une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, qui est administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain. Lorsque la composition est pharmaceutique, elle est essentiellement exempte d'endotoxine.

Par les termes « composition essentiellement exempte d'endotoxine », on entend une composition qui ne contient pas ou très peu de substance lipopolysaccharidique thermostable toxique. Typiquement selon l'organisme dont provient l'enzyme, la solution enzymatique contient souvent des endotoxines, qui sont présentes dans la membrane externe de bactéries à Gram négatif. Les endotoxines sont libérées durant l'extraction de l'enzyme à partir de la cellule lors de la lyse cellulaire. De telles enzymes sont largement commercialisées, mais ne conviennent en aucun cas à un usage pharmaceutique, d'autant moins qu'elles ne sont généralement pas produites selon les normes de Good manufacturing Practice. On peut obtenir une enzyme sans endotoxine soit par une production en bactéries gram+, soit dans d'autres hôte ne contenant pas d'endotoxines dans leur membrane, soit encore par purification.

Ladite au moins une enzyme endoribonucléase de la composition utilisée selon la présente invention a une activité sur l'ARN et sur l'ADN. Son activité enzymatique hydrolyse les substrats ADN et ARN en produits 5'-phospho(mono/oligo)nucléotides (EC 3.1.30 ; par exemple EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et/ou 3'-phospho(mono/oligo)nucléotides (EC 3.1.31).

Comme on l'a indiqué précédemment, Les compositions connues et développées actuellement sont des compositions comprenant, pour la plupart, une

endodésoxyribonucléase (Dnase I) de la classe EC 3.1.21 pour hydrolyser l'ADN et/ou une hydrolase de polysaccharides (Dispersine B) pour hydrolyser les polysaccharides présents dans la matrice des biofilms.

La composition pharmaceutique enzymatique utilisée selon la présente invention répond à des conditions très strictes de fabrication. La composition selon la présente invention est fabriquée en respectant les *good manufacturing practices* (GMPc) qui sont des directives devenues obligatoires dans le monde pharmaceutique, que ce soit au niveau de la chaîne de production d'un médicament ou au niveau de manipulations en laboratoire. Ces directives imposent un traçage de la production et un contrôle qualité pour assurer l'efficacité, la pureté et l'innocuité reproductible d'un produit à usage pharmaceutique. En particulier, la composition enzymatique selon l'invention répond aux spécifications pharmaceutiques en matière d'innocuité, de quantités d'endotoxine et de microorganismes (virus, mycoplasme, bactéries) présents, de pureté et d'absence de produit d'origine animale ou d'antibiotique utilisé pour sa fabrication. Ces spécifications sont les prérequis vers une utilisation thérapeutique dans le corps humain, que ce soit en usage externe ou interne.

Il a en effet été identifié selon la présente invention qu'il était possible de produire une telle enzyme en souche bactérienne Gram+ (ou via tout autre procédé de fermentation n'impliquant pas de bactéries Gram-), laquelle ne produit pas d'endotoxine et dont la production et la purification est conforme aux normes *good manufacturing practices*. D'autres méthodes de production sont bien évidemment possibles, y compris en bactéries Gram-, moyennant un procédé de purification aval qui soit adéquat. Par exemple, la benzonase endonucléase est également conforme aux normes *good manufacturing practices*.

La composition para-pharmaceutique comprenant la nucléase (l'endoribonucléase ; RNase) choisie parmi les classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) ou EC 3.1.31 ne doit quant à elle pas spécifiquement être de grade pharmaceutique. Par extension, une telle composition para-pharmaceutique peut-être un dispositif médical comme un pansement ou un dentifrice, peut être un produit d'hygiène corporelle, comme une lotion ou un dentifrice.

De plus, et de manière surprenante, l'utilisation de la composition selon l'invention permet une diminution de la biomasse des biofilms provenant de

nombreuses souches bactériennes (et même de levures lorsque la subtilisine et/ou la glucanase sont ajoutées) et permet ainsi à l'agent microbicide d'accéder aux microorganismes présents à l'intérieur du biofilm pour le traitement de l'infection à biofilm et potentialise ainsi son effet. L'utilisation de la composition selon la présente invention crée un effet synergique de la composition enzymatique et de l'agent microbicide utilisé.

En effet, alors que d'autres RNAses appartenant à la classification EC4.6.1, comme la RNase I et la RNase A (pourtant existante sur le marché au grade pharmaceutique et donc administrable au corps d'un être vivant, en particulier d'un mammifère, plus particulièrement d'un être humain) n'ont aucun effet sur les infections à biofilms ou un effet limité sur certains types de biofilms seulement, il a été mis en évidence, de manière surprenante qu'une endoribonucléase choisie spécifiquement dans la classe EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) ou EC 3.1.31 permet de réduire drastiquement la biomasse des biofilms et ainsi de potentialiser l'agent microbien qui, sans cette composition n'est pas capable d'entrer dans le biofilm et de traiter l'infection, cela pour des biofilms de souches de bactéries variées et avec une utilisation non spécifique de l'infection à biofilm à traiter ou traitée.

L'activité endoribonucléase aspécifique des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) ou EC 3.1.31 permet de digérer l'ADN et l'ARN. Contre toute attente, ces enzymes entraînent une réduction drastique de la biomasse des biofilms déjà lorsqu'ils sont utilisés seuls dans une formulation selon la présente invention, la réduction drastique de la biomasse des biofilms étant similaire à celle observée pour la formulation commerciale multi-enzymatique EnziQure®. De plus, on atteint selon la présente invention une efficacité vis-à-vis de plusieurs types de biofilms déjà avec une seule enzyme, ce qui est particulièrement avantageux dans une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique où l'on recherche le moins d'ingrédient possible pour faciliter les autorisations de mise sur le marché.

Les revendications dépendantes se réfèrent à d'autres formes d'utilisation avantageuses. Selon une première utilisation d'une composition selon la présente invention, le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'infections dermatologiques ou d'infections provoquées par des blessures superficielles ou

profondes. Ces infections bactériennes dermatologiques ou provoquées par des blessures superficielles ou profondes sont par exemple les plaies ou les brûlures. Ces infections peuvent se développer sur des plaies chroniques ou aiguës, des brûlures, au site d'insertion d'un dispositif médical. L'élimination ou la réduction du biofilm
5 accélère le processus de cicatrisation et de guérison des plaies et des brûlures.

Selon une deuxième utilisation d'une composition selon la présente invention, le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif des infections post-implantatoires associées à l'infection d'un dispositif médical implanté dans le corps
10 ou de tissus autour d'un dispositif médical implanté dans le corps. L'utilisation d'une composition selon la présente invention va permettre un traitement *in situ* du biofilm formé sur un dispositif médical implanté infecté ou sur les tissus autour dudit dispositif médical implanté. Par exemple, une prothèse implantée infectée ne devra pas être sortie du corps humain pour être nettoyée. Les tissus internes infectés et la prothèse
15 peuvent être nettoyés par administration *in situ*.

Selon une troisième utilisation selon l'invention, la composition parapharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est utilisée pour la fabrication d'un soin ou dans
20 un soin d'hygiène corporelle ou cosmétique, comme par exemple un soin pour les ongles, une solution buccale, un bain de bouche, un dentifrice, un bain oculaire, une solution de nettoyage de lentilles oculaires, une solution de nettoyage d'appareils dentaires, de prothèses dentaires, de brosses à dent, un soin pour la peau anti-acné.

Selon une autre utilisation selon l'invention, la composition parapharmaceutique ou pharmaceutique est utilisée pour nettoyer les accessoires en contact avec le corps humain, par exemple les piercings.

Avantageusement, la composition comprend, en outre, une série d'enzymes additionnelles, par exemple une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit
30 enzyme(s).

Plus particulièrement, une enzyme de ladite série d'enzymes additionnelles est choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1.), des hydrolases

d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4.), et de leur mélange.

La classe des glycosidases comprend des hydrolases de polysaccharides comme les cellulase (EC 3.2.1.4), glucanase (ex. la β 1,3 endoglucanase, comme par exemple EC.3.2.1.39, CAS 9025-37-0, CAS 37340-57-1, surtout CAS 144941-36-6, qui est la β 1,3 endoglucanase de *Bacillus subtilis*; l'endoglucanase est également appelée « Lyticase »), dispersine B (EC 3.2.1.52), hexosaminidase (EC 3.2.1.52), alpha-amylase (EC 3.2.1.1), mannanase (EC 3.2.1.78 et EC 3.2.1.101), hyaluronidase (EC 3.2.1.35), glucosidase (EC 3.2.1.21 et EC 3.2.1.20), galactosidase (EC 3.2.1.22 et EC 3.2.1.23), chitinase (EC 3.2.1.14), chitosanase (EC 3.2.1.132), fructanase (EC 3.2.1.80), dextranase (EC 3.2.1.11), lysozyme (EC 3.2.1.17) et pectinase (EC 3.2.1.15). Cette classe comprend également les polysaccharides lyase comme l'alginate lyase (EC 4.2.99.4 et EC 4.2.2.26) et l'hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1).

La classe des oxydoréductases comprend par exemple la laccase (EC 1.10.3.2), les peroxydases (EC 1.11.1) lactoperoxydase (EC 1.11.1.7), haloperoxydase (EC 1.11.2.1), myélopéroxydase (EC 1.11.2.2) et la glucose oxydase (EC 1.1.3.4).

La classe des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1) comprend par exemple la lipase (EC 3.1.1.3).

La classe des protéases et peptidases (EC 3.4.) comprend par exemple la flavourzyme ou des protéases comme la Blaze®Pro, la subtilisine (EC 3.4.21.62), la bromélaïne (EC 3.4.22.33), la collagénase (EC 3.4.24.3), la papaïne (EC 3.4.22.2), la trypsine (EC 3.4.21.4) et la protéinase K (EC 3.4.21.64). La subtilisine est préférée.

Un aspect lié de la présente invention est d'ailleurs l'utilisation de la subtilisine pour le traitement (parapharmaceutique) d'un biofilm comprenant *Candida sp.*, telle que *Candida albicans*. La subtilisine peut être appliquée seule, ou en association avec les autres enzymes ci-dessus, soit en usage séquentiel (subtilisine puis une ou plusieurs autres activités enzymatiques ou une ou plusieurs activités enzymatiques, suivie de la subtilisine), soit combiné.

Réciproquement un aspect lié de la présente invention est la subtilisine pour le traitement d'un biofilm comprenant *Candida sp.*, telle que *Candida albicans*

chez un patient. La subtilisine peut être administrée seule, ou en association avec les autres enzymes ci-dessus, soit en usage séquentiel (subtilisine puis une ou plusieurs autres activités enzymatiques ou une ou plusieurs activités enzymatiques, suivie de la subtilisine), soit combiné.

5 Ainsi, un aspect lié de la présente invention est une méthode de traitement d'un biofilm comprenant *Candida sp.*, telle que *Candida albicans*, la méthode comprenant les étapes suivantes :

-on fait réagir le biofilm avec la subtilisine ;

- on applique (administre) un antifongique.

10 Cette méthode comprend avantageusement les étapes additionnelles suivantes d'appliquer une ou plusieurs autres activités enzymatiques sur le biofilm et/ou d'appliquer (administrer) un antiinfectieux, par exemple un antibiotique.

15 Dans un mode de réalisation préféré de l'utilisation d'une composition selon la présente invention comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et/ou EC 3.1.31, ou la subtilisine, la composition comprend, au moins une deuxième enzyme choisie dans le groupe des glycosidases (EC 3.2.1).

20 Dans un autre mode de réalisation préféré de l'utilisation d'une composition selon la présente invention comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) ou la subtilisine, la composition comprend au moins une troisième enzyme choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), désoxyribonucléases (EC 3.1.21), oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des peptidases et des protéases (EC 25 3.4), et de leur mélange, en particulier choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1) et des peptidases (EC 3.4) (l'ajout d'une peptidase n'est pas préféré lorsque l'enzyme selon l'invention est la subtilisine).

30 Dans un autre mode de réalisation préféré de l'utilisation d'une composition selon la présente invention comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) ou la subtilisine, la composition comprend au moins une quatrième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des

peptidases (EC 3.4) (l'ajout d'une protéase ou d'une peptidase n'est pas préféré lorsque l'enzyme selon l'invention est la subtilisine) pour la fabrication d'un médicament pour le traitement et/ou la prévention de maladies post-implantatoires associées à l'infection d'un dispositif médical implanté dans le corps.

5 Dans un mode de réalisation de l'utilisation d'une composition selon la présente invention, le dispositif médical est un implant orthopédique.

Dans une utilisation particulière de la composition selon la présente invention, le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection
10 bactérienne de tissus entourant un implant orthopédique implanté ou de l'implant orthopédique implanté.

Lorsque la subtilisine et/ou la lyticase (β 1,3 endoglucanase) est présente dans la composition selon l'invention, ou ajoutée, la composition selon l'invention est utilisée (également) pour le traitement et/ou la prévention d'infection
15 par *Candida sp.* (*Candida albicans*) impliquées dans le biofilm, y compris de biofilms mixtes comprenant *Candida* et une ou plusieurs espèces bactériennes, soit les biofilms les plus difficiles à traiter.

Dans une autre utilisation particulière de la composition selon la présente invention le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes
20 impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant dentaire implanté ou de l'implant dentaire implanté.

Dans encore une autre utilisation particulière de la composition selon la présente invention (comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30
25 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2), le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain,
30 un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée ou d' un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de

contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée.

Alternativement pour la composition selon la présente invention comprenant la subtilisine, le traitement et/ou la prévention d'infections comprenant
5 *Candida Sp. (Candida albicans)* impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection fongique (potentiellement en plus d'une infection bactérienne) de

tissus entourant un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une
10 prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée ou

d'un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration
15 artificielle ou une vis implantée.

Dans une utilisation avantageuse de la composition selon la présente invention (comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2), le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition
20 sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'un support tissé ou non tissé imprégné de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Le support peut être une mousse, une éponge, un film, pansement hydrocolloïde, un pansement à base d'alginate, de polyuréthane, un hydrogel, une
25 compresse de gaze, un bandage, une lingette, un pansement , ...

Dans une autre utilisation avantageuse de la composition selon la présente invention (comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et/ou la subtilisine), le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une
30 application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus, de préférence une application d'un pansement sous forme de gel comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Dans une autre utilisation avantageuse de la composition selon la présente invention (comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2)), le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une solution aqueuse, de préférence tamponnée de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, par infiltration, par irrigation, par injection, par application percutanée, par inhalation, par bain de bouche ou bain oculaire, par tamponnage.

La solution aqueuse de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon la présente invention est par exemple sous forme concentrée ou sous forme diluée et/ou prête à l'emploi.

Dans encore une autre utilisation avantageuse de la composition selon la présente invention (comprenant des enzymes appartenant aux classes EC 3.1.30 (EC.3.1.30.1 ou EC.3.1.30.2) et/ou la subtilisine), le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une pâte ou d'une solution visqueuse comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, comme par exemple d'un dentifrice.

Avantageusement, selon la présente invention, ledit agent microbicide, en particulier ledit antibiotique, phage, antifongique ou ledit désinfectant et ladite composition forment un produit de combinaison pour un emploi simultané, séparé ou échelonné dans le temps.

D'autres formes de réalisation de l'utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain suivant la présente l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

La présente invention se rapporte également à une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain comprenant au moins une enzyme endoribonucléase choisie parmi les classes EC 3.1.30, plus particulièrement de la classe EC 3.1.30.2, et EC 3.1.31, de préférence à une teneur de 10 à 1000U/ml, de préférence 50 à 500U/ml, de

préférence de 100 à 500U/ml, comme par exemple de 200 U/ml à 650 U/ml, plus particulièrement de 250 U/ml à 550 U/ml, de manière préférée de 300 U/ml, voire de 350 U/ml à 500 U/ml et éventuellement un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables. Cela présente l'avantage que l'enzyme endoribonucléase a une activité sur l'ARN et sur l'ADN et permet une digestion de la matrice du biofilm, ce qui peut ainsi potentialiser l'effet d'un agent microbicide tout en permettant une utilisation d'un nombre restreint d'enzyme.

Avantageusement, ladite au moins une enzyme endoribonucléase de la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon la présente invention, est d'origine bactérienne. De manière particulièrement avantageuse, l'enzyme endoribonucléase provient de *Serratia marcescens*.

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre, une série d'enzymes additionnelles, par exemple une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit enzyme(s).

Avantageusement, la composition selon la présente invention, comprend une enzyme de ladite série d'enzymes additionnelles de ladite composition est choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1) et des peptidases (EC 3.4), et de leur mélange

Plus particulièrement, selon la présente invention, la composition comprend au moins une deuxième enzyme choisie dans le groupe des glycosidases (EC 3.2.1), par exemple la dispersine B, une cellulase ou une endoglucanase (β 1,3 endoglucanase, lyticase).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend en outre, au moins une troisième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des peptidases et des protéases (EC 3.4), par exemple la dispersine B, une cellulase ou une glucanase (β 1,3 endoglucanase, lyticase) et une protéase, telle la subtilisine, ou deux enzymes choisies parmi par exemple la dispersine B, une cellulase et la glucanase (β 1,3 endoglucanase, lyticase).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend au moins une quatrième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1) ;
5 des peptidases et des protéases (EC 3.4), par exemple la dispersine B, une cellulase et la glucanase (β 1,3 endoglucanase, lyticase), ou une protéase, telle la subtilisine et deux enzymes choisies parmi la dispersine B, une cellulase et la glucanase (β 1,3 endoglucanase, lyticase).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend au moins une cinquième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des peptidases et des protéases (EC 3.4), par exemple une protéase, telle la subtilisine, et la dispersine B, une cellulase et la glucanase (β 1,3 endoglucanase,
10 lyticase).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend au moins une sixième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des
20 peptidases et des protéases (EC 3.4).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend au moins une septième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1),
25 des peptidases et des protéases (EC 3.4).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend au moins une huitième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des peptidases et des protéases (EC 3.4).
30

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend en outre au moins un agent microbicide comme un antibiotique, un antifongique, un antiseptique, un ou plusieurs peptides microbicides

ou des phages, ou un antibiotique et un antifongique, conditionné séparément ou avec ladite endoribonucléase.

De manière préférée, la molécule microbicide est choisie dans le groupe constitué des fluoroquinolones, des glucopeptides, des lipoglucopeptides, de l'acide fusidique, des pénicillines, des céphalosporines, des carbapénèmes, des monobactames, des polymixines, des bêta-lactames, des macrolides, des lincosamides, des oxazolidinones, des phénicoles, des tétracyclines, des aminoglycosides, des rifamycines, des nitrofuranes, des sulfamides, des nitroimidazoles des antifongiques (échinocandines, fluorocytosines, azoles, griseofulvines, amphotéricine), des enzymes lytiques (par exemple les endolysines ou le lysozyme), de N-acétylcystéine, des ammonia quaternaires, des biguanides, des aminés, des amidines, des dérivés halogénés (dont notamment la chlorhexidine), des peptides microbicides, des dérivés de l'argent (Ag), de H₂O₂, des peracides, des dérivés phénoliques, des aldéhydes, des alcools, des phages et de leurs mélanges.

Dans une autre forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre un inhibiteur de quorum sensing.

On peut encore prévoir comme composés additionnels, une ou plusieurs enzymes qui inhibent le « quorum sensing » au sein des biofilms. Le quorum sensing est un moyen de communication entre les cellules bactériennes qui leur permet de coordonner une action dans toute la population. Le quorum sensing régule entre-autre la formation de biofilms (étapes précoces en général), sur base de la sécrétion et la diffusion d'acyl homosérine lactone (chez les Gram-) ou des peptides (chez les Gram+), lesquels sont reconnus spécifiquement par les cellules de la même population. En particulier, on peut citer l'acylase I et le 2(5H)-furanone .

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre, un tampon enzymatique choisi dans le groupe constitué du Tris-HCl, TGN, TBS, PBS, HEPES, MES, PIPES, MOPS, BES, TES, tampon phosphate et tampon citrate, contenant ou non de 0 à 2 mM de MgCl₂, contenant de 0 à 2mM CaCl₂, et de 0 à 500 mM de NaCl.

Dans une autre forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre, un tampon enzymatique comprenant 0 à 50% d'agent de stabilisation (polyol, arginine, formiate de calcium, glucose).

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre, au moins un tensio-actif.

Dans une forme de réalisation préférée, la composition selon la présente invention, comprend, en outre, au moins un conservateur et/ou un séquestrant et/ou un dispersant.

Dans une forme de réalisation préférée, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon la présente invention, est sous forme de solution, par exemple un bain de bouche, un bain oculaire, une lotion, une solution d'irrigation, une solution de nettoyage des prothèses dentaires, des brosses à dents.

Dans une autre forme de réalisation préférée, la composition est un pansement hydrophile, par exemple un hydrogel.

Dans une variante selon la présente invention, la composition est sous forme immobilisée sur un support tissé ou non tissé, sec ou sur un dispositif médical ou sous forme imprégnée sur un support tissé ou non tissé.

Dans une autre variante avantageuse de la présente invention, la composition est sous forme d'une composition topique.

Dans encore une autre variante avantageuse de la présente invention, la composition est sous forme d'une solution stérile administrable par infiltration par irrigation, par injection, par application percutanée et par inhalation.

La présente invention se rapporte aussi à une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, pour utilisation en tant que potentialisateur d'un agent microbicide, en particulier un antibiotique, un antifongique, ou un désinfectant, dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm.

Dans une forme de réalisation particulière selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement et/ ou une prévention des infections dermatologiques aiguës ou chroniques ou d'infections provoquées par des blessures (brûlures et/ou plaies) superficielles ou profondes.

Dans une forme de réalisation particulière selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans traitement curatif et/ou préventif des infections post-implantatoires associées à l'infection de tissus autour d'un dispositif médical implanté dans le corps
5 ou d'un dispositif médical implanté dans le corps.

Dans une forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans un soin d'hygiène corporelle ou cosmétique, comme par exemple un soin pour les ongles, une solution buccale, un bain de bouche, un dentifrice, un bain oculaire, une solution de nettoyage de lentilles oculaires, un soin
10 pour la peau anti-acné.

Dans une autre forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant orthopédique implanté ou de l'implant orthopédique implanté.
15

Dans une autre forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant dentaire implanté ou de l'implant dentaire implanté.
20

Dans une autre forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de
25

tissus entourant un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée ou bien

d'un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée.
30

Dans encore une autre forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'un support tissé ou non tissé imprégné de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique ou sur lequel ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est immobilisée, à sec.

Dans encore une autre forme de réalisation avantageuse selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus, de préférence une application d'un pansement sous forme de gel, plus particulièrement un hydrogel comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Dans une variante selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus, de préférence une application d'un pansement sous forme de gel, plus particulièrement un hydrogel comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Dans une variante selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une solution aqueuse, de préférence tamponnée de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, par infiltration, par irrigation, par injection, par application percutanée, par inhalation, par bain de bouche ou bain oculaire, par tamponnage, par bain de trempage.

Dans une autre variante selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation dans le

traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une pâte ou d'une solution visqueuse comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, comme par exemple d'un dentifrice.

Dans encore une autre variante selon la présente invention, la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est prévue pour une utilisation comme produit de combinaison pour un emploi simultané, séparé ou échelonné dans le temps.

Enfin, la composition selon la présente invention est prévue pour une utilisation chirurgicale.

D'autres formes de réalisation de la composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux dessins et aux exemples.

La figure 1 est un graphique qui illustre la diminution du pourcentage de biomasse du biofilm de plusieurs souches de *Staphylococcus aureus*, suite à une mise en contact avec une composition selon l'invention avec une concentration de 500 U/ml pour la denarase.

La figure 2 est un graphique qui illustre la diminution du pourcentage de biomasse du biofilm formés par différentes souches de *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, suite à une mise en contact avec une composition selon l'invention avec une concentration de 100 U/ml pour la denarase en comparaison avec une composition comprenant 100 U/ml de RNase I, avec une composition comprenant 100 U/ml pour chaque enzyme d'un mélange de RNase 1, RNase A et DNase 1.

La figure 3 est une série de quatre graphiques qui illustre la diminution du pourcentage de biomasse du biofilm de différentes souches de *S. aureus* et *S. epidermidis*, suite à une mise en contact avec une composition selon l'invention avec une concentration de 500 U/ml pour la denarase en comparaison avec une

composition comprenant un cocktail enzymatique CDD comprenant 500 U/ml de denarase, 0.06 U/ml de dispersine B et 7 U/ml de cellulase, en comparaison avec une composition comprenant 0.06 U/ml de dispersine B, en comparaison avec une composition comprenant 7 U/ml de cellulase.

5 La figure 4 est une série de trois graphiques qui illustre la diminution du pourcentage de biomasse du biofilm de multiples souches de *S. aureus* et *S. epidermidis*, suite à une mise en contact avec une composition comprenant seulement 500 U/ml de denarase, en comparaison avec une composition comprenant un cocktail enzymatique comprenant 500 U/ml de denarase et 0.06
10 U/ml de dispersine B, en comparaison avec une composition comprenant un cocktail enzymatique comprenant 500 U/ml de denarase et 7 U/ml de cellulase.

La figure 5 est une série de deux graphiques qui illustre la diminution du pourcentage de biomasse du biofilm de différentes souches de *p. aeruginosa*, suite à une mise en contact avec une composition comprenant 500 U/ml de
15 denarase, en comparaison avec une composition comprenant un cocktail enzymatique CDD comprenant 500 U/ml de denarase, 0.06 U/ml de dispersine B et 7 U/ml de cellulase.

La figure 6 est une série de 4 graphiques qui illustre la diminution de la viabilité (exprimée $\log_{10}(\text{CFU/ml})$) du biofilm de *S. aureus* ATCC33591 après un
20 traitement curatif du biofilm avec une composition selon l'invention comprenant de la denarase à 500 U/ml suivi de 24h d'incubation avec différentes concentrations en vancomycine de 0, 10, et 20 mg/L, ainsi que la diminution de la biomasse (exprimée en absorbance à 570nm) du biofilm de *S. aureus* ATCC33591 après un traitement curatif du biofilm avec une composition selon l'invention comprenant de la
25 denarase à 500 U/ml suivi de 24h d'incubation avec différentes concentrations en vancomycine de 0, 10, et 20 mg/L.

La figure 7 est une série de 3 graphiques qui illustre la viabilité dans le biofilm de *S. aureus* ATCC33591 exprimée en $\log_{10}(\text{CFU/ml})$ après un traitement curatif du biofilm avec une composition comprenant un cocktail enzymatique CDD
30 comprenant 500 U/ml de denarase, 7 U/ml de cellulase et 0.06 U/ml de dispersine B suivi de 24h d'incubation avec 0 mg/L ou 20mg/L de vancomycine, en comparaison avec une composition comprenant un cocktail enzymatique BDD comprenant 500 U/ml de denarase, 1% v/v de BlazePro et 0.06 U/ml de Dispersine B suivi de 24h

d'incubation avec 0 mg/L ou 20mg/L de vancomycine, en comparaison avec une composition comprenant un cocktail enzymatique FDD comprenant 500 U/ml de denarase, 1% v/v de Flavourzyme et 0.06 U/ml de Dispersine B suivi de 24h d'incubation avec 0 mg/L ou 20mg/L de vancomycine.

5 La figure 8 représente l'effet de différentes concentrations en vancomycine (0 et 20mg/L) sur la viabilité exprimée en \log_{10} (CFU/ml) sur le biofilm de différentes souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* après un traitement curatif avec différentes compositions tri-enzymatiques. La composition tri-enzymatique CDD comprend un cocktail enzymatique composé de 7 U/ml de cellulase, 0.06 U/ml de dispersine B et de 500 U/ml de denarase, en comparaison avec une composition enzymatique CDD2 comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 70 U/ml de cellulase, de 0.32 U/ml de dispersine B et de 500 U/ml de denarase, en comparaison avec une composition enzymatique ADD comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 70 U/ml de cellulase, 2000 U/ml d'alpha-amylase et de 500 U/ml de denarase.

La figure 9 représente l'effet de 20 mg/L de vancomycine sur la biomasse exprimée en % et la viabilité exprimée en \log_{10} (CFU/ml) du biofilm de différentes souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* formé en présence de compositions selon l'invention. La composition tri-enzymatique CDD2 comprend un cocktail tri-enzymatique composé de 70 u/ml de cellulase, 0.32 U/ml de dispersine B et 500 U/ml de denarase ; en comparaison avec une composition enzymatique ADD comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 70 U/ml de cellulase, de 2000 U/ml d'alpha-amylase et de 700 U/ml de denarase.

La Figure 10 représente l'effet de différentes concentrations en vancomycine (0 et 20mg/L) sur la viabilité exprimée en \log_{10} (CFU/ml) du biofilm de *S. aureus* ATCC33591 et *S. epidermidis* ATCC35984_ formé en présence de compositions selon l'invention. La composition enzymatique CDD comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 7 U/ml de cellulase, 0.06 U/ml de dispersine B et 500 U/ml de denarase; La composition enzymatique CDD2 comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 70 U/ml de cellulase, 0.32 U/ml de dispersine B et de 500 U/ml de denarase; en comparaison avec une composition enzymatique ADD comprenant un cocktail tri-enzymatique composé de 70 U/ml de cellulase, de 2000 U/ml d'alpha-amylase et de 500 U/ml de denarase.

Sur les figures, les éléments identiques ou analogues portent les mêmes références

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront tirés de la description non limitative qui suit, et en faisant référence aux dessins et aux
5 exemples.

Efficacité d'une composition selon l'invention pour réduire la biomasse des biofilms impliqués dans des infections du corps humain

Afin de tester l'efficacité d'une composition selon l'invention, comprenant au moins une enzyme endoribonucléase, plusieurs expériences ont été
10 menées sur différentes souches bactériennes (isolats cliniques et souches de collection ATCC) (Tableau 1).

Tableau 1.-

Isolat/souche	espèce	origine
ATCC29213	<i>S. aureus</i> MSSA	Plaie (collection ATCC)
ATCC33591	<i>S. aureus</i> MRSA	Isolat clinique (collection ATCC)
7832	<i>S. aureus</i> MRSA	Plaie profonde
7841	<i>S. aureus</i> MRSA	Plaie superficielle
1142-004	<i>S. aureus</i> MSSA	Plaie
1144-20	<i>S. aureus</i> MSSA	Plaie
ATCC35984	<i>S. epidermidis</i> MRSE	Cathéter veineux (collection ATCC)
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Plaie
ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i>	Sang infecté (collection ATCC)
618	<i>P. aeruginosa</i>	Plaie superficielle

L'effet d'un traitement avec la composition selon l'invention sur la
15 biomasse des biofilms a été étudié dans un modèle statique en plaques 96 puits. Le traitement enzymatique curatif est réalisé sur un biofilm préformé de 24h. Pour tester son efficacité à réduire la biomasse des biofilms, la composition selon l'invention est mise en contact avec le biofilm pendant 1h à 37°C. La solution enzymatique est ensuite retirée, et la biomasse détachée est éliminée par des étapes de lavage. Le
20 colorant cristal violet (CV) est ensuite utilisé pour quantifier la biomasse résiduelle. Ce

dernier interagit avec les cellules mortes et vivantes, et les macromolécules de la matrice extracellulaire du biofilm (comme l'ADN et les exopolysaccharides). Le marquage au CV est quantifié par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 570 nm.

5 **1.1 méthode de culture, de traitement enzymatique, de quantification de la biomasse et d'analyse des résultats**

Les différentes souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Table 1) ont été ensemencées dans 5ml de milieu de culture TGN (Tryptic Soy Broth VWR + 1% glucose + 2% NaCl) à partir de 20 µl d'un stock glycérolé conservé à -80°C. Les souches ont
10 ensuite été incubées à 130 rpm en aérobie à 37°C. Après 18h de croissance, les précultures ont été diluées dans du TGN pour atteindre une densité optique à 620 nm (DO_{620}) de 0,05, ce qui correspond à +/- $5 \cdot 10^6$ CFU/ml. Deux cents microlitres de chaque culture (n = 4 pour chaque condition testée) ont été placés dans les puits d'une plaque 96 puits et incubés à 37°C sans agitation pendant 24h pour permettre
15 la formation du biofilm. Les biofilms sont ensuite lavés 2X avec 200µl PBS pH 7,5 (Sigma) afin d'éliminer les cellules planctoniques (i.e. non-adhérentes au biofilm). La composition selon l'invention ou les compositions contrôles CT- (contrôle négatif) et CT+ (contrôle positif) (200 µl) sont ajoutées sur le biofilm lavé et le biofilm est incubé pendant 1h à 37°C (n=4 pour chaque condition). Les plaques sont ensuite vidées, le
20 biofilm est lavés 2X avec 200µl PBS pH 7,5 (Sigma) et séché à 60°C pendant 18h avant d'analyser la biomasse.

Pour quantifier la biomasse résiduelle, une solution de CV 1% (Sigma) est ajoutée sur les biofilms à température ambiante pendant 15'. Le colorant non fixé est ensuite lavé à l'eau distillée. Le colorant fixé au biofilm est ensuite détaché
25 et dissous avec de l'acide peracétique 66% et l'absorbance à 570 nm (A_{570}) est mesurée dans un lecteur multimode SpectraMax M3. Cette valeur d'absorbance correspond à la biomasse du biofilm.

Pour analyser l'effet des compositions selon l'invention, un test statistique (one-way ANOVA et test post-hoc de Tukey) est réalisé en comparant les
30 valeurs d'absorbance des biofilms non traités (contrôle négatif, CT- = traitement avec du tampon sans enzyme) et des biofilms traités avec les compositions enzymatiques dont un contrôle positif, CT+. Ce contrôle positif comprend un colorant, deux tensioactifs non-anioniques, un séquestrant, un conservateur, un stabilisant enzymatique, un solvant, sept enzymes dont deux protéases (EC 3.4), une
35 laccase (EC 1.10.3.2), une mannanase (EC 3.2.1.78 et EC 3.2.1.101), une amylase (EC

3.2.1.1) et une lipase (EC 3.1.1.3). La différence est significative lorsque la pvalue du test statistique est inférieure ou égale à 0.05 (caractère * représenté sur les graphes). Lorsque cela est précisé dans les exemples comparatifs, l'activité des compositions enzymatiques sont comparées entre elles (one-way ANOVA et test post-hoc Tukey).

5

1.2 Résultats

Exemple 1.- composition selon l'invention contenant de la denarase dans du TGN.

Premièrement, une composition comprenant de la denarase (c-Lecta), qui est une endoribonucléase de *S. marcescens* appartenant à la classe enzymatique EC 3.1.30, a été testée à une concentration de 500 U/ml dans du TGN. Le contrôle négatif (CT-) est composé de TGN uniquement. L'absorbance A_{570} du CV mesurée sur le CT- correspond à 100% de biomasse. Comme illustré à la figure 1, le pourcentage de biomasse d'un biofilm de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 33591, 7832, 7841, 1142-004 et 1144-20 diminue respectivement de 75%, 76%, 72%, 71%, 47% et 52%. L'analyse statistique (ANOVA et test post-hoc de tukey indique que dans tous les cas, cette différence est significative ($pvalue \leq 0,05$) par rapport au CT-. Cette diminution suggère que l'effet d'un agent microbicide sera potentialisé après traitement du biofilm avec la denarase.

15

comparaison de l'efficacité de la composition de l'exemple 1 avec d'autres endoribonucléase.

20

L'effet sur la biomasse de la denarase a été comparé à ceux d'un contrôle négatif (TGN), d'un contrôle positif (EnziQure^R 1% dans du TGN ; OneLife sa), et de compositions contenant de la RNase I uniquement (endoribonucléase *Escherichia coli* ; classe EC4.6.1; ThermoFisher Scientific), et un mélange de RNase I, RNase A (endoribonucléase bovine de la classe EC 4.6.1 ; ThermoFisher Scientific) et DNase I (endodeoxyribonucléase bovine de la classe EC 3.1.21; ThermoFisher Scientific).

25

Les compositions sont reprises au tableau 2.

Tableau 2.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 1 (Ex. 1)	Denarase	100 U/ml	TGN
Exemple comparatif 1 (EC. 1)	RNase I	100 U/ml	TGN

Exemple comparatif 2 (EC. 2)	RNase I, RNase A et DNase I	100U/ml de chaque enzyme	TGN
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	TGN
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	TGN

Ces tests ont été effectués dans le but de comparer l'effet disruptif de biofilms des différentes nucléases à 100 U/ml dans du TGN. Ces compositions ont été testées sur un biofilm de 24h de *S. aureus* ATCC33591 et 7832, et *S.epidermidis* ATCC35984 (n = 4) en suivant le protocole décrit au point 1.1.1.

La figure 2 montre que la RNase I (endoribonucléase) selon l'exemple comparatif EC1 a peu ou pas d'effet significatif sur la diminution du pourcentage de biomasse des biofilms (1 biofilm/3 est réduit significativement par rapport à CT-). L'ajout de RNase A (endoribonucléase) et de DNase I (endodeoxyribonucléase) en plus de la RNase I selon l'exemple comparatif EC2 améliore légèrement l'activité disruptive de la composition de l'exemple comparatif EC1A (2 biofilms/3 sont significativement réduits). De manière intéressante, la denarase (exemple 1) (endoribonucléase) réduit significativement la biomasse de 2 biofilms/3, comme le mélange de nucléase EC2, mais de manière plus efficace : 46% vs. 30% pour la souche ATCC33591 et 37% vs 13% pour la souche ATCC35984. Etant donné que l'activité endoribonucléase aspécifique de la denarase permet de digérer à la fois l'ADN et l'ARN, il est inattendu de constater qu'une endoribonucléase choisie spécifiquement dans la classe EC 3.1.30 ou EC 3.1.31 permet une réduction plus efficace de la biomasse des biofilms qu'un mélange DNase I – Rnase I - RNase A. Les raisons scientifiques de cette observation ne sont à ce jour pas connues.

1.2.3 comparaison de l'efficacité de la denarase en traitement curatif avec d'autres composition enzymatiques

L'activité anti-biomasse en traitement curatif de la denarase (500U/ml) a ensuite été comparée à celle de la cellulase (Sigma ; 7U/ml) et de la dispersine B (GIGA ; 0,06 U/ml), et à celle d'un cocktail tri-enzymatique composé de denarase, cellulase et dispersine B aux mêmes concentrations. Ces 4 compositions (Ex1, EC3, EC4 et Ex 2) ont été testées sur les biofilms de *S. aureus* ATCC33591, ATCC29213 et *S. epidermidis* ATCC35984 en suivant le protocole détaillé au point 1.1.1, excepté que les mélanges ont été réalisés dans un tampon Tris-HCl 20mM pH 7. Dans cette

expérience, le CT- est le Tris-HCl 20mM pH 7 sans enzyme et sa biomasse correspond à 100%. Le CT+ est composé de 1% d'EnziQure[®] dans ce même tampon. Les compositions sont reprises au tableau 3.

Tableau 3.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 2 (Ex. 2)	Denarase	500U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple comparatif 3 (EC. 3)	Cellulase	7U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple comparatif 4 (EC. 4)	Dispersine B	0,06U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple 3 (Ex. 3)	Denarase, cellulase et dispersine B	500 U/ml 7 U/ml 0,06 U/ml	Tris-HCl 20mM
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	Tris-HCl 20mM
Contrôle positif CT+	EnziQure [®]	1%	Tris-HCl 20mM

5

On peut constater sur la Figure 3 que la composition comprenant la denarase (Ex.2) est la composition (Figure 3A) permettant la plus grande diminution de la biomasse de chacun des biofilms avec une diminution significative et supérieure à 80 % de la biomasse des 3 biofilms testés (Figure 3A). La cellulase (EC. 3) (Figure 3B) n'a en effet aucun effet significatif et la dispersine B (EC. 4) (Figure 3C) diminue le biofilm de 70% (ATCC29213) à 27% (ATCC33591). Le mélange des 3 enzymes (Ex. 3)(Figure 3D) est aussi efficace que la denarase seule (Ex.2) sur 2 biofilms/3. Cependant, la composition de l'exemple 3 est moins efficace que la denarase de l'exemple 2 sur le biofilm de la souche ATCC29213. Ces résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales testées, il n'existe pas d'effet synergique entre la denarase, la cellulase et la dispersine B.

15

1.2.4 comparaison de l'activité disruptive de la biomasse

Pour confirmer l'absence de synergie entre la denarase, la cellulase et la dispersine B, l'activité disruptive de la biomasse de la denarase ([Exemple 2 (Ex.2)] - (Figure 4A) a été comparée à celle de duos enzymatiques denarase + dispersine B ([Exemple 4 (Ex.4)] - (Figure 4B) et denarase + cellulase - ([Exemple 5

20

(Ex.5)] (Figure 4C). Les souches, conditions expérimentales et concentrations enzymatiques utilisées sont les mêmes que dans l'expérience décrite plus haut. Dans cette expérience, le CT- est le Tris-HCl 20mM pH 7 sans enzyme et sa biomasse correspond à 100%. Le CT+ est composé de 1% d'EnziQure[®] dans ce même tampon.

5 Les compositions testées sont reprises au tableau 4.

Tableau 4.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 2 (Ex. 2)	Denarase	500U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple 4 (Ex. 4)	Denarase et Dispersine B	500U/ml et 0,06 U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple 5 (Ex. 5)	Denarase et cellulase	500U/ml et 7 U/ml	Tris-HCl 20mM
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	Tris-HCl 20mM
Contrôle positif CT+	EnziQure [®]	1%	Tris-HCl 20mM

De manière similaire à ce qui a été observé précédemment, les résultats obtenus indiquent que l'ajout de dispersine B (Exemple 4 - Figure 4B) ou de cellulase (exemple 3 - Figure 4C) n'augmente pas l'activité de la denarase de l'exemple 2 de manière significative sur les souches de staphylocoques testées (Figure 4A). Nous n'observons donc pas d'effet synergique associé au cumul de la denarase avec la cellulase ou la dispersine B.

1.2.5 comparaison de l'activité disruptive sur *P. aeruginosa*

15 L'activité disruptive du biofilm de la denarase selon l'exemple 1 (500U/ml) et d'un mélange tri-enzymatique selon l'exemple 6 composé de dénarase (500U/ml), cellulase (7U/ml) et dispersine B (0,06U/ml) a été testée sur 3 souches de *P. aeruginosa* (PAO1, ATCC27853 et 618) en traitement curatif (tampon TGN). Dans cette expérience, le CT- est le TGN sans enzyme et sa biomasse correspond à 100%.
20 Le CT+ est composé de 1% d'EnziQure[®] dans ce même tampon.

Les compositions testées sont reprises au tableau 5.

Tableau 5.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
-----------------------	--------	---------------	--------

Exemple 1 (Ex. 1)	Denarase	500U/ml	TGN
Exemple 6 (Ex. 6)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml et 0,06U/ml 7 U/ml	TGN
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	TGN
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	TGN

Les résultats présentés à la Figure 5 montrent que la denarase (Ex.1 ; Fig. 5B) et la composition tri-enzymatique de l'exemple 6 (Ex. 6 ; Fig. 5A) sont aussi efficaces pour réduire la biomasse des 3 biofilms testés avec des réductions de 94%, 85% et 44% de la biomasse des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1, ATCC27853 et 618, respectivement, en présence de denarase. On n'observe pas de différence significative entre les 2 compositions. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de synergie entre la denarase, la cellulase et la dispersine B pour réduire la biomasse des biofilms de *P. aeruginosa*. En outre, de manière intéressante, la denarase et la composition de l'exemple 6 est plus efficace que le détergent multi-enzymatique enziQure (CT+ ; contient 7 enzymes) pour diminuer la biomasse du biofilm de *P. aeruginosa* 618.

Efficacité d'une composition selon l'invention en combinaison avec un microbicide pour réduire la biomasse et la viabilité des biofilms impliqués dans des infections du corps humain

Pour les essais présentés ci-dessous, la vancomycine a été utilisée comme molécule antibiotique. L'antibiotique est ajouté à différentes concentrations dans du TGN pendant 24h à 37°C sur les biofilms prétraités avec la composition enzymatique selon l'invention (voir les sections suivantes). Le biofilm est ensuite lavé avant d'effectuer les mesures de biomasse et de viabilité.

Deux modèles de biofilms différents ont été utilisés : biofilm statique en plaque 96 puits (tel que décrit précédemment) et le biofilm sur coupons de Titane. Le titane a été choisi car c'est un matériel largement utilisé dans la fabrication des implants (ex. prothèses orthopédiques, implants dentaires, valves cardiaques, pacemaker,...). Les techniques utilisées pour mesurer la viabilité diffèrent entre les 2 modèles et sont détaillées plus bas.

2.1 biofilm en plaques 96 puits

Dans ce modèle, la viabilité cellulaire a été mesurée de manière indirecte, en mesurant le métabolisme des cellules du biofilm. En effet, la viabilité a été quantifiée en suivant l'évolution de la couleur de la resazurine (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10 oxide) (prestoBlue, ThermoFisher). Ce composé de couleur bleu devient rose lorsqu'il est réduit en resorufin par l'activité redox du biofilm, activité qui est directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives dans le biofilm. La quantification de la resorufin est réalisée par mesure de la fluorescence. Pour corréliser le nombre de cellules présentes dans le biofilm au signal fluorescent, une courbe de calibration est réalisée dans chaque expérience en mesurant le signal fluorescent émis par des différentes concentrations cellulaires connues.

2.1.1 méthode de culture, de traitement enzymatique, de quantification de la biomasse et de la viabilité et d'analyse des résultats

La méthode expérimentale pour cultiver les souches et former le biofilm est décrite au point 1.1 de ce document. Après 24h de formation du biofilm à 37°C dans les puits de la plaque 96 puits, le biofilm a été lavé 2X avec du PBS (200µl) et traité pendant 1h à 37°C avec la composition selon l'invention ou les compositions contrôles (CT- et CT+) (n= 4 pour chaque condition testée). Le biofilm est ensuite lavé 2X avec du PBS (200µl). Deux cents microlitres de différentes concentrations en vancomycine préparée dans du TGN sont ensuite ajoutées sur le biofilm et la plaque est incubée 24h à 37°C. Les biofilms qui ne sont pas traités à la vancomycine sont incubés en présence de TGN uniquement. Les biofilms sont ensuite lavés 2X avec du PBS (200µl) avant d'analyser la biomasse et la viabilité. La biomasse est quantifiée par la technique de coloration au CV en suivant la procédure décrite au point 1.1. Pour l'analyse de la biomasse, le réactif prestoBlue (ThermoFisher) est dilué 10X dans du milieu de culture CA-MHB (VWR) et 200µl sont ajoutés dans les puits. Pour effectuer la droite de calibration, le biofilm de deux échantillons CT- non traités aux enzymes, ni à la vancomycine est détaché et homogénéisé dans 100µl de CA-MHB et différentes dilutions de cet échantillon sont réalisées dans du CA-MHB (de 10 en 10). Dix microlitres de chaque dilution sont ensuite étalés sur boîte TSA pour effectuer un comptage bactérien. Cents microlitres d'un mélange prestoBlue dilué 5X-CaMHB sont ensuite ajoutés dans les 90 µl des

différentes dilutions. La plaque contenant tous les échantillons est ensuite incubée pendant 24h à 37°C dans le lecteur de plaque spectraMax M3. La fluorescence est mesurée toutes les 10 minutes pendant 18h (excitation 560nm, émission 590nm).

Pour analyser l'effet des compositions selon l'invention, un test statistique (one-way ANOVA et test post-hoc de Tukey) est réalisé. Ce test compare les valeurs de fluorescence (viabilité) ou d'absorbance à 570 nm (biomasse) du contrôle négatif CT- (= traitement avec du tampon sans enzyme) et des biofilms traités avec les compositions enzymatiques, et ce à chaque concentration en vancomycine. La différence est significative lorsque la p-valeur du test statistique est inférieure ou égale à 0.05 (caractère * représenté sur les graphes). Lorsque cela est précisé dans les exemples comparatifs, l'activité des compositions enzymatiques sont comparées entre elles (one-way ANOVA et test post-hoc Tukey).

2.1.2 Résultats

La figure 6 illustre l'effet potentialisé d'un agent microbicide (la vancomycine) par la composition de l'exemple 1 ou de l'exemple 2 comprenant de la denarase sur le biofilm de *S. aureus* ATCC33591. La composition a été testée dans du TGN (Ex. 1 - Fig. 6A et 6C) et dans du TrisHCl 20mM pH7 (Ex. 2 - Fig. 6B et 6D). Les contrôles CT- et CT+ sont composés de tampon sans enzymes. Les contrôles CT+ sont composés d'1% d'enziQure^R (v/v) dans du tampon (TGN ou TrisHCl 20mM). Après un traitement enzymatique d'1h à 37°C, les biofilms ont été incubés 24h à 37°C en présence des concentrations suivantes en vancomycine : 0 mg/L, 10 et 20 mg/L.

Les résultats de viabilité obtenus (Fig. 6A et 6B) montrent qu'en l'absence de traitement enzymatique, la vancomycine (10 mg et 20mg/L) ne diminue pas (Fig. 5A) ou très peu (Fig. 5B) la viabilité du biofilm de *S. aureus* ATCC33591. Par contre, lorsque le biofilm est prétraité avec la denarase de l'exemple 1 (dans du TGN) et de l'exemple 2 (dans du TrisHCl 20mM pH7), une réduction significative par rapport au CT- de 1.35 logs et de 0.5 logs, respectivement, est observée après traitement à 20mg/L de vancomycine. Ces diminutions correspondent à une diminution de la viabilité de 96.5 et 80%, respectivement, par rapport aux contrôles CT- respectifs sans enzymes à 20mg/L de vancomycine. L'effet

potentialisateur de la denarase sur la vancomycine 20mg/L est également observée sur la biomasse avec une réduction de la biomasse de 84% et 70% en TGN et Tris, respectivement (Fig. 6C et 6D). Un effet similaire mais plus léger sur la viabilité et la biomasse est mesuré en présence de 10mg/L de vancomycine : réduction de 50% de la viabilité et 80% de la biomasse dans du TGN, par rapport à CT-.

2.2 biofilm sur coupons de Titane

Dans ce modèle, la viabilité est quantifiée après détachement et homogénéisation du biofilm par la technique d'étalement et de comptage des cellules sur boîte de culture TSA (VWR).

2.2.1 méthode de culture, de traitement enzymatique, de quantification de la biomasse et de la viabilité et d'analyse des résultats

Les coupons de Titane (n = 3 pour chaque condition) sont placés dans les puits d'une plaque 12 puits et sont incubés à 37°C sous agitation (50 rpm) pendant 24h dans 3ml d'inoculum bactérien à une DO de 0,005 (10⁶ CFU/ml) afin de permettre la formation de biofilm. Les coupons sont ensuite lavés 2X au PBS (2ml) et traités pendant 1h à 37°C avec la composition selon l'invention ou la solution sans enzymes (CT- = TrisHCl 20mM pH7). Les coupons sont ensuite lavés 2X au PBS (2ml) et réincubés dans 750 µl de TGN contenant 0 ou 20mg/L de vancomycine pendant 24h à 37°C sous agitation (50 rpm). Après 2 lavages au PBS (2ml), le biofilm est décroché et homogénéisé dans 2ml de PBS. Différentes dilutions sont réalisées (de 10 en 10) et 10 µl de chaque dilution est étalé sur boîte TSA. Les colonies (CFU) sont comptés après 18h d'incubation à 37°C.

Pour analyser l'effet des compositions selon l'invention, un test statistique (one-way ANOVA et test post-hoc de Tukey) est réalisé. Ce test compare les valeurs de fluorescence (viabilité) ou d'absorbance (biomasse) du contrôle négatif CT- (= traitement avec du tampon sans enzyme) et des biofilms traités avec les compositions enzymatiques, et ce à chaque concentration en vancomycine. La différence est significative lorsque la p-valeur du test statistique est inférieure ou égale à 0.05 (caractère * représenté sur les graphes). Lorsque cela est précisé dans les exemples comparatifs, l'activité des compositions enzymatiques sont comparées entre elles (one-way ANOVA et test post-hoc Tukey).

2.1.2 Résultats

Effet potentialisateur de 3 compositions tri-enzymatiques sur l'efficacité de la vancomycine

La figure 7 illustre l'effet potentialisateur de trois compositions tri-enzymatique contenant de la denarase sur l'effet microbicide de la vancomycine à 20mg/L: (i) Exemple 8 (Ex. 8) : cellulase (7U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,06U/ml), (ii) Exemple 9 (Ex. 9) : flavourzyme (1% v/v), denarase (500U/ml) et dispersine B (0,06 U/ml) et (iii) BDD : Blaze® Pro (1% v/v), denarase (500U/ml) et dispersine B (0,06U/ml) sur *S. aureus* ATCC33591. Le tampon utilisé est du Tris-HCl 20mM pH7.

Les compositions sont reprises au tableau 6.

10 **Tableau 6.-**

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 3 (Ex. 3)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml et 0,06U/ml 7 U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple 8 (Ex. 8)	Denarase et Flavourzyme Et Dispersine B	500U/ml 1% v/v 0,06U/ml	Tris-HCl 20mM
Exemple 9 (Ex. 9)	Denarase et Blaze® Pro Et Dispersine B	500U/ml 1% v/v 0,06U/ml	Tris-HCl 20mM
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	Tris-HCl 20mM
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	Tris-HCl 20mM

Les résultats montrent qu'en absence de traitement enzymatique (CT-) la vancomycine 20mg/L ne diminue pas la viabilité dans le biofilm. Par contre, le prétraitement des biofilms aux 3 compositions potentialisent de manière significative l'effet de la vancomycine. En effet, avec les 3 cocktails une réduction similaire de 2,5 logs est observée en présence de 20mg/L de vancomycine (= réduction de 99,8% de la viabilité).

Effet potentialisateur de 3 compositions tri-enzymatiques sur la vancomycine

La figure 8 illustre l'effet potentialisateur de trois compositions tri-enzymatique contenant de la denarase sur l'effet microbicide de la vancomycine à 20mg/L: (i)

Exemple 6 : cellulase (7U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,06U/ml), (ii)
 Exemple 10 : cellulase (70U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,32 U/ml) et
 (iii) Exemple 11 : alpha-amylase (2000 U/ml) ; cellulase (70U/ml), denarase (500U/ml)
 et la dispersine B (0,32 U/ml). Ces cocktails ont été testés en traitement curatif sur les
 5 biofilms de *S. aureus* ATCC33591 (Fig. 8A), *S. epidermidis* ATCC35984 (Fig. 8B) et *S.*
aureus 144-20 (Fig. 8C). Le tampon utilisé est du TGN.

Les compositions sont reprises au tableau 7.

Tableau 7.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 6 (Ex. 6)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml et 0,06U/ml 7 U/ml	TGN
Exemple 10 (Ex. 10)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml 0,32 U/ml 70 U/ml	TGN
Exemple 11 (Ex. 11)	Denarase et alpha-amylase Et Dispersine B	500U/ml 2000 U/ml 0,32U/ml	TGN
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	TGN
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	TGN

10 Les résultats montrent qu'en absence de traitement enzymatique (CT-
) la vancomycine 20mg/L ne diminue pas la viabilité dans le biofilm de manière
 significative. Par contre, le prétraitement des biofilms aux 3 compositions
 potentialisent de manière significative l'effet de la vancomycine sur la viabilité des
 3 souches testées. Dans ces conditions, une réduction de la viabilité de 2,5 à 3 logs
 15 est observée en présence de vancomycine 20mg/L par rapport aux CT- non traités
 avec les cocktails.

Efficacité d'une composition selon l'invention en combinaison avec
 un microbicide pour prévenir la formation de biofilm impliqués dans des infections
 du corps humain

20

3.1 modèle de biofilm en plaques 96 puits

La capacité de la composition selon l'invention à prévenir la formation de biofilm a été testée sur un modèle de biofilm en plaque 96 puits. Dans ce set-up expérimental, les compositions enzymatiques sont ajoutées dans l'inoculum bactérien de départ (milieu TGN contenant $5 \cdot 10^6$ CFU/ml), c'est-à-dire avant la formation du biofilm. Après 24h de croissance à 37°C, les biofilms sont lavés et incubés en présence de vancomycine (20mg/L) pendant 24h à 37°C, comme décrit au point 2.1.1. La quantité de biomasse (coloration CV) et la viabilité (mesure du métabolisme) des biofilms sont ensuite mesurés et comparés à la condition CT- où l'inoculum de départ ne contenait pas d'enzymes (n=4 dans chaque condition).

Les compositions testées sont reprises au tableau 8.

Tableau 8.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 10 (Ex. 10)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml 0,32 U/ml 70 U/ml	TGN
Exemple 11 (Ex. 11)	Denarase et alpha-amylase Et Dispersine B	500U/ml 2000 U/ml 0,32U/ml	TGN
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	TGN
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	TGN

La Figure 9 montre l'effet préventif de 2 compositions selon l'invention contenant de la denarase (exemples 10 & 11), sur différentes souches de *S. aureus* et *S. epidermidis*. En présence de vancomycine 20 mg/L, les 2 cocktails réduisent de manière significative la quantité de biomasse formée (Fig. 9A) et la viabilité du biofilm (Fig. 9B), avec des amplitudes variables entre les souches.

3.2 modèle de biofilm en coupons de titane

L'effet préventif de la formation de biofilm des compositions selon l'invention ont été testées sur un modèle coupons en titane. Dans cette expérience, les coupons sont incubés pendant 24h à 37°C avec un inoculum bactérien (10^6 CFU/ml) dans du TGN contenant différentes compositions enzymatiques, ou non (=CT-). Après formation du biofilm, les coupons sont incubés en présence (Van

0mg/L) ou présence de 20 mg/L de vancomycine pendant 24h avant analyse de la viabilité par la technique d'étalement sur TSA et de comptage.

Les compositions testées sont reprises au tableau 7.

Tableau 7.-

Composition – Exemple	Enzyme	Concentration	Tampon
Exemple 6 (Ex. 6)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml et 0,06U/ml 7 U/ml	TGN
Exemple 10 (Ex. 10)	Denarase et Dispersine B et cellulase	500U/ml 0,32 U/ml 70 U/ml	TGN
Exemple 11 (Ex. 11)	Denarase et alpha-amylase Et Dispersine B	500U/ml 2000 U/ml 0,32U/ml	TGN
Contrôle négatif CT-	(NA)	(NA)	TGN
Contrôle positif CT+	EnziQure®	1%	TGN

5

La figure 10 illustre l'effet préventif de trois compositions tri-enzymatique contenant de la denarase sur l'effet microbicide de la vancomycine à 20mg/L: (i) Exemple 6 : cellulase (7U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,06U/ml), (ii) Exemple 10 : cellulase (70U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,32 U/ml) et (iii) Exemple 11 : alpha-amylase (2000 U/ml) ; cellulase (70U/ml), denarase (500U/ml) et la dispersine B (0,32 U/ml). Ces cocktails ont été testés en traitement préventif sur le biofilm de *S. aureus* ATCC33591 (Fig. 10A) et *S. epidermidis* ATCC35984 (Fig. 10B).

Les résultats indiquent qu'en présence de vancomycine 20 mg/L, les 3 cocktails réduisent de manière significative la viabilité dans le biofilm formé par *S. aureus* ATCC33591 (diminution de 2,5 à 3 logs) (Fig. 10A) et *S. epidermidis* ATCC35984 (diminution de 2 à 3 logs) (Fig. 10B) après 24h d'incubation. Ces observations montrent que les compositions selon l'invention contenant de la denarase préviennent la formation de biofilm, et par conséquent potentialisent l'effet d'un antibiotique sur sa capacité à réduire la viabilité au sein du biofilm.

20

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

Par exemple, la dénarase a été utilisée dans les exemples, il va de soi
5 que les exemples auraient pu illustrer l'activité de la benzonase endonucléase® disponible auprès de la société Millipore Sigma

4.1 Biofilms comprenant *Candida*

10 Les inventeurs ont ensuite tenté de traiter des biofilms comprenant *Candida albicans*, soit en monoculture, soit dans des modèles complexes de biofilm comprenant *Candida albicans* et des procaryotes. Différentes souches de *Candida albicans* ont été utilisées ; celle ATCC24433, ainsi que des souches isolées d'infections de prothèse orthopédiques. La subtilisine (protéase de *Bacillus licheniformis*) et la
15 lyticase (d'*Arthrobacter luteus* ou de *Bacillus subtilis*) a été obtenue chez Sigma. Les autres enzymes sont celles utilisées ci-dessus.

L'antifongique Caspofongine (Merck Sharp & Dohme) et, pour les biofilms complexes comprenant en outre un ou plusieurs procaryotes, les antibiotiques Moxifloxacin HCl (Bayer) ou Meropenem (Mylan) ont été utilisées (24 heures de
20 traitement, après l'application des enzymes).

Des tests de cytotoxicité ont été pratiqués sur ostéoblastes MG63 et sur d'autres types de cellules.

Tant la subtilisine (déjà à des concentrations de environ 0,5 U/mL) que la Lyticase (déjà à 10 U/mL) sont toxiques pour les ostéoblastes, mais pas nécessairement
25 toxiques pour d'autres cellules. Il s'agit des concentrations qui seront utilisées au niveau des biofilms.

De manière surprenante, les inventeurs ont observé que la subtilisine (deux durées de traitement ont été testées : 30 minutes et 1h) sensibilisait les biofilms comprenant *Candida albicans* (ont été testées des associations avec des bactéries Gram positif, ici, *S. aureus* et/ou Gram négatif ; ici. *E. coli*), ou constitué uniquement de *Candida albicans*. Une combinaison de la Denarase® avec la Lyticase (combinaison
30

appliquée 30 minutes ou 1h) a également montré un effet synergique sur ces biofilms. La combinaison de la subtilisine avec la Denarase® n'a pas montré d'avantage par rapport à l'effet obtenu par la subtilisine seule au niveau de biofilms comprenant *Candida albicans*.

- 5 Les inventeurs ont testé une application séquentielle d'une composition comprenant la Denarase, puis de la subtilisine, avec une efficacité accrue.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain comprenant au moins une enzyme endoribonucléase choisie dans le groupe constitué des enzymes appartenant aux classes enzymatiques EC 3.1.30 et EC 3.1.31
5 et leur mélange, pour potentialiser un agent microbicide, en particulier un antibiotique, un antifongique, ou un désinfectant, dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm.

2. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la
10 revendication 1, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif des infections dermatologiques ou d'infections se développant sur des brûlures et des plaies superficielles ou profondes.

3. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la
15 revendication 1, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif et/ou préventif des infections post-implantatoires associées à l'infection de tissus autour d'un dispositif médical implanté dans le corps ou d'un dispositif médical implanté
20 dans le corps.

4. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm selon la revendication 1, dans un soin d'hygiène corporelle ou cosmétique,
25 comme par exemple un soin pour les ongles, une solution buccale, un bain de bouche, un dentifrice, un bain oculaire, une solution de nettoyage de lentilles oculaires, une solution de nettoyage d'appareils/prothèses dentaires, de brosses à dents, un soin pour la peau anti-acné.

5. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon
30 l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle ladite composition comprend, en outre, une série d'enzymes additionnelles, par exemple une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit enzyme(s).

6. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 5, dans laquelle une enzyme de ladite série d'enzymes additionnelles de ladite composition est choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1.), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4. ; de préférence la subtilisine), et de leur mélange.

7. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle ladite composition comprend au moins une deuxième enzyme choisie dans le groupe des glycosidases (EC 3.2.1), de préférence une glucanase telle que la β 1,3 endoglucanase, et/ou une endoglucanase du groupe EC.3.2.1.39.

8. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 7, dans laquelle ladite composition comprend au moins une troisième enzyme choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), désoxyribonucléases (EC 3.1.21), oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des peptidases et des protéases (EC 3.4), et de leur mélange, en particulier choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1) et des peptidases (EC 3.4), de préférence la composition comprend au moins la dispersine B, la cellulase et l'endoglucanase (β 1,3).

9. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 5 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant orthopédique implanté ou de l'implant orthopédique implanté.

10. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 5 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm est un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant dentaire implanté ou de l'implant dentaire implanté.

11. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 1, 3, 5 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la
5 traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une
10 vis implantée ou d' un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée.

12. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon
15 l'une quelconque des revendications 1, 2, 4 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'un support tissé ou non tissé imprégné de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

13. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon
20 l'une quelconque des revendications 1, 2, 5 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus, de
25 préférence une application d'un pansement sous forme de gel comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

14. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain, selon
30 l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un
35 dispositif médical, de préférence une application d'une solution aqueuse, de préférence tamponnée de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, par infiltration, par irrigation, par injection, par application percutanée, par inhalation, par bain de bouche ou bain oculaire, par tamponnage.

15. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain, selon l'une quelconque des revendications 1, 2, 4 à 8, dans laquelle le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm comprend
5 une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une pâte, d'une crème, d'une pommade, ou d'une solution visqueuse comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, comme par exemple d'un dentifrice.

16. Utilisation d'une composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit agent microbicide, en particulier ledit antibiotique et/ou antifongique, phage, ou ledit désinfectant et ladite composition forment un produit de combinaison pour un emploi simultané, séparé ou échelonné dans le temps.

17. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain comprenant au moins une enzyme endoribonucléase choisie parmi les classes EC 3.1.30 et EC 3.1.31, de préférence à une teneur de 10 à 1000U/ml, de préférence 50 à 500U/ml, de préférence de 100 à 500U/ml, comme par exemple à une teneur de 200 U/ml à 650
20 U/ml, plus particulièrement de 250 U/ml à 550 U/ml, de manière préférée de 300 U/ml, voire de 350 U/ml à 500 U/ml.

18. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être humain selon la revendication 17, dans laquelle ladite au moins une enzyme endoribonucléase est d'origine bactérienne et/ou appartient à la classe EC 3.1.30.1 ou EC 3.1.30.2.

19. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 17 ou la revendication 18, comprenant, en outre, une série d'enzymes additionnelles, par exemple une, deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit enzyme(s).

20. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 19, dans laquelle une enzyme de ladite série d'enzymes additionnelles de ladite composition est choisie dans le groupe constitué des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC3.1.1) et des peptidases (EC 3.4), et de leur mélange, de préférence
35

l'enzyme additionnelle est la glucanase telle que la β 1,3 endoglucanase, et/ou une endoglucanase du groupe EC.3.2.1.39.

21. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque
5 des revendications 17 à 20, comprenant, en outre, au moins une deuxième enzyme choisie dans le groupe des glycosidases (EC 3.2.1).

22. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 21,
10 comprenant en outre, au moins une troisième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4).

23. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 22,
15 comprenant au moins une quatrième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4), de préférence comprenant comme enzymes additionnelles une glucanase telle que la β 1,3 endoglucanase et/ou une
20 endoglucanase du groupe EC.3.2.1.39, la Dispersine B et la cellulase.

24. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 23,
comprenant au moins une cinquième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des
25 oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4), de préférence la subtilisine.

25. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 24,
comprenant au moins une sixième enzyme choisie dans le groupe comprenant des
30 glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4).

26. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 25,
35 comprenant au moins une septième enzyme choisie dans le groupe comprenant

des glycosidases (EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (EC 3.1.21), des oxydoréductases (EC 1), des hydrolases d'ester carboxylique (EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (EC 3.4).

5 27. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon la revendication 26, comprenant au moins une huitième enzyme choisie dans le groupe comprenant des glycosidases (classe EC 3.2.1), des désoxyribonucléases (classe EC 3.1.21), des oxydoréductases (classe EC 1.), des hydrolases d'ester carboxylique (classe EC 3.1.1), des protéases et des peptidases (classe EC 3.4.), et de leur mélange.

10 28. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 27, comprenant en outre au moins une molécule microbicide comme un antibiotique, un antiseptique, antifongique, un phage, ou un ou plusieurs peptides microbicides (tels qu'un antibiotique et un antifongique)
15 conditionné séparément ou avec ladite endoribonucléase.

29. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 28, comprenant, en outre un inhibiteur de quorum sensing

20 30. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 29, sous forme d'une solution, comprenant, en outre, un tampon enzymatique choisi dans le groupe constitué du Tris-HCl, TGN, TBS, PBS, HEPES, MES, PIPES, MOPS, BES, TES, tampon phosphate et tampon citrate, contenant de 0 à 2 mM de MgCl₂, contenant de 0 à 2mM CaCl₂, et de 0 à 500 mM de NaCl.

25 31. Composition parapharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 29, sous forme d'une solution, comprenant en outre, un tampon enzymatique comprenant 0 à 50% d'agent de stabilisation (polyol, arginine, formiate de calcium, glucose).

30 32. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 31, comprenant, en outre, au moins un tensio-actif.

35 33. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 32, comprenant, en outre, au moins un conservateur.

34. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 33, comprenant, en outre, au moins un séquestrant.

5 35. Composition pharmaceutique administrable à l'être vivant, en particulier à l'être humain selon l'une quelconque des revendications 17 à 34, sous forme de solution, par exemple un bain de bouche, un bain oculaire, une lotion, une solution d'irrigation, une solution injectable.

10 36. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 34, sous forme d'un pansement hydrophile, par exemple un hydrogel.

37. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 34, sous forme immobilisée sur un support tissé ou non tissé, sec ou sur un dispositif médical ou sous forme imprégnée sur un support tissé ou non tissé.

15 38. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 34, sous forme d'une composition topique.

20 39. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 34, sous forme d'une solution stérile administrable par infiltration, par irrigation, par injection, par application percutanée et par inhalation.

25 40. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 37 pour une utilisation en tant que potentialisateur d'un agent microbicide, en particulier un antibiotique et/ou un antifongique, un phage, ou un désinfectant, dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm.

30 41. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38 pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif des infections dermatologiques ou d'infections se développant sur des brûlures et des plaies superficielles ou profondes.

35 42. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38, pour une utilisation dans traitement curatif et/ou préventif des infections post-implantatoires associées à l'infection de tissus autour d'un dispositif médical implanté dans le corps ou d'un dispositif médical implanté dans le corps.

43. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38, pour une utilisation dans un soin d'hygiène corporelle ou cosmétique, comme par exemple un soin pour les ongles, une solution buccale, un bain de bouche, un dentifrice, un bain oculaire, une solution de nettoyage de lentilles oculaires, une solution de nettoyage d'appareils dentaires, de brosses à dents, un soin pour la peau anti-acné.

44. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38, pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant orthopédique implanté ou de l'implant orthopédique implanté.

45. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38, pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un implant dentaire implanté ou de l'implant dentaire implanté.

46. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38, pour une utilisation dans un traitement curatif ou préventif d'une infection bactérienne de tissus entourant un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée ou bien d'un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée.

47. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38 et 41, 42, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'un support tissé ou non tissé imprégné de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique ou sur lequel ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique est immobilisée, par exemple à sec.

48. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38 et 41, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de

biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus, de préférence une application d'un pansement sous forme de gel, plus particulièrement un hydrogel comprenant ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique.

5 49. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 38 et 41 à 46, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une
10 solution aqueuse, de préférence tamponnée de ladite composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique, par infiltration, par irrigation, par injection, par application percutanée, par inhalation, par bain de bouche ou bain oculaire, par tamponnage, par trempage.

 50. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon
15 l'une quelconque des revendications 17 à 38 et 41, pour une utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm qui comprend une application de ladite composition sur une plaie, une infection, des tissus ou un dispositif médical, de préférence une application d'une pâte ou d'une solution visqueuse comprenant ladite composition para-
20 pharmaceutique ou pharmaceutique, comme par exemple d'un dentifrice.

 51. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 28 à 50, pour une utilisation comme produit de combinaison pour un emploi simultané, séparé ou échelonné dans le temps.

 52. Composition para-pharmaceutique ou pharmaceutique selon
25 l'une quelconque des revendications 17 à 38 et 41 à 45, pour une utilisation chirurgicale.

 53. Utilisation non-thérapeutique de la subtilisine (EC.3.4.21.62) pour la potentialisation d'un biofilm comprenant *Candida albicans* à une ou plusieurs molécules anti microbiologiques.

30 54. Utilisation selon la revendication 53 dans laquelle les molécules anti microbiologiques sont un antifongique et/ou un antibiotique, de préférence ledit un antibiotique est un antibiotique efficace contre les bactéries Gram-négatif (sous forme planctonique) et les bactéries Gram-positif (sous forme planctonique).

55. Composition pharmaceutique comprenant la subtilisine (EC.3.4.21.62) pour le traitement d'un biofilm comprenant *Candida albicans*, ledit biofilm affectant un patient.

56. Composition pharmaceutique selon la revendication 55 pour
5 une utilisation séquentielle avec un antifongique et/ou un antibiotique, de préférence dans laquelle l'antifongique est actif contre *Candida albicans* (sous forme planctonique) et l'antibiotique est actif contre les bactéries (sous formes planctoniques) Gram négatif et/ou Gram positif.

57. Composition pharmaceutique selon la revendication 55 ou 56
10 pour le traitement curatif de

tissus entourant un implant orthopédique, un cathéter, une canule, une sonde, une prothèse, un implant endo-osseux, un implant zygomatique, un implant orthodontique, une prothèse dentaire, une plaque de contention, un valve, un drain, un stent, un tube pour respiration artificielle ou une vis implantée,

15 d'un épiderme, d'une plaie ou d'une muqueuse corporelle interne

étant infecté par un biofilm comprenant *Candida albicans*.

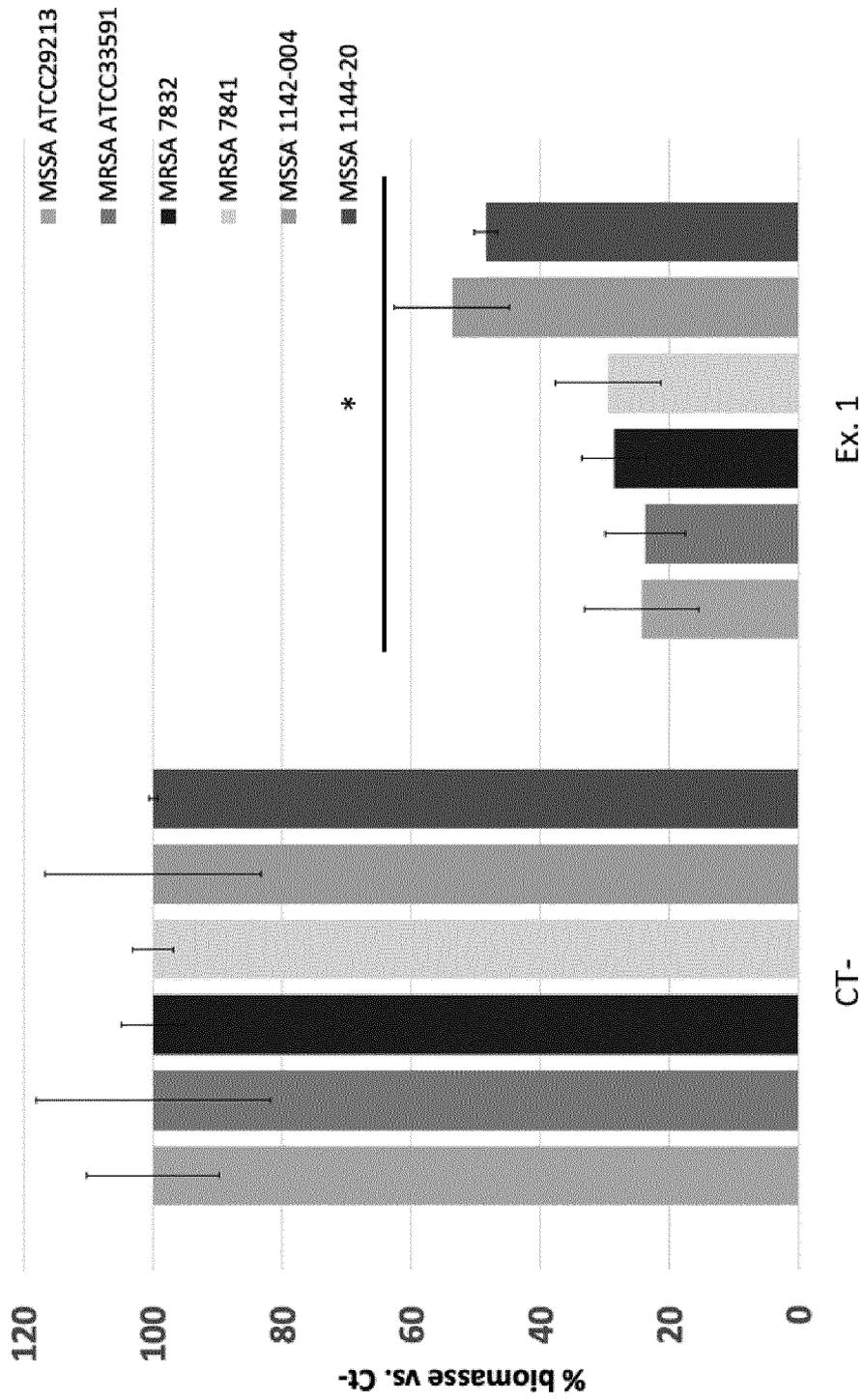


Figure 1

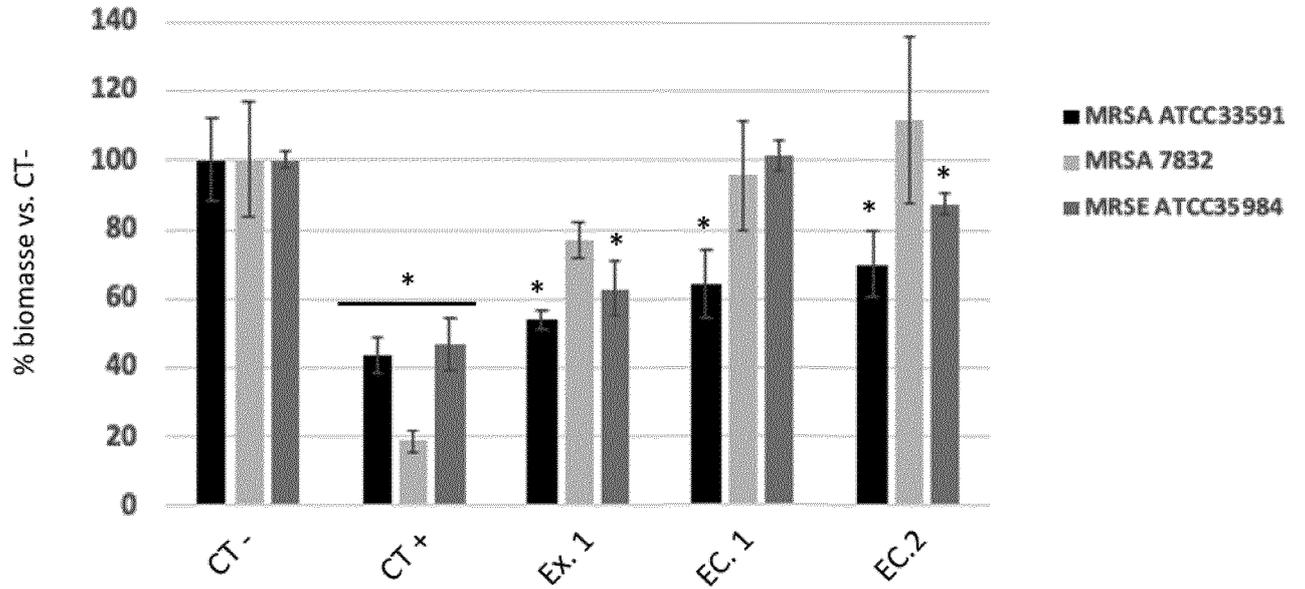


Figure 2

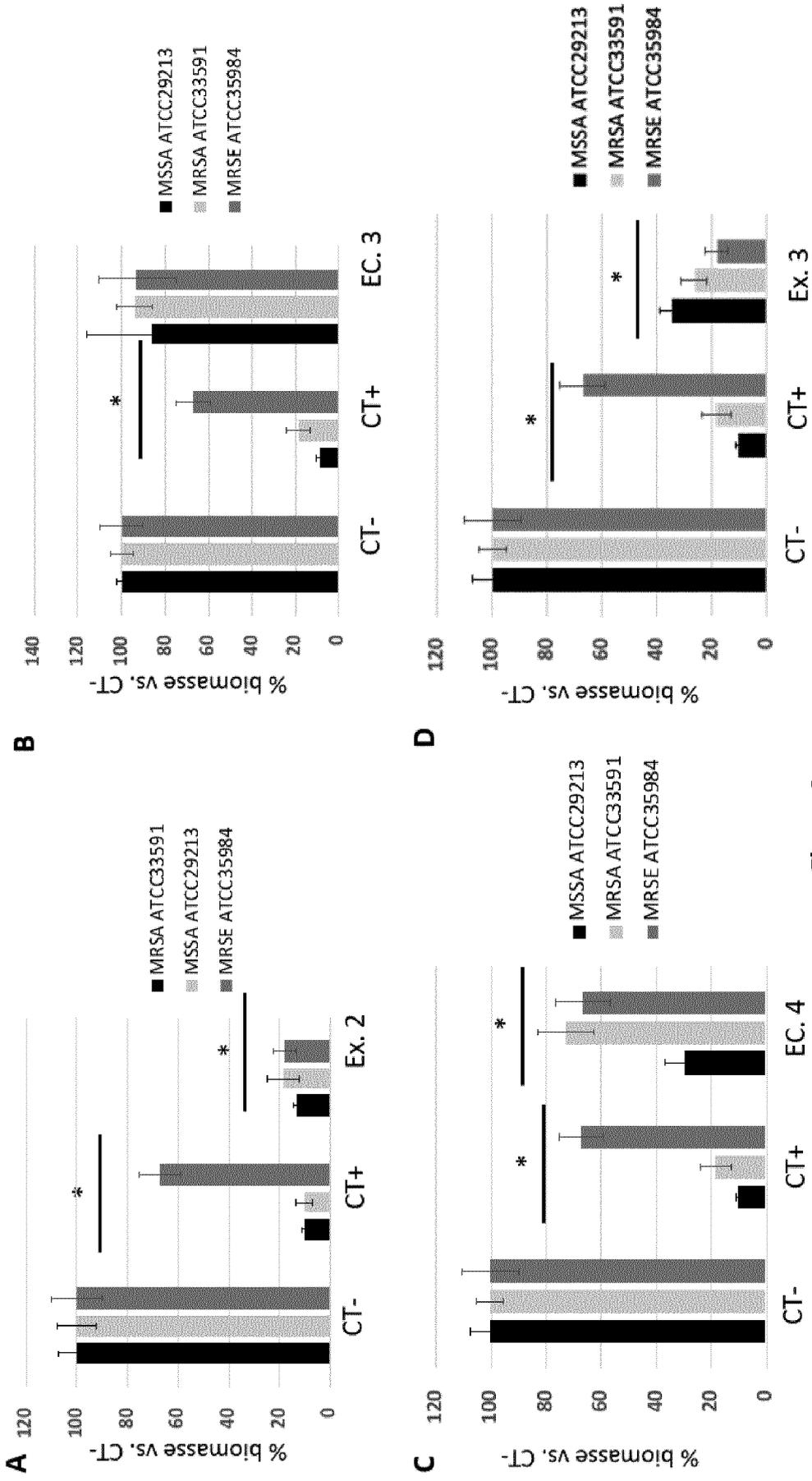


Figure 3

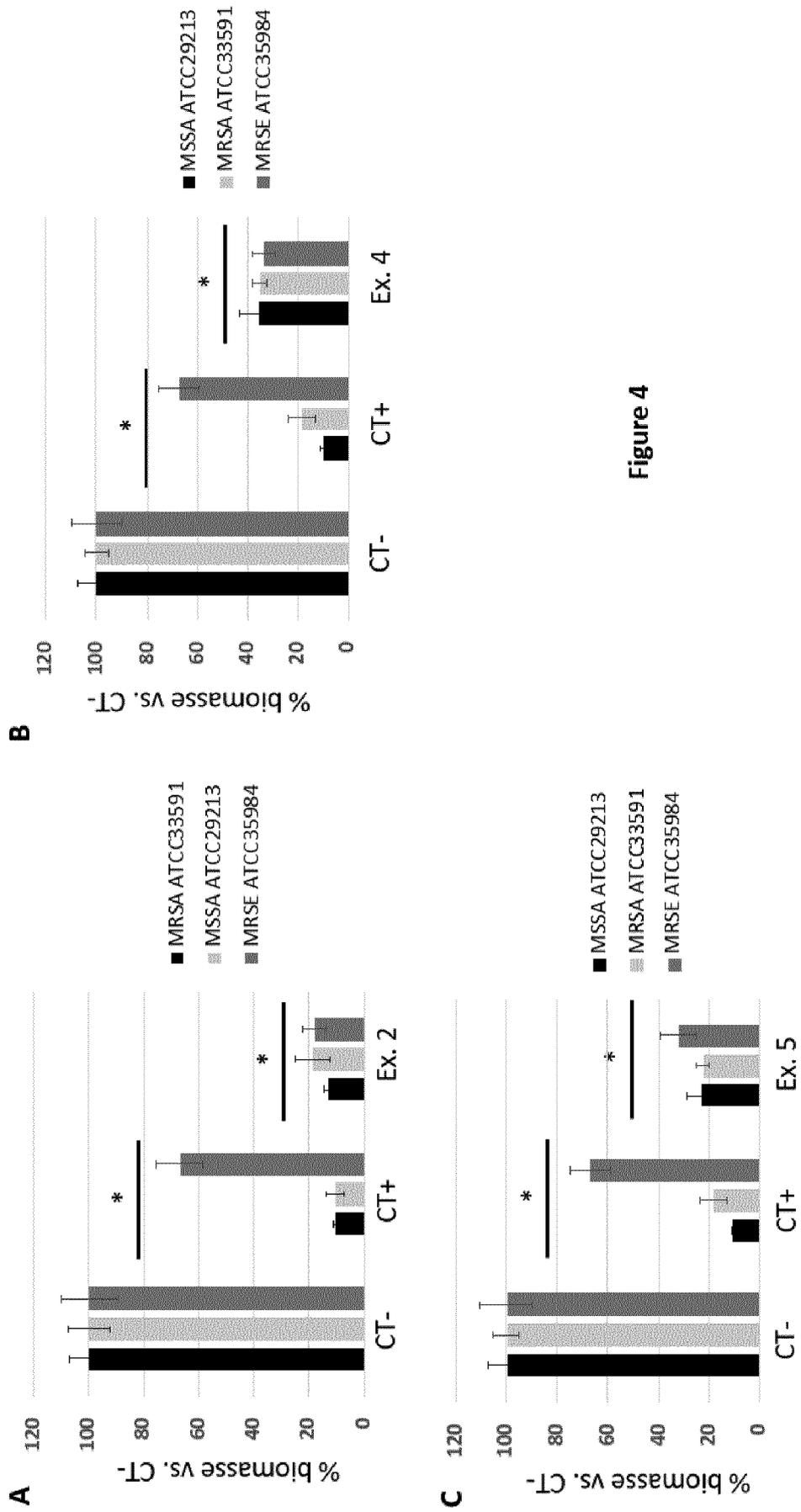


Figure 4

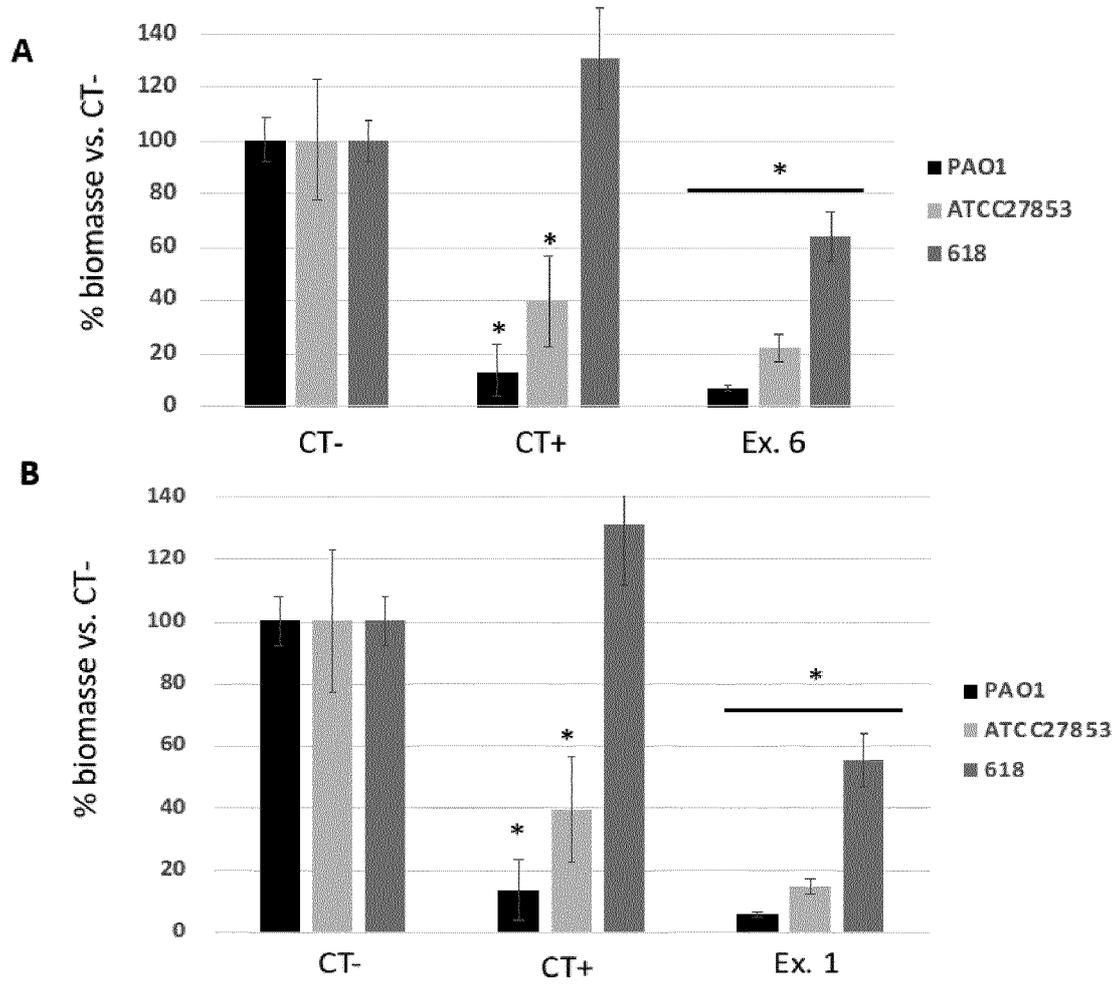


Figure 5

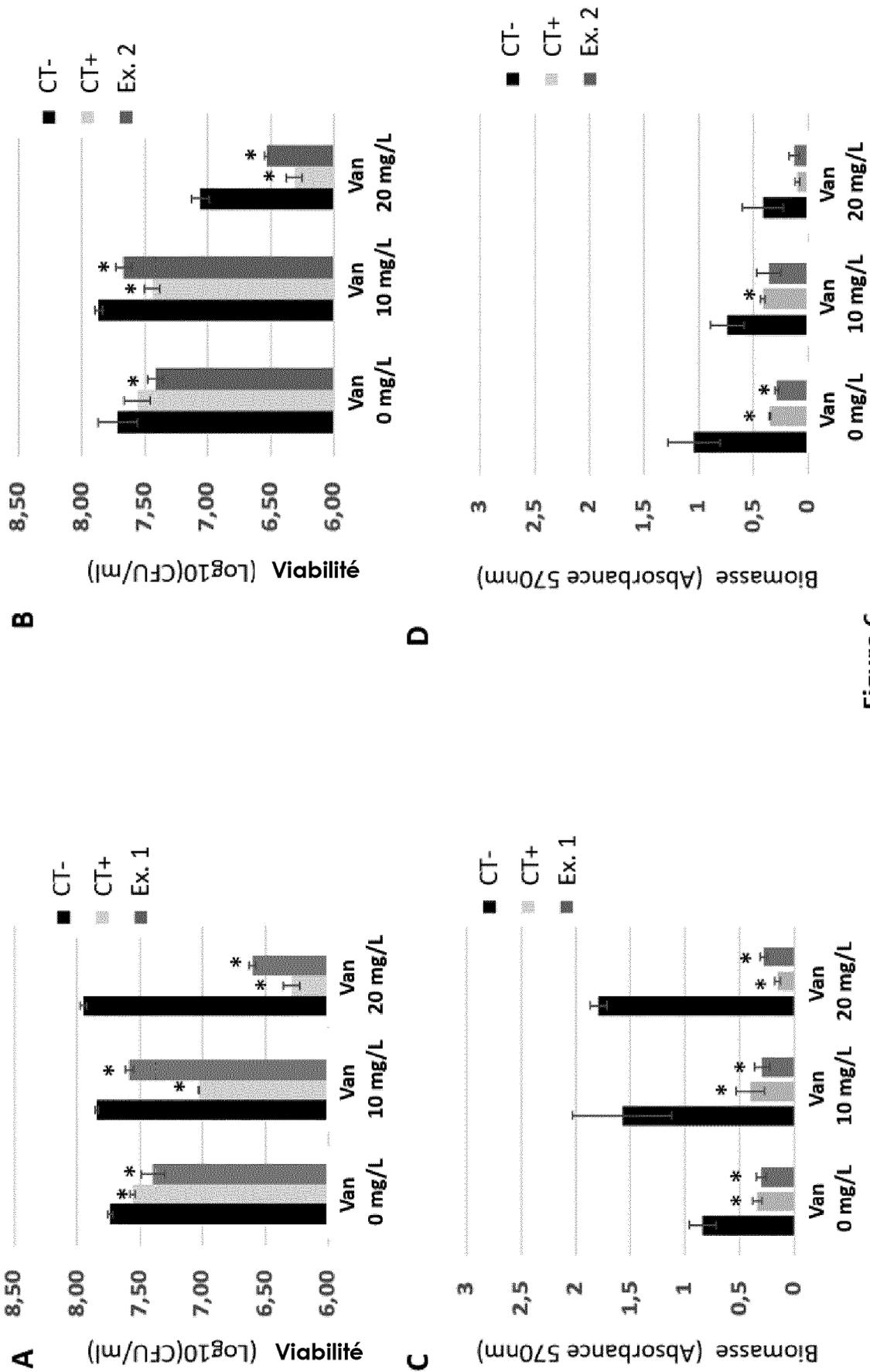


Figure 6

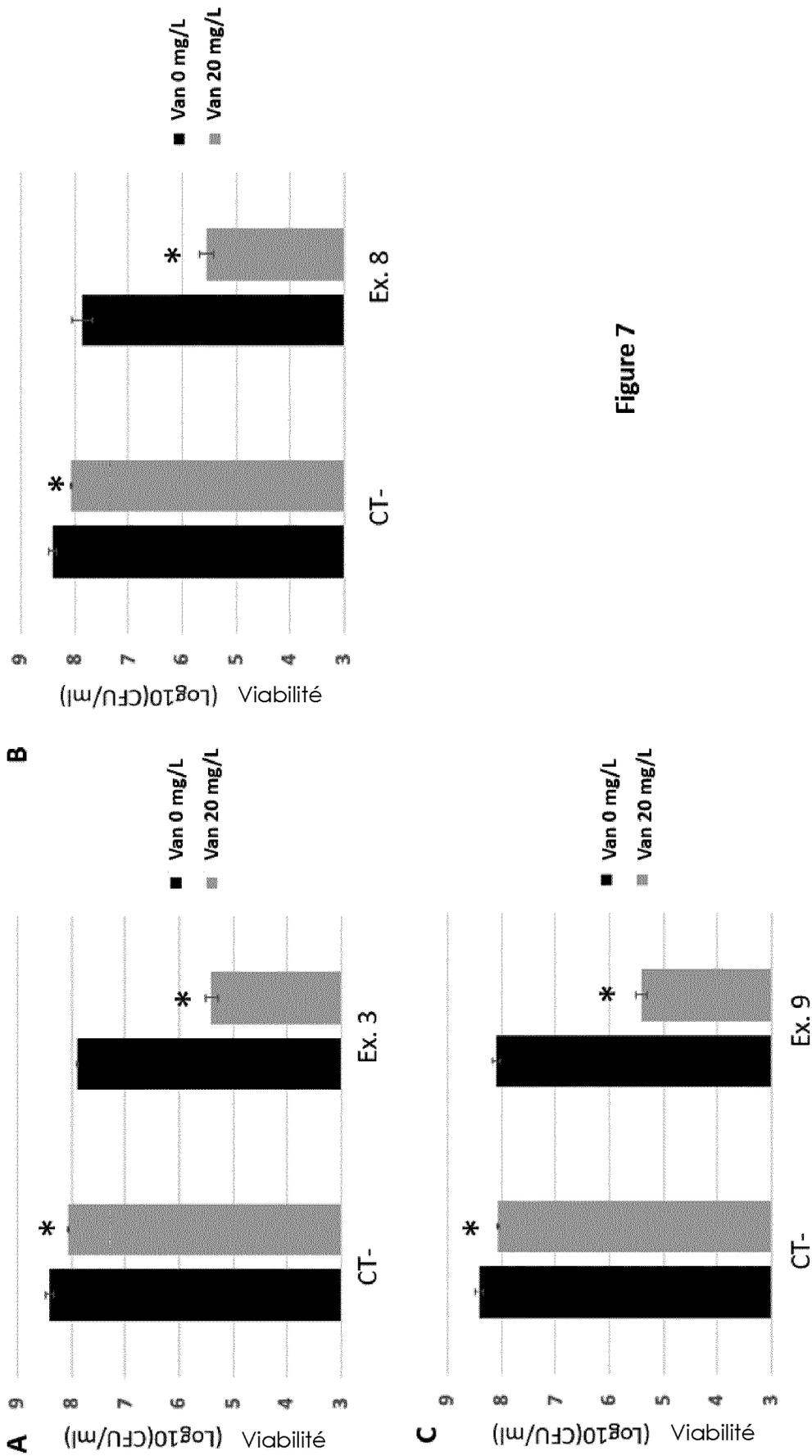


Figure 7

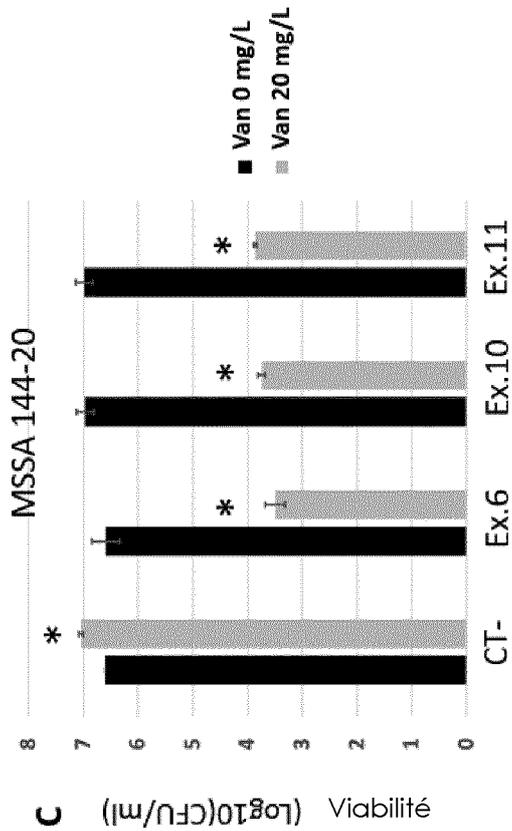
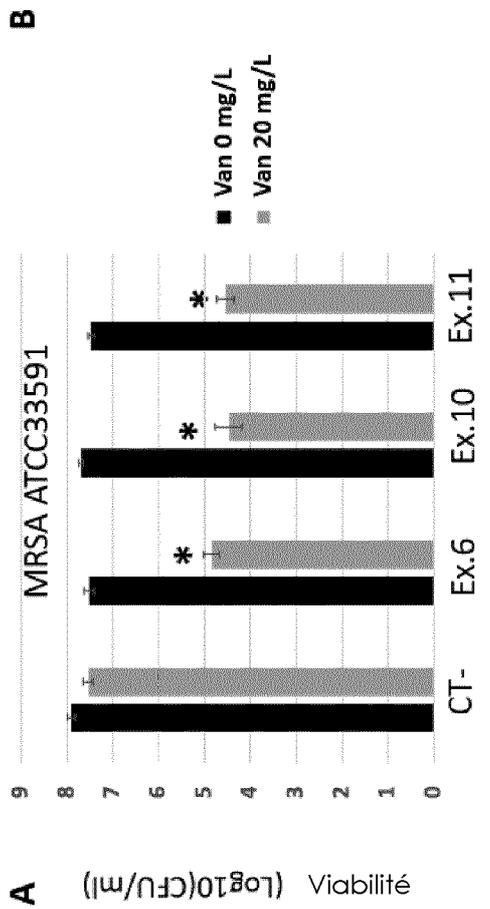
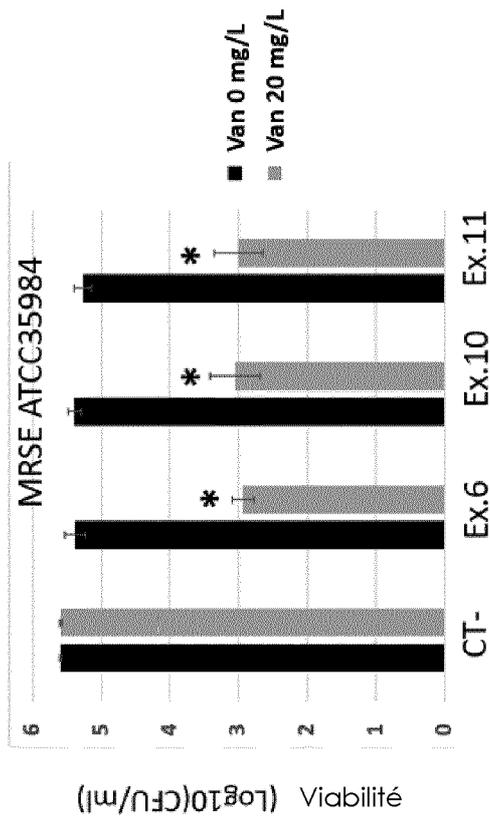


Figure 8

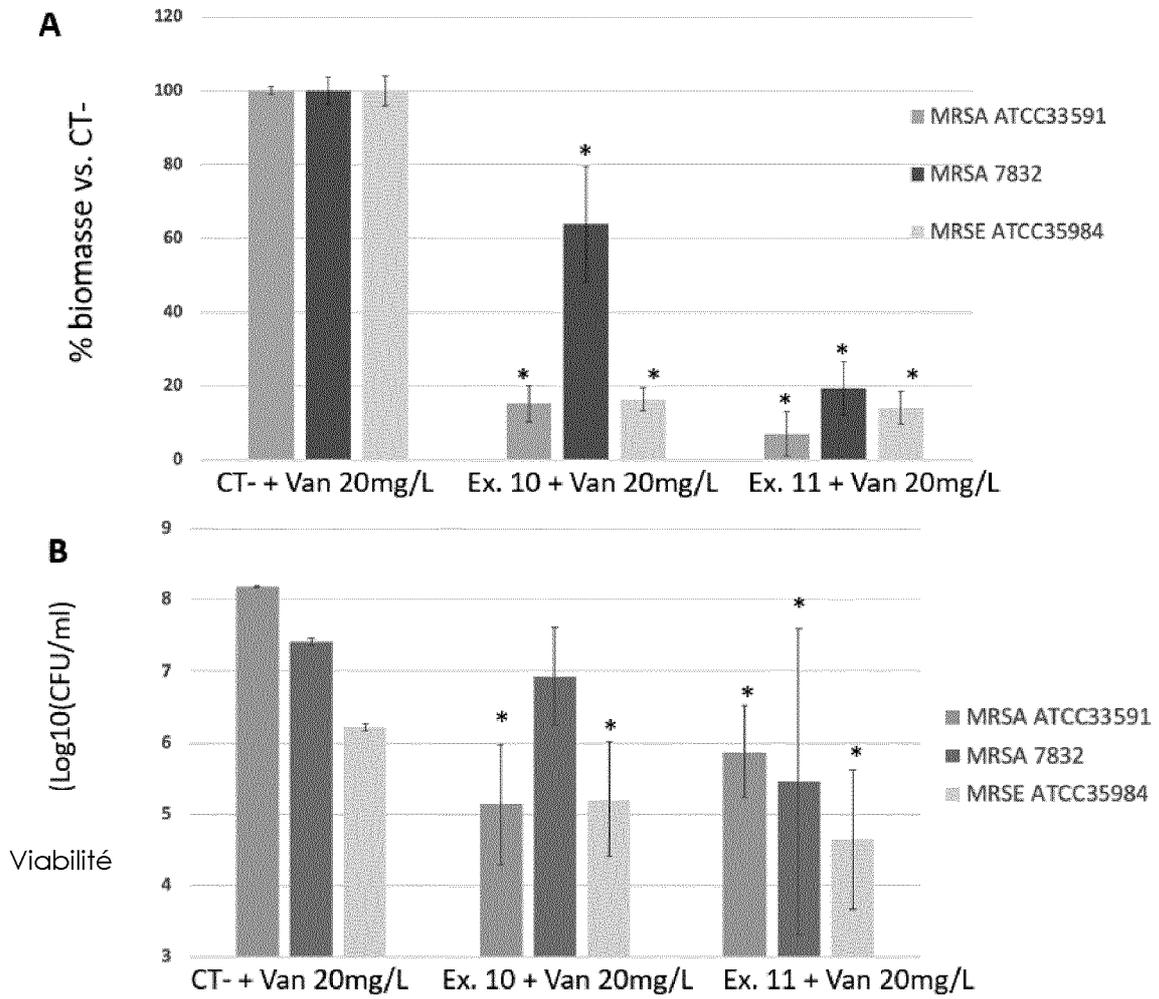


Figure 9

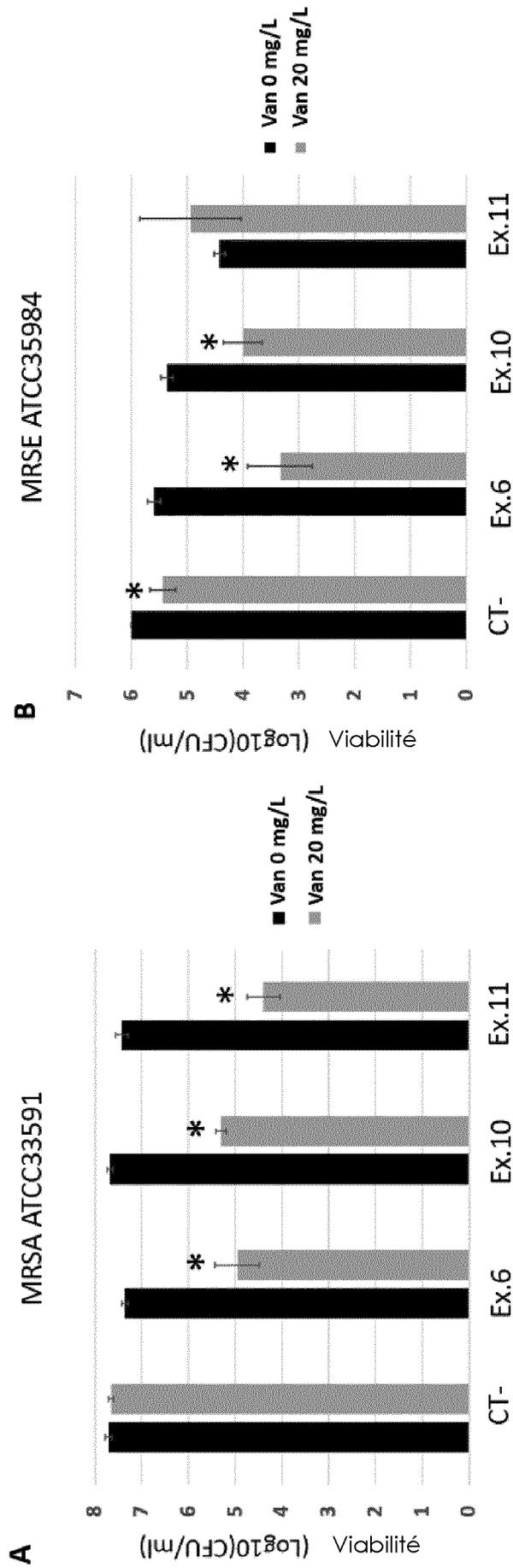


Figure 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/078824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/46(2006.01)i; A61K 38/54(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61L 2/00(2006.01)i; A61L 12/08(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 41/00(2006.01)i; A61K 38/14(2006.01)i; A61K 8/66(2006.01)i; A61K 38/48(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L; A61K; A61P; A61Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 10328129 B2 (UNIV ILLINOIS [US]) 25 June 2019 (2019-06-25)	1-4, 9, 11-18, 28, 35, 38-44, 46-52
Y	column 6, line 50 - column 7, line 32; claims 1, 2, 5, 9 columns 9-10 column 13, line 50 - column 14, line 37	1-52
X	WO 0193875 A1 (PHARMACAL BIOTECHNOLOGIES LLC [US]) 13 December 2001 (2001-12-13)	1, 2, 5-8, 12-28, 36, 37, 41, 47-51
Y	page 8, lines 3-7 page 10 - page 13 pages 17-18 page 21; claims 1, 15	1-52
X	US 2017355930 A1 (LANT NEIL JOSEPH [GB]) 14 December 2017 (2017-12-14)	1, 4, 14-21, 28, 32, 34, 35, 37, 38, 43, 51
Y	paragraphs [0024], [0030], [0034], [0037], [0039], [0046] - [0048], [0103], [0105]	1-52
X	WO 2020185685 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 17 September 2020 (2020-09-17)	17, 18, 28, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 43, 51
	paragraphs [0055], [0057], [0058], [0064], [0066], [0085], [0086], [0095]; claims 1, 9, 16	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 January 2022		Date of mailing of the international search report 18 March 2022
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Durrenberger, Anne Telephone No.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52

(para)pharmaceutical composition containing one endoribonuclease selected within the group consisting of the enzymes belonging to the EC 3.1.30 and EC 3.1.31 enzyme classes; use thereof for potentiating a microbiocide, in particular an antibiotic, an antifungal agent or a disinfectant, in the treatment and/or the prevention of bacterial infections involving the formation of biofilm.

2. claims: 53-57

pharmaceutical composition containing subtilisin (EC.3.4.21.62) for treating a biofilm including *Candida albicans*, said biofilm affecting a patient; non-therapeutic use of subtilisin (EC.3.4.21.62) for potentiating a biofilm including *Candida albicans* with one or more anti-microbiological molecules.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-52**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2021/078824

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	10328129	B2	25 June 2019	AU 2012352983 A1	03 July 2014
				BR 112014014378 A2	19 May 2020
				CA 2858983 A1	20 June 2013
				CN 104220087 A	17 December 2014
				DK 2790722 T3	25 March 2019
				EP 2790722 A1	22 October 2014
				ES 2713519 T3	22 May 2019
				IL 232999 A	31 March 2019
				JP 6202400 B2	27 September 2017
				JP 2015506920 A	05 March 2015
				KR 20140101857 A	20 August 2014
				MX 364495 B	29 April 2019
				RU 2014128564 A	10 February 2016
				US 2015010524 A1	08 January 2015
				US 2017106057 A1	20 April 2017
				US 2019314461 A1	17 October 2019
				WO 2013089835 A1	20 June 2013
				ZA 201404320 B	25 November 2015
WO	0193875	A1	13 December 2001	AU 6542501 A	17 December 2001
				WO 0193875 A1	13 December 2001
US	2017355930	A1	14 December 2017	EP 3469054 A1	17 April 2019
				US 2017355930 A1	14 December 2017
				WO 2017214236 A1	14 December 2017
WO	2020185685	A1	17 September 2020	EP 3934615 A1	12 January 2022
				WO 2020185685 A1	17 September 2020

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2021/078824

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
INV.	A61K38/46	A61K38/54	A61K45/06	A61L2/00	A61L12/08
	A61P31/04	A61P41/00	A61K38/14	A61K8/66	A61K38/48
ADD.					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)					
A61L A61K A61P A61Q					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)					
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	US 10 328 129 B2 (UNIV ILLINOIS [US]) 25 juin 2019 (2019-06-25)				1-4, 9, 11-18, 28, 35, 38-44, 46-52
Y	colonne 6, ligne 50 - colonne 7, ligne 32; revendications 1, 2, 5, 9 colonnes 9-10 colonne 13, ligne 50 - colonne 14, ligne 37				1-52

	-/--				
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe					
* Catégories spéciales de documents cités:					
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent			"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention		
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date			"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément		
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)			"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier		
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens			"&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
17 janvier 2022			18/03/2022		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Durrenberger, Anne		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/93875 A1 (PHARMACAL BIOTECHNOLOGIES LLC [US]) 13 décembre 2001 (2001-12-13)	1, 2, 5-8, 12-28, 36, 37, 41, 47-51
Y	page 8, lignes 3-7 page 10 - page 13 pages 17-18 page 21; revendications 1,15 -----	1-52
X	US 2017/355930 A1 (LANT NEIL JOSEPH [GB]) 14 décembre 2017 (2017-12-14)	1, 4, 14-21, 28, 32, 34, 35, 37, 38, 43, 51
Y	alinéas [0024], [0030], [0034], [0037], [0039], [0046] - [0048], [0103], [0105] -----	1-52
X	WO 2020/185685 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 17 septembre 2020 (2020-09-17) alinéas [0055], [0057], [0058], [0064], [0066], [0085], [0086], [0095]; revendications 1, 9, 16 -----	17, 18, 28, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 43, 51

Cadre n° II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n° III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n :

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications;; elle est couverte par les revendications n :
1-52

- Remarque quant à la réserve**
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
 - Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
 - Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-52

Composition (para)pharmaceutique comprenant une endoribonucléase choisie dans le groupe constitué des enzymes appartenant aux classes enzymatiques EC 3.1.30 et EC 3.1.31; son utilisation pour potentialiser un agent microbicide, en particulier un antibiotique, un antifongique, ou un désinfectant, dans le traitement et/ou la prévention d'infections bactériennes impliquant la formation de biofilm.

2. revendications: 53-57

Composition pharmaceutique comprenant la subtilisine (EC.3.4.21.62) pour le traitement d'un biofilm comprenant *Candida albicans*, ledit biofilm affectant un patient; utilisation non-thérapeutique de la subtilisine (EC.3.4.21.62) pour la potentialisation d'un biofilm comprenant *Candida albicans* à une ou plusieurs molécules anti microbiologiques.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2021/078824

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 10328129	B2	25-06-2019	AU 2012352983 A1	03-07-2014
			BR 112014014378 A2	19-05-2020
			CA 2858983 A1	20-06-2013
			CN 104220087 A	17-12-2014
			DK 2790722 T3	25-03-2019
			EP 2790722 A1	22-10-2014
			ES 2713519 T3	22-05-2019
			IL 232999 A	31-03-2019
			JP 6202400 B2	27-09-2017
			JP 2015506920 A	05-03-2015
			KR 20140101857 A	20-08-2014
			MX 364495 B	29-04-2019
			RU 2014128564 A	10-02-2016
			US 2015010524 A1	08-01-2015
			US 2017106057 A1	20-04-2017
			US 2019314461 A1	17-10-2019
			WO 2013089835 A1	20-06-2013
			ZA 201404320 B	25-11-2015

WO 0193875	A1	13-12-2001	AU 6542501 A	17-12-2001
			WO 0193875 A1	13-12-2001

US 2017355930	A1	14-12-2017	EP 3469054 A1	17-04-2019
			US 2017355930 A1	14-12-2017
			WO 2017214236 A1	14-12-2017

WO 2020185685	A1	17-09-2020	EP 3934615 A1	12-01-2022
			WO 2020185685 A1	17-09-2020
