

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580028162.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/194 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 15 日

[11] 公开号 CN 101018548A

[22] 申请日 2005.6.13

[21] 申请号 200580028162.5

[30] 优先权

[32] 2004.6.21 [33] US [31] 10/873,040

[86] 国际申请 PCT/CA2005/000914 2005.6.13

[87] 国际公布 WO2005/123057 英 2005.12.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.16

[71] 申请人 诺思药业公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 M·H·多氏 K·奥斯特曼

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 李维英 郑建晖

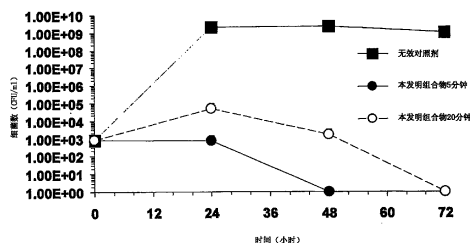
权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 9 页

[54] 发明名称

抗菌组合物及其使用方法

[57] 摘要

本发明涉及用于减少和/或预防细菌感染/超感染的组合物。该组合物包括至少两种置于惰性载体内的弱有机酸，输送时 pH 约为 2.5-4.5。该弱有机酸优选为乙酸、醋、柠檬酸或其组合。该惰性载体优选为用卡波普作胶凝剂的凝胶形式的水基载体。本发明组合物尤其可应用于减少和/或预防伤口的细菌感染/超感染。



1. 一种减少和/或预防伤口细菌感染/超感染的方法，其包括：在受损部位施用一种组合物，该组合物包括置于药理有效载体内的、治疗有效量的、至少两种选自乙酸、醋、柠檬酸及其组合的弱有机酸和EDTA，其中所述组合物的 pH 约为 2.5-4.5；所述治疗有效量能减少和/或预防所述伤口的细菌感染/超感染。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述施用是在所述伤口暴露在外后立即进行。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述施用是在所述伤口暴露在外后延误一段时间进行。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中，所述施用是在所述伤口暴露在外后 4 小时进行。

5. 根据权利要求 3 所述的方法，其中，所述施用是在所述伤口暴露在外后 24 小时进行。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，进行所述施用后 5-20 分钟内从所述受损部位去除所述组合物。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，进行所述施用后 5 分钟从所述受损部位去除所述组合物。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，进行所述施用后 10 分钟从所述受损部位去除所述组合物。

9. 根据权利要求 6 所述的方法，其中，进行所述施用后 20 分钟从所述受损部位去除所述组合物。

10. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述组合物的 pH 为 4.1-4.4。

11. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述药理有效载体包括胶凝剂。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述胶凝剂是丙烯酸交联的均聚物或共聚物。

13. 一种用于减少和/或预防细菌感染/超感染的试剂盒，其包括：

A) 一种用于减少和/或预防伤口细菌感染/超感染的组合物，该组合物包括置于药理有效载体内的、治疗有效量的、至少两种选自乙酸、醋、柠檬酸及其组合的弱有机酸和 EDTA，其中所述组合物的 pH 约为 2.5-4.5；

b) 选自伤口敷料、吸收绷带、女性卫生用品和尿布的包裹或包扎材料；以及

c) 使用说明书。

抗菌组合物及其使用方法

技术领域

本发明一般涉及有抗菌活性的物质及其使用方法；特别涉及用于减少伤口感染的组合物，更特别涉及在惰性载体内的、经验证对减少和预防伤口细菌感染/超感染有效的、包括有机酸和 EDTA 混合物的组合物。

背景技术

为预防疾病、减少感染以及减少食物和水源污染，一直以来控制微生物生长都是我们面对的一项挑战。高温和/或射线处理是已知的减少表面微生物污染的方法。另外，许多物质都有抗菌功效，包括酒精、漂白剂、酸、过氧化物和醋等等。

和酒精一样，用醋作抗菌剂由来已久，到大约公元 1000 年，中国和阿拉伯的古代医书上都推荐在尸体解剖时用醋洗手以防感染（Chan 等，*American Journal of Nephrology* 14(4-6:295-301) 1994）。中世纪，医生们尝试用醋混合物来预防感染“黑死病”（腹股沟淋巴结鼠疫）（Fradin 等，*Medicine: Yesterday, Today and Tomorrow*, Children's Press, Chicago 1989）。目前醋仍是许多抗菌剂组合物中的添加剂。

醋是一种不纯的有机酸（乙酸），富含许多挥发性杂质（De Vincenzi 等，*Food Additives and Contaminants* 4(2): 161-218 1987）。醋被批准用于人非食品用途，在作为阴道洗液的主用成分时略微有效，尽管其作用机理尚不清楚（Nyirjesy 等，*Obstetrics and gynecology* 90(1): 50-53 1997）。对纯乙酸、乙酸钠和醋的功效很少作过比较（Brighenti

等, *European Journal of Clinical Nutrition* 49(4) : 242-247 1995), 对其抗菌活性更是从未比较过。虽然一些阴道洗液中使用了乙酸钠, 但一直未测定其功效 (Chvapil 等, *Obstetrics and Gynecology* 52(1) : 88-93 1978)。尽管细菌对酸敏感是抗菌活性的一个因素, 但这并不足以解释醋的抗菌作用, 因为一些常见的食源性细菌对醋特敏感, 而在胃酸中却能存活并引发常见的肠道疾病 (Nishikawa 等, *International Journal of Food Microbiology* 18(4) : 271-278 1993)。

有关醋可能具有抗菌作用的科学文献为数不多 (Larghi 等, *Rev Asoc Argentina Microbiology* 7(3) 86-90 1975 (Spanish); Fasanella RM *Ophthalmic Surgery* 22(2) : 117-118 1991; Karapinar 等, *International Journal of Food Microbiology* 16 (3) : 261-264 1992)。其中一些研究结果已发现在食品加工业应用的途径 (Dickens 等, *Poultry Science* 73 (4) : 576-581 1994; Entani 等, *Kansenshogaku Zasshi* 71(5) : 443-450 (Japanese) 1997)。虽然在将宰杀后的鸡冷冻前用醋处理的结果显示细菌污染减少, 但尚未见到有关醋对活性皮肤有抗菌作用的公开报道 (Dickens 等, *Poultry Science* 73(4) : 576-581 1994)。太平洋周边国家普遍使用皮肤用醋制药膏, 在那儿醋被用作刺丝囊抑制剂, 是辅助治疗有可能致命的海蜇刺的首选推荐品 (Fenner 等, *Medical Journal of Australia* 143 (12-13) : 550-551, 554-555 1985; Beadnell 等, *Medical Journal of Australia* 156 (9) : 655-658 1992; Fenner 等, *Medical Journal of Australia* 158 (7) : 498-501 1993)。体外组织培养研究表明, 乙酸浓度超过 0.025% 会对人成纤维细胞和角质形成细胞产生毒性。这一数据与醋洗液的频繁使用形成鲜明对比, 因为阴道内长时间使用醋洗液并无不适 (Nyirjesy 等, *Obstetrics and Gynecology* 90 (1) : 50-53 1997)。

除醋之外, 用柠檬酸作潜在的抗菌剂也是可行的, 但是有关其抗菌功效报道的出版科技文献还不多见。不过柠檬酸是食品和饮料, 如

软饮料中常用的防腐剂。在例如牙科手术的医疗过程中，还使用柠檬酸进行消毒（Smith 等，American Association of Endodontists, AAE, Volume 12, number 2; 2004 年 6 月 4 日从 AAE 网站摘录）。

虽然能用于抗菌的方法和物质很多，但大多数方法和手段并不适用所有情况，而且效果有限、有毒并且/或者产生微生物耐受性。所以考虑到微生物滋生是持久性问题，就不断需要有新的抗菌方法和物质。

现有技术描述

回顾现有技术，有大量的抗菌组合物和方法。这里列举几例。

美国专利 4,308,293 公开了包括焦木酸和焦木酸络合物、用作动物饲料的抗真菌、抗细菌防腐剂的组合物。

美国专利 6,110,908 公开了包括消毒酒精、抗菌脂质体及其组合、用于局部消毒的组合物。

美国专利 6,106,773 公开了一种用于生物流体消毒的水性碘化基质材料。

美国专利 5,308,611 公开了含组合物、用作消毒剂的氯己定。

美国专利 5,336,432 公开了一种有消毒、漂白特性的微乳凝胶，它由含水和丙二醇的水相和通常含至少一种表面活性剂、润肤剂和油的油相混合制成。该微乳中还加入了过氧化氢。

美国专利 4,035,483 公开了一种包含次氯酸盐与蛋白质反应产物的抗菌组合物。

美国专利 5,785,972 公开了一种含胶银、*helichrysum angusifolium* 或 *helichrysum italicum* 油和水溶性卵磷脂乳化原蜜（raw honey）的消毒液。

美国专利 5,855,922 公开了含金属氯酸盐、用于治疗皮肤病的抗

菌组合物。

美国专利 6,589,513 公开了一种包括辣椒和其他天然成分、用作口腔消毒剂的组合物。辣椒对该组合物中其他组分起增效作用。

Lauman 等 (American Journal of Surgery 157 : 359 1989) 发表了有关皮肤消毒剂的综述。

尽管已有许多已知的抗菌制剂,但仍然需要在多种情况下都易使用的更有效制剂。本发明提供一种包括弱有机酸和 EDTA 混合物、具有抗菌作用且不依赖于 H^+ 浓度 (pH) 的组合物。该组合物在受损部位施用 10-20 分钟即可去除,去除后仍提供保护/伤口清洁作用。这与现有抗菌制剂需要长时间持续保留在受损部位截然不同。现有技术中没有公开这种特性的组合物。所以,本发明组合物使人们对强效抗菌制剂的渴望得以满足。

虽然并不想限定成任何特定的操作模式,但理论上在 EDTA 存在时弱有机酸组合使微生物蛋白变性的作用被增强。

发明内容

授予本发明人、其内容在此引入作为参考的美国专利 6,469,066 B1 (2002 年 10 月 22 日) 涉及组合物、其使用方法及环境,其中这些组合物包括置于胶状载体内的弱有机酸和 EDTA 混合物,用于靶定伤害感受器,特别是 TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid, 辣椒素受体), 并且缓解尤其因灼伤引起的疼痛感。在施用这些组合物时意外发现它们有广谱杀菌剂功效。本说明书公开了使用这些组合物减少和预防细菌感染/超感染的方法。该组合物尤其适合战区使用,因为那里外伤很普遍,而且伤员经常不能及时撤离。

本申请还涉及 2002 年 8 月 30 日提交的美国专利申请 10/232,080, 其内容在此引入作为参考。

本发明组合物包含至少两种置于胶状载体内、根据特定工艺参数混合的弱有机酸，这些弱有机酸例如优选为但不限于醋、柠檬酸和乙酸。该组合物无论是感染后立即施用还是延误后施用，均观察有杀菌功效。该组合物可以凝胶或喷雾形式使用。以创伤敷料、吸收绷带、女性卫生用品、尿布等形式制成各种可发挥本组合物功效的物品也属于本发明的范围。

所以，本发明的一个目的是提供对减少和/或预防细菌感染/超感染，特别是伤口的细菌感染/超感染有效的组合物。

本发明的另一目的是提供一种减少和/或预防细菌感染/超感染、包含治疗有效量的至少两种弱有机酸和 EDTA 的组合物。

本发明的再一目的是从包括但不限于乙酸、醋、柠檬酸或其组合的组中选用置于药理有效载体内的治疗有效的弱有机酸，其中该组合物的 pH 约为 2.5-4.5。

本发明的再一目的是提供一种优选为使用卡波普（Carbopol）凝胶剂或其等同物的水基凝胶形式的、用于弱有机酸的药理有效载体。

本发明的再一目的是提供一种减少和/或预防伤口细菌感染/超感染的方法，其包括：在受损部位施用一种组合物，该组合物包括置于药理有效载体内的、治疗有效量的、至少两种选自包括但不限于乙酸、醋、柠檬酸及其组合的弱有机酸和 EDTA，其中所述组合物的 pH 约为 2.5-4.5；所述治疗有效量能减少和/或预防所述伤口的细菌感染/超感染。

本发明的再一目的是伤口暴露在外后尽速施用本说明书公开的组合物。

本发明的再一目的是受损部位施用本说明书公开的组合物后预定时间内，优选但不限于 5-20 分钟，从受损部位去除该组合物。

本发明的再一目的是提供一种用于减少和/或预防细菌感染/超感染的试剂盒，其包括一种用于减少和/或预防伤口细菌感染/超感染的组合物，该组合物包括置于药理有效载体内的、治疗有效量的、至少两种选自乙酸、醋、柠檬酸及其组合的弱有机酸和 EDTA，其中所述组合物的 pH 约为 2.5-4.5；选自伤口敷料、吸收绷带、女性卫生用品和尿布的包裹或包扎材料；以及使用说明书。

结合下面以说明和举例、本发明特定实施例方式进行阐述的说明及附图中可显而易见的了解本发明的其他目的和有益效果。附图构成本说明书的一部分，包括本发明的典型实施例，并示出本发明的各项目的及其特征。

缩略语和定义

本说明书所用术语、短语和缩略语定义如下，虽然以下术语、短语和缩略语以单数形式列出，但其定义包括所有的语法形式。

本文所用术语“微生物的”是指微生物的或与微生物相关的。

本文所用术语“微生物”是指借助显微镜才能看到的任何微生物。本发明组合物尤其抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有效。本文所用术语“微生物（microorganism）”和“微生物（microbe）”可互换使用。

本文所用术语“革兰氏阳性菌”是指革兰氏染色试验中染成蓝紫色（阳性）的细菌细胞。革兰氏染色剂能与革兰氏阳性菌细胞壁中富含的肽聚糖结合。相反，“革兰氏阴性菌”的细胞壁中肽聚糖含量低，所以在革兰氏染色试验中革兰氏阴性菌吸收复染剂。

本文所用术语“细菌污染”是在物质含有 $<10^4$ 细菌/ml 时使用。

本文所用术语“细菌感染”是指细菌侵入机体组织内繁殖而导致组织损伤和疾病。

本文所用术语“细菌超感染”是指前一次感染后又发生第二次感

染；第二次感染通常比第一次感染更具破坏性，这往往是由于细菌对第一次感染治疗时所用抗生素产生抗性所致。本发明组合物能减少细菌感染（和/或超感染）并阻止感染恶化。

本文所用术语“CFU”是指菌落形成单位（colony forming unit），是用来确定活细菌数量的度量单位。

本文所用术语“浮游生长”是指细菌体悬浮在液体培养基中自由游动的生长。

本文所用术语“生物膜生长”是指细菌集合体在固体表面上生长。

本文所用术语“弱酸”是指在水中不完全电离的酸；某一时间点这类酸多数都以非电离分子形式存在。“有机”酸是指含碳原子、通常含碳链的酸。醋是不纯的弱有机酸乙酸。

本文所用首字母缩写词“EDTA”是指乙二胺四乙酸，一种金属螯合剂。

本文所用术语“pH”是指溶液中氢离子浓度的度量单位。

本文所用术语“增效作用”是指至少两种物质在一起作用，导致总效果增加，这种结合比其中任一种物质单独作用的效果更强。

本文所用术语“无效对照剂”是指人为进行的无效治疗。临床上使用无效对照剂来比较治疗相对于不治疗的结果。试验性治疗必须相对于无效对照剂获得结果才能视为有效。

本文所用短语“有效量”是指足以使微生物污染减少的弱酸量。

本文所用短语“药理有效载体”是指准许在人和动物中使用、有助于输送本发明组合物中弱酸、并且不影响疗效的载体。本发明的载体是一种没有药理或治疗作用的惰性载体。

本文所用术语“治疗”是指任何有益的医治结果，特别是减少和/或预防细菌感染/超感染。

本文所用缩略语“AA”是指乙酸（acetic acid）。

本文所用缩略语“CA”是指柠檬酸（citric acid）。

本文所用缩略语“PBS”是指磷酸缓冲盐（phosphate-buffered saline）。

附图说明

图 1 是铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）分别在含本发明组合物和含无效对照剂组合物的肉汤中生长的比较图；

图 2 是另一张铜绿假单胞菌分别在含本发明组合物和含无效对照剂组合物的肉汤中生长的比较图；

图 3 是铜绿假单胞菌分别在三块聚氨酯海绵上生长的比较图；第一块海绵含有本发明组合物，第二块海绵含无效对照剂组合物，第三块海绵含有熟知的临床准用抗菌剂（5%醋酸磺胺米隆）。将铜绿假单胞菌接种到聚氨酯海绵上之后立即分别施加各组合物 1 次。

图 4 是比较铜绿假单胞菌在两块聚氨酯海绵上生长的对照图；一块海绵包含无效对照剂组合物，另一块海绵含有熟知的临床准用抗菌剂（5%醋酸磺胺米隆）。

图 5 是铜绿假单胞菌分别在三块聚氨酯海绵上生长的比较图；第一块海绵含有无效对照剂组合物，第二块海绵含有本发明组合物，第三块海绵也含有本发明组合物。所有海绵上施加 1 次；5 分钟后去除第二块海绵上的组合物，20 分钟后去除第三块海绵上的组合物。

图 6 是表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermis*）分别在三块聚氨酯海绵上生长的比较图；第一块海绵含有无效对照剂组合物，第二块海绵含有本发明组合物，第三块海绵也含有本发明组合物。所有海绵上施加 1 次；5 分钟后去除第二块海绵上的组合物，20 分钟后去除第三块海绵上的组合物。

图 7 是铜绿假单胞菌分别在两块聚氨酯海绵上生长的比较图；第一块海绵含有无效对照剂组合物，第二块海绵含有本发明组合物。将细菌接种到海绵上之后 4 小时施加各组合物 1 次。

图 8 是铜绿假单胞菌分别在两块聚氨酯海绵上生长的比较图；第一块海绵含有无效对照剂组合物，第二块海绵含有本发明组合物。将细菌接种到海绵上之后 24 小时施加各组合物。施加 3 次 10 分钟，第三次施加的凝胶保留到实验结束。

图 9 是铜绿假单胞菌在聚氨酯海绵上生长的比较图；海绵含有无效对照剂组合物或本发明组合物。将细菌接种到海绵上之后 24 小时施加各组合物 1 次。10 分钟后去除各组合物。

具体实施方式

本发明提供一种新型并极其有效的抗菌组合物。该组合物不受 pH 影响，能有效抵抗广谱革兰氏阳性和革兰氏阴性菌。目前使用的抗菌组合物需要在受损的伤口部位持续保留较长时间以便发挥效用，相反，本发明组合物即使从受损的伤口部位去除，仍然继续发挥保护作用。

本发明组合物含有一种需谨慎控制浓度的酸，典型地是来自人皮肤能耐受的弱有机酸，优选地是选自乙酸、醋、柠檬酸或其组合的有机酸。在一个优选实施例中，该组合物包含乙酸终浓度约 0.5-5% 的乙酸或醋酸和约 2-8% 的柠檬酸。在一个最优选实施例中，该组合物包含乙酸终浓度约 1% 的乙酸或醋酸和 5% 的柠檬酸。该组合物可以是液体、凝胶、洗液、气雾剂形式、或者是施用在皮肤上的敷料形式。

本组合物的 pH 约为 2.5-4.5。该组合物的 pH 选择取决于所用制剂和该制剂中其他组分对酸性 pH 的耐受能力。基于卡波普的凝胶制剂的 pH 优选为约 4.2，该 pH 值对凝胶制剂有利。

将本组合物制成凝胶或洗液形式，可在皮肤的受损部位产生较长时间的持续作用。该凝胶或洗液可以是使用合适的胶凝剂或增稠剂的水基凝胶。该洗液也可以是乳剂——水包油乳剂或油包水乳剂。典型的这类乳剂是使用包括硬化剂、润肤剂、乳化剂和保湿剂的常规成分制成。硬化剂通常是油溶性的脂肪醇，如硬脂醇、鲸蜡醇、月桂醇和肉豆蔻醇。润肤剂通常是异丙基豆蔻酸酯、羊毛脂、羊毛脂衍生物、异丙基棕榈酸酯、异丙基硬脂酸酯和对应的癸二酸酯。乳化剂优选为非离子物质，通常是山梨糖酐单油酸酯和硬脂酸聚羟氧（40）酯。保湿剂通常是丙二醇、山梨醇、甘油及其混合物。选用的乳剂成分能耐受最终的约 2.5-4.5 的 pH。典型的制剂组成按重量百分比如下：

组分	重量%
凡士林	0-25
硬化剂	7-45
润肤剂	0-15
乳化剂	4-16
保湿剂	7-40
弱有机酸	5
水 q.s.	100

本发明组合物优选为制成弱酸浓度稳定的水溶性凝胶。例如，该凝胶制剂可使用卡波普作胶凝剂。卡波普是食品、化妆品、处方药和 OTC 药中常用的胶凝剂，高度亲水，用自来水可快速去除。这一特点便于再次施用以延长本组合物的抗菌作用。

所用的卡波普聚合物购自 B.F. Goodrich 公司，是高分子量的丙烯酸交联聚合物。卡波普均聚物是丙烯酸与烯丙基蔗糖或烯丙基季戊四醇交联的聚合物。卡波普共聚物是被长链烷基（C10-C30）丙烯酸酯

修饰、并与烯丙基季戊四醇交联的丙烯酸聚合物。通常使用的树脂是松软的白色干燥粉末（100%有效）。聚合物的烯丙酸主链上的羧基决定着产品的多数优点。卡波普树脂的每个羧基的平均当量为 76。

外观：松软、白色、略微酸性粉末

体积密度：约 208kg/m^3 （13 lbs ft³）

比重：1.41

船运含水量：最大值 2.0%

平衡含水量：8-10%（50%时，比较潮湿）

pK_a ：6.0±0.5

1.0%水分散液 pH：2.5-3.0

0.5%水分散液 pH：2.7-3.5

当量：76±4

灰分：0.009ppm（均值）

玻璃化转变温度：100-105°C（212-221°F）

共溶剂（环己烷/乙酸乙酯混合物）中产生的聚合物的体积密度为 176kg/m^3 （11 lbs/ft³）。乙酸乙酯中产生的聚合物中的平均灰分（如硫酸钾）为 1-3%。

本领域的技术人员显然可知，如果其它已知的胶凝剂在最终的 pH 范围内也能形成凝胶，并且不影响有机酸的效用，则除卡波普外，还可以使用其它胶凝剂，或者使用其它胶凝剂来替代卡波普。

本发明组合物还可以制成气雾剂形式，优选地是装在泵式容器内以合适的喷雾形式喷在受损部位。这种气雾剂可以仅仅是弱有机酸的水溶液，或者可以包括其它成分，气雾剂中典型的其它成分例如为硬化剂、保湿剂或草药提取物，如库拉索芦荟（Aloe Vera），只要这些额外的成分不影响本组合物的特性就行。气雾剂形式的优点在于不用

与皮肤直接物理接触即可将其施用到受损部位。

本发明组合物还可以制成施用在皮肤上的敷料形式。该敷料可以是浸有本发明组合物的纱布或其他合适的吸收材料。使用这种敷料可以建立一道物理屏障，帮助保护受损部分免受与外界可能的摩擦接触。

本发明组合物还可以制成保持在吸收物纤维基质内的吸收凝胶形式，如护垫或卫生棉条等女性卫生用品，或者根据需要可以是尿布等。虽然并不想限定成任何特定的操作理论，但据认为，因为可从身体吸收湿气，所以存在向有关的表皮接触部位输送本发明组合物的有效成分的路径。

本发明的实施例可以制成试剂盒形式，其包含用于减少和/或预防细菌感染/超感染的组合物，该组合物包括置于药理有效载体内的、治疗有效量的、至少两种选自乙酸、醋、柠檬酸及其组合的弱有机酸和 EDTA，其中所述组合物的 pH 约为 2.5-4.5；选自伤口敷料、吸收绷带、女性卫生用品和尿布的包裹或包扎材料；以及使用说明书。

在上述试剂盒中还包括有助于使受损组织免受环境侵害的其他物品，以及其他帮助皮肤治疗的物品，这些都在本发明的范围内。帮助输送本组合物的施加器也可以包括在该试剂盒中。

下面将述及本发明组合物制剂的一些实施例。应当意识到，这些特定实施例并非要限制本发明，而只是对优选实施例作出说明。

酸性凝胶的制备

A. 制备两种含以下酸的凝胶：

1：1%乙酸（AA）/5%柠檬酸（CA）凝胶（200ml）

2：1%乙酸/4%柠檬酸凝胶（200ml）

B. 根据上述酸浓度制备以下含 0.1% EDTA 的溶液：

	5%CA+1%AA	4%CA+1%AA
CA 一水合物 (FW. 210)	11.0g	8.75g
EDTA 120g	0.20g	0.20g
蒸馏水	加到 160ml	加到 160ml
醋 (~5%乙酸)	40ml	40ml

C. 凝胶产品装到约 300ml 的烧杯中

以最高转速 (2500rpm) 进行磁力搅拌

用精细金属网将 3.6g 卡波普 940NF (1.8g/100ml) 非常缓慢地加到上述各溶液中, 避免成团。

不断搅拌悬浮液直到顺滑而且没有白色卡波普薄片为止; 如果还有少量薄片, 用刮铲搅散。

每次加入 10N NaOH 1ml/0.5ml/0.2ml, 得到 pH4.2 的
5%CA+1%AA: 10.3ml 10N NaOH (5.2 ml NaOH/100ml 凝胶) 和
4%CA+1%AA: 9.0ml 10N NaOH (4.5 ml NaOH/100ml 凝胶); 卡波普胶凝化使磁力搅拌子停止搅拌, 剩下的搅拌工作则需要用刮铲完成。

将凝胶转到 15 ml 和 50ml 的 Falcon 管中, 旋转 5 分钟/2000rpm (550g) 将凝胶中气体排出。

为避免醋中的乙酸挥发, 一定不要用真空来排除混合物中气体。

其他凝胶制剂

用蒸馏水将冰乙酸 (99.8%) 和固体柠檬酸一水合物 (分析纯) 分别稀释到 5% (wt/v)。另外用柠檬酸一水合物和含 5%乙酸的食品级商品醋制备含 4%或 5%柠檬酸和 1%乙酸的混合物。将该混合物置于室温下并搅动 20 分钟, 纤维素膜过滤, 然后加入 EDTA 至 0.1%。

接着，缓慢加入固体卡波普 940NF 或 980NF 至 1.8%，同时高速磁力搅拌直到悬浮液中没有颗粒为止。然后向混合物中加入 10N NaOH 缓慢搅拌，调节其 pH 至 4.2 以利于胶凝化。例如，每 100ml 醋和 5% 乙酸凝胶需要 2.8ml 碱性溶液，而 100ml 5%柠檬酸凝胶则需要 4.3 ml 碱性溶液。

10N NaOH 的实际用量可能稍有变化，这取决于所用蒸馏水的特定 pH 参数。最后室温下低速（2000rpm）离心 5 分钟将凝胶悬浮液中多余气体排出。

同样用蒸馏水、EDTA 和卡波普 940NF 或 980NF 制备中性（pH7.0）凝胶作为酸性凝胶的对照。由于卡波普介导的胶凝化在接近中性 pH 时更有效，所以制备中性凝胶所用的卡波普量明显减少。另外，也可用 10N NaOH 滴定 5%乙酸来制备中性凝胶。

这些制剂概括如下：

制备 I：醋制剂

成分	使用量
醋	100ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	2.8ml

制备 II：5%乙酸制剂

成分	使用量
冰乙酸（99.8%）	5.01ml
蒸馏水	94.99ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g

10N NaOH	2.8ml
制备III：5%柠檬酸制剂	
成分	使用量
柠檬酸一水合物	5.5g
蒸馏水	加至 100ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	4.3ml
制备IV：5%柠檬酸+醋制剂	
成分	使用量
柠檬酸一水合物	5.5g
蒸馏水	加至 80ml
醋	20ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	5.2ml
制备V：4%柠檬酸+醋制剂	
成分	使用量
柠檬酸一水合物	4.4g
蒸馏水	加至 80ml
醋	20ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	4.5ml
制备VI：蒸馏水制剂 pH7.0	
成分	使用量

蒸馏水	600ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	1.9ml

制备VII：用 5%乙酸和 NaOH 制备的中性制剂（pH7.0）	
成分	使用量
冰乙酸（99.8%）	5.01ml
蒸馏水	94.99ml
EDTA	0.1g
卡波普	1.8g
10N NaOH	11.0ml

用于测试本组合物的抗菌功效的实验的代表性实施例描述如下。

实施例 1

胰蛋白大豆肉汤、37℃、摇动水浴下培养铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）（ATCC 27317，革兰氏阴性菌），获得对数生长期的生长培养物。然后用无菌磷酸缓冲盐（PBS）洗涤该悬浮液两次，并用无菌 PBS 重悬。将系列稀释液铺到添加 5%羊血的胰蛋白大豆琼脂平板上，以测定洗涤后接种菌的细菌浓度。

为测定浮游生长，将无效对照剂组合物和本发明组合物各 200μl 分别加到含 10⁴ 菌落形成单位（CFU）/ml 的胰蛋白大豆肉汤中。手动混匀细菌混合物直到所有凝胶溶解，然后 37℃培养 48 小时。培养期间，采用熟知的微生物程序在各时间间隔测定细菌生长。

与含无效对照剂组合物的肉汤相比，含本发明组合物的肉汤在细菌培养 3 小时内，铜绿假单胞菌数量降低 2 个对数级（Log）。在使用

本发明组合物的48小时实验中,浮游生长趋于稳定(3.3×10^2 CFU/ml),而使用无效对照剂组合物,观察到菌数增加7个对数级。实验数据如图1和图2中所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例2

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(ATCC 27317)培养同例1。

本研究模拟伤口表面感染后立即治疗的情形。

为测定本发明组合物清除细菌生物膜的能力,使用聚氨酯海绵模型体外模拟表面感染和深度感染的伤口。将聚氨酯海绵放在浅水盘中,接种 10^2 CFU铜绿假单胞菌。接种后立即取无效对照剂组合物、含5%醋酸磺胺米隆(熟知的临床准用抗菌凝胶)的无效对照剂组合物和本发明组合物各200 μ l分别施加到各聚氨酯海绵上。这些组合物保留在海绵上,37 $^{\circ}$ C培养72小时。培养期间在各时间间隔测定细菌生长。

24小时内,覆有无效对照剂组合物的海绵上的细菌数增加到 10^{10} CFU,随后48小时趋于稳定。相反,72小时内,本发明组合物施加1次后细菌数维持在 10^4 CFU以下。而且,在第一个48小时内,海绵上施加本发明组合物的细菌数要比使用临床准用抗菌组合物低3个对数级。该实验数据如图3所示。图4是比较两块聚氨酯海绵上铜绿假单胞菌生长的对照图;一块海绵含无效对照剂组合物,另一块海绵含熟知的临床准用抗菌制剂(5%醋酸磺胺米隆)。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例3

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(ATCC 27317)培养同

例 1。

本实验是要确定组合物发挥显著抗菌作用的最小施用时间。将四块聚氨酯海绵置于一个浅水盘中，接种 10^3 CFU 铜绿假单胞菌。将 1 份 200 μ l 无效对照剂组合物（施加 1 次）施加到海绵 1 和 2 上，1 份 200 μ l 本发明组合物施加到海绵 3 和 4 上。细菌接种后立即将各份施加到海绵上。5 分钟后去除海绵 1 和 3 上的组合物，20 分钟后去除海绵 2 和 4 上的组合物。然后将海绵置于 37℃ 培养 72 小时。

24 小时内，覆有无效对照剂组合物的海绵上的细菌数增加到至少 10^9 CFU；随后 48 小时趋于稳定。相反，接种后 48 小时内，本发明组合物施用 1 个 5 分钟后铜绿假单胞菌被清除。将本发明组合物的施用时间增加到 20 分钟，24 小时内铜绿假单胞菌数降低 5 个对数级，随后未观察到细菌生长。该实验数据如图 5 所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例 4

本实验用表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermis*）（ATCC 12228，革兰氏阳性菌）代替铜绿假单胞菌重复例 3 实验。

表皮葡萄球菌培养同例 1 中铜绿假单胞菌的培养。

本发明组合物施用 1 个 5 分钟，48 小时后清除表皮葡萄球菌。该实验数据如图 6 所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例 5

铜绿假单胞菌（ATCC 27317）培养同例 1。

本实验模拟进行任何医疗性干扰之前因治疗延误而导致伤口感染逐渐恶化的情形。

将两块海绵置于一个浅水盘中，接种 10^3 CFU 铜绿假单胞菌。细

菌接种后 4 小时，取 1 份 200 μ l 无效对照剂组合物施加到第一块海绵上，取 1 份 200 μ l 本发明组合物施加到第二块海绵上。之后将海绵置于 37℃ 培养 72 小时，组合物一直保留在海绵上。培养期间在各时间间隔测定细菌生长。

4 小时内，接种细菌的海绵上铜绿假单胞菌水平增加 1 个对数级。24 小时内覆有无效对照剂组合物的海绵上的细菌数增加到 10¹⁰CFU，72 小时内本发明组合物将细菌数维持在 10⁴CFU 以下。该实验数据如图 7 所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例 6

铜绿假单胞菌（ATCC 27317）培养同例 1。

本实验模拟进行任何医疗性干扰前因治疗大大延误而导致伤口感染逐渐恶化的情形。

将两块聚氨酯海绵置于一个浅水盘中，接种 10³CFU 铜绿假单胞菌。接种后 24 小时，取 1 份 200 μ l 无效对照剂组合物施加到第一块海绵上，取 1 份 200 μ l 本发明组合物施加到第二块海绵上。施加后，让第 1 份在海绵上保留 5 分钟，然后去除并再次施加，第二次施加的组合物在海绵上保留 10 分钟，然后去除并进行第三次施加，第三次施加的组合物在海绵上保留到实验结束。将海绵置于 37℃ 培养 96 小时。培养期间在各时间间隔测定细菌生长。

细菌接种后 24 小时铜绿假单胞菌水平增加到 10⁹CFU。覆有无效对照剂组合物的海绵上的细菌数维持恒定。相反，施加本发明组合物后 24 小时内观察到细菌降低 4 个对数级。施加本发明组合物后 48 小时没有观察到细菌，但 72 小时时细菌数增加到 10⁵CFU。该实验数据如图 8 所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

实施例 7

铜绿假单胞菌（ATCC 27317）培养同例 1。

本实验模拟进行任何医疗性干扰前因治疗大大延误而导致伤口不断恶化的情形。

将六块聚氨酯海绵置于一个浅水盘中，接种 10^3 CFU 铜绿假单胞菌。接种后 24 小时，取 1 份 200 μ l 无效对照剂组合物施加到前三块海绵上，取 1 份 200 μ l 本发明组合物施加到后三块海绵上。施加后 10 分钟去除海绵上的组合物。将海绵置于 37℃ 培养 96 小时。培养期间在各时间间隔测定细菌生长。

细菌接种到所有海绵后 24 小时内铜绿假单胞菌水平增加到 10^{10} CFU。覆有无效对照剂组合物的海绵上的细菌数维持恒定直至实验结束。相反，施加本发明组合物后 24 小时内观察到细菌降低 3 个对数级，随后该抗菌疗效一致维持到 96 小时。该实验数据如图 9 所示。数据以平均值 $\pm$ SEM(n=6)表示。

本说明书公开的数据有力地表明本发明组合物具有快速减少细菌的浮游生长和生物膜生长的功效。无论是感染后立即施用还是延误至 24 小时后施用，均有抗菌作用。

本说明书提到的所有专利和出版物显示出本发明所属技术领域的水平。将所有这些专利和出版物在此引入作为参考，这等同于单独、特定地指出每个出版物在此引入作为参考。应当理解，本发明对某一特定形式予以说明时，并非是要对本文所述或所示的该特定形式和排列进行限制。本领域的技术人员显然可知，在不脱离本发明的范围内可以对本发明做出各种变更，而且不应认为本发明是对本说明书所述和所示内容的限制。本领域的技术人员很容易意识到，本发明很适于执行本说明书提到的目的，并达到目标，取得有益效果，以及固有特

性。本说明书所述的组合物、相关化合物、方法、步骤和技术代表的是优选实施例，是作为典范而非对范围的限制。本领域技术人员在本发明的精神范围内会进行变更和其他应用，这些均受到权利要求范围的限定。虽然结合特定优选实施例对本发明做出描述，但应当理解，主张了权利的本发明不应受到这些特定实施例的限制。毫无疑问，为实施本发明而对所述模式作的各种改动对本领域技术人员来说是显而易见的，应属于所附权利要求的范围。

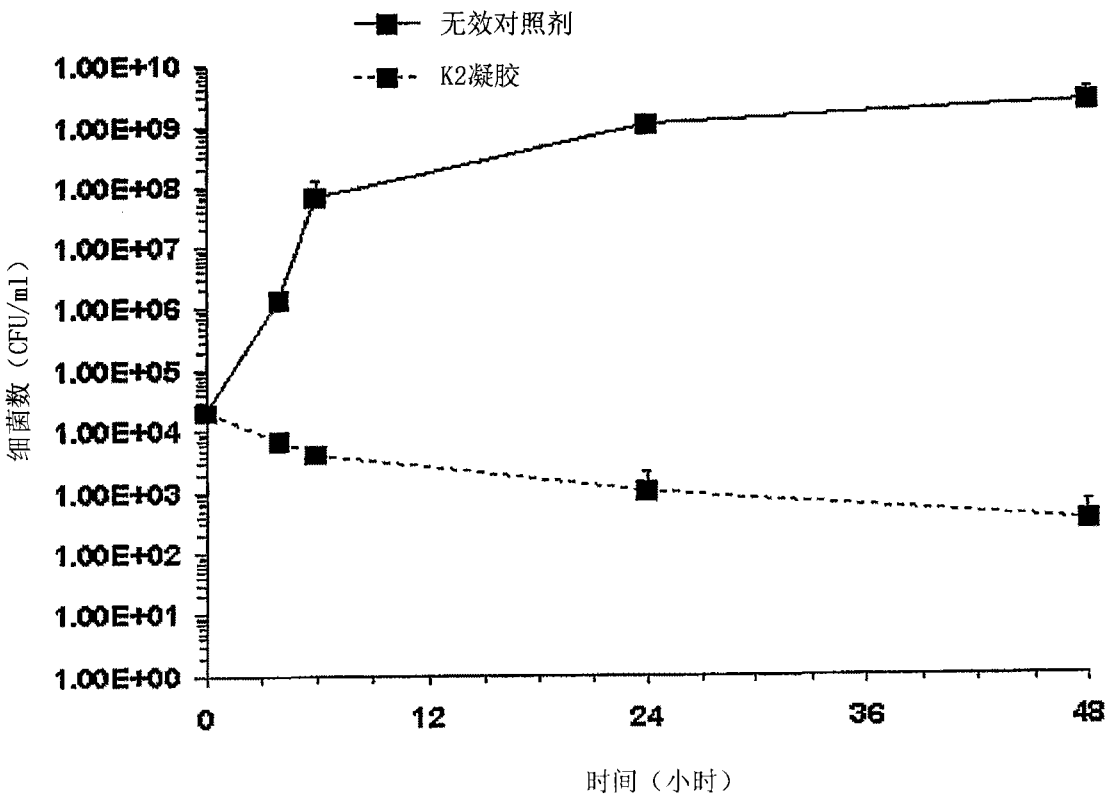


图1

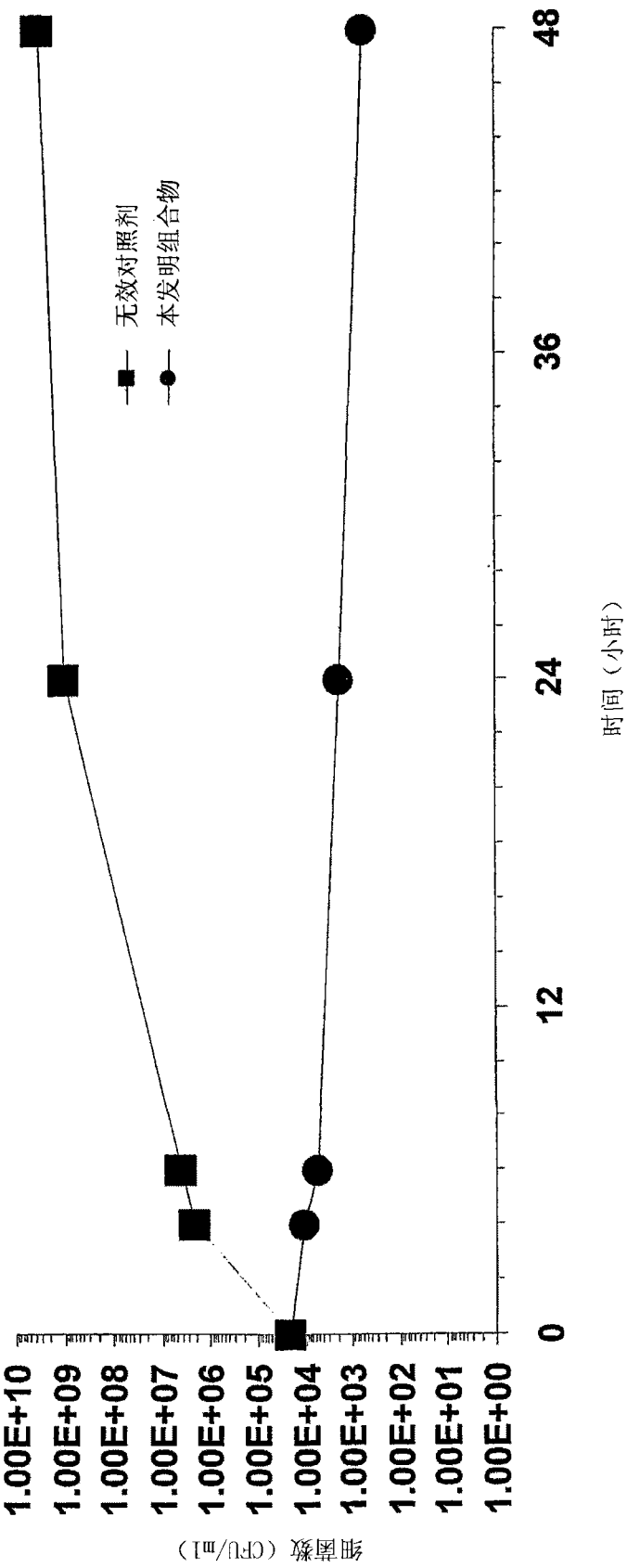


图2

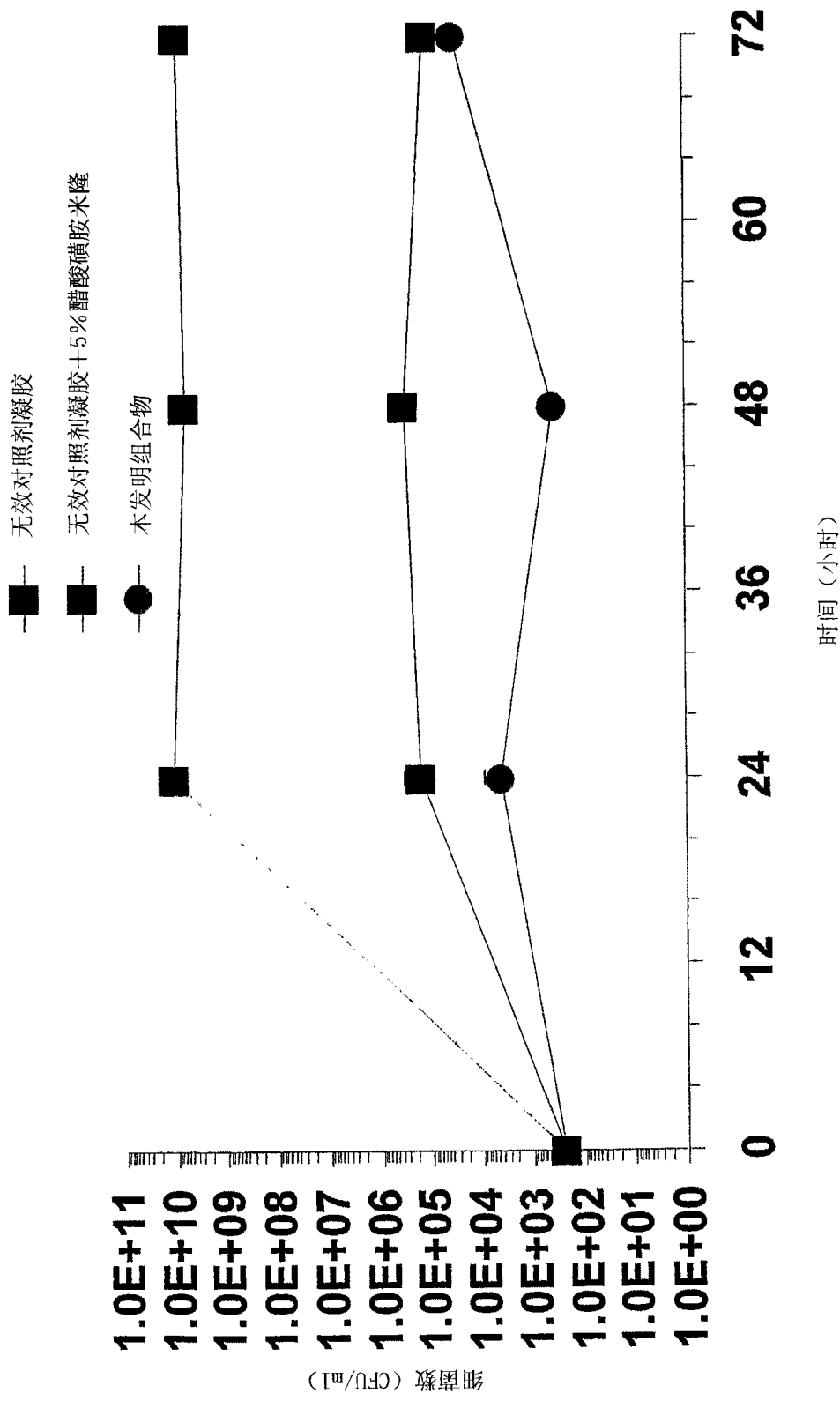


图3

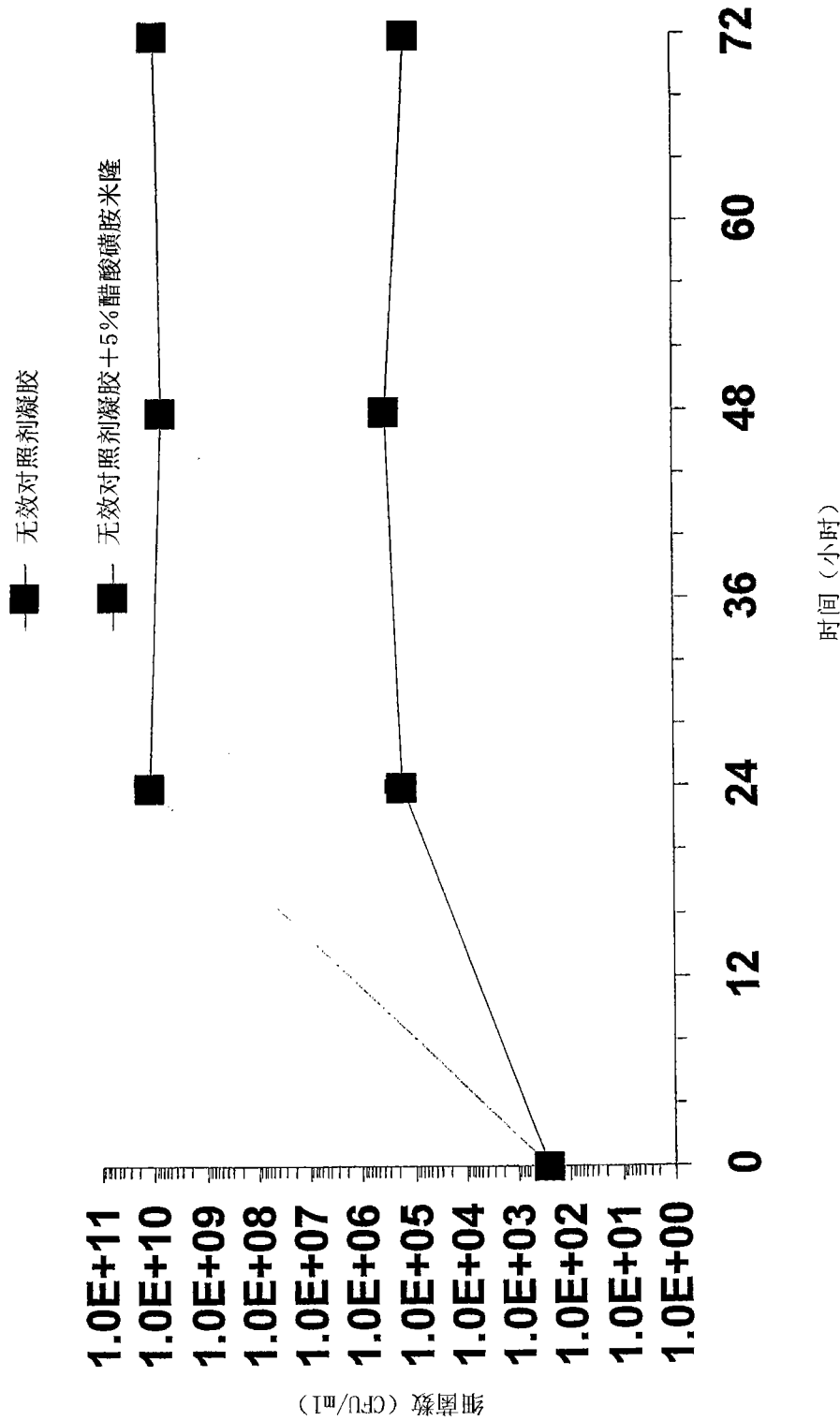


图4

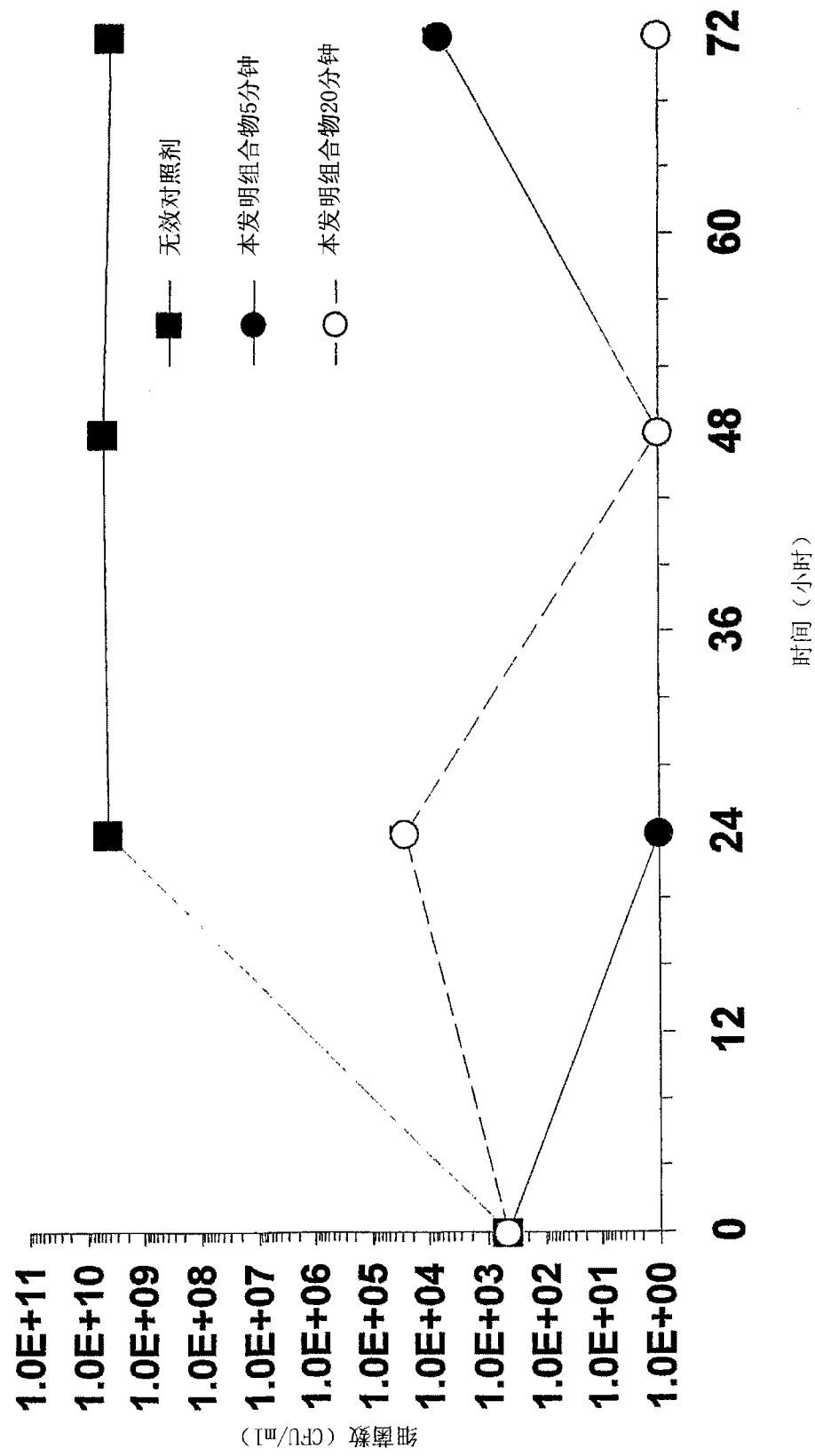


图5

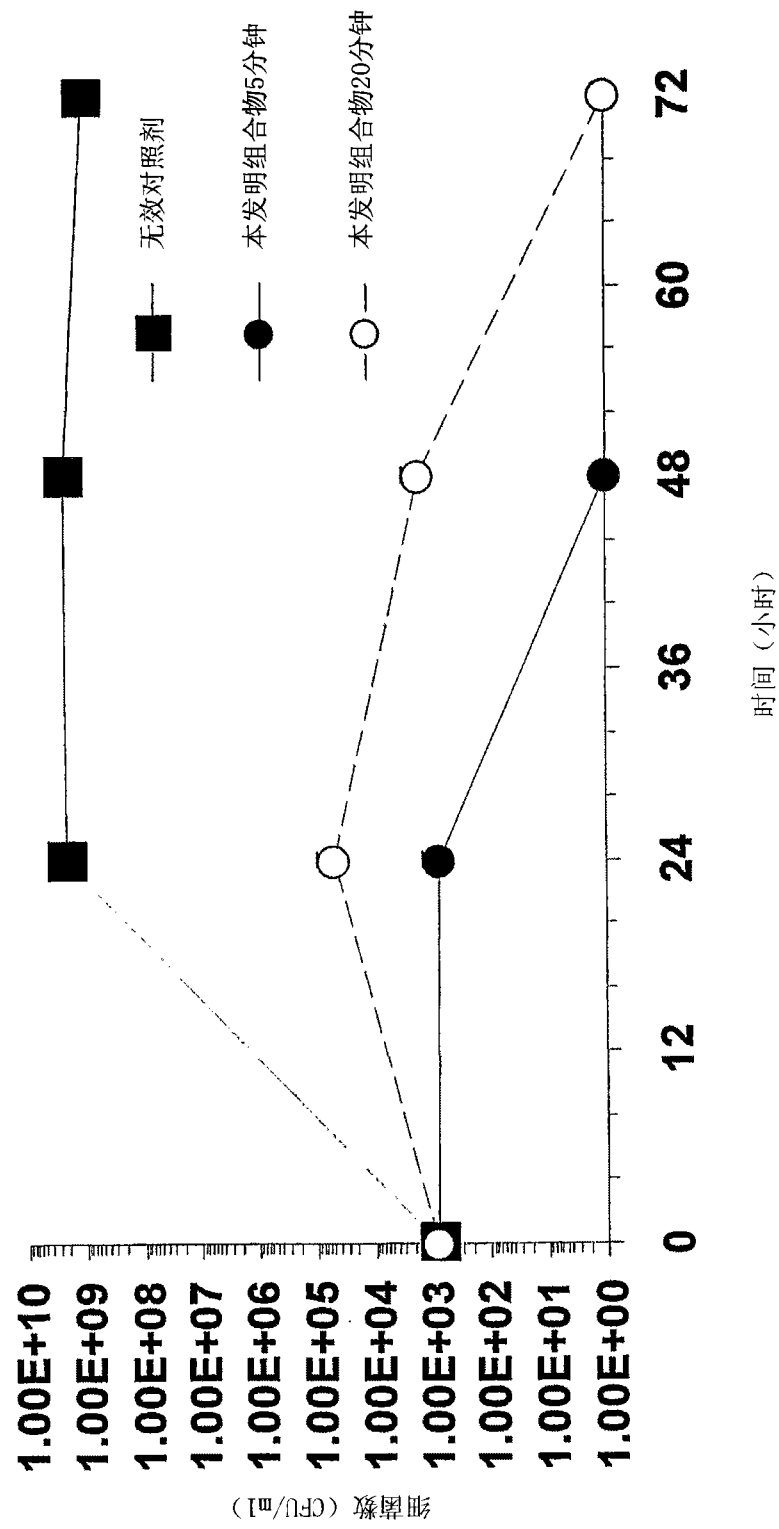


图6

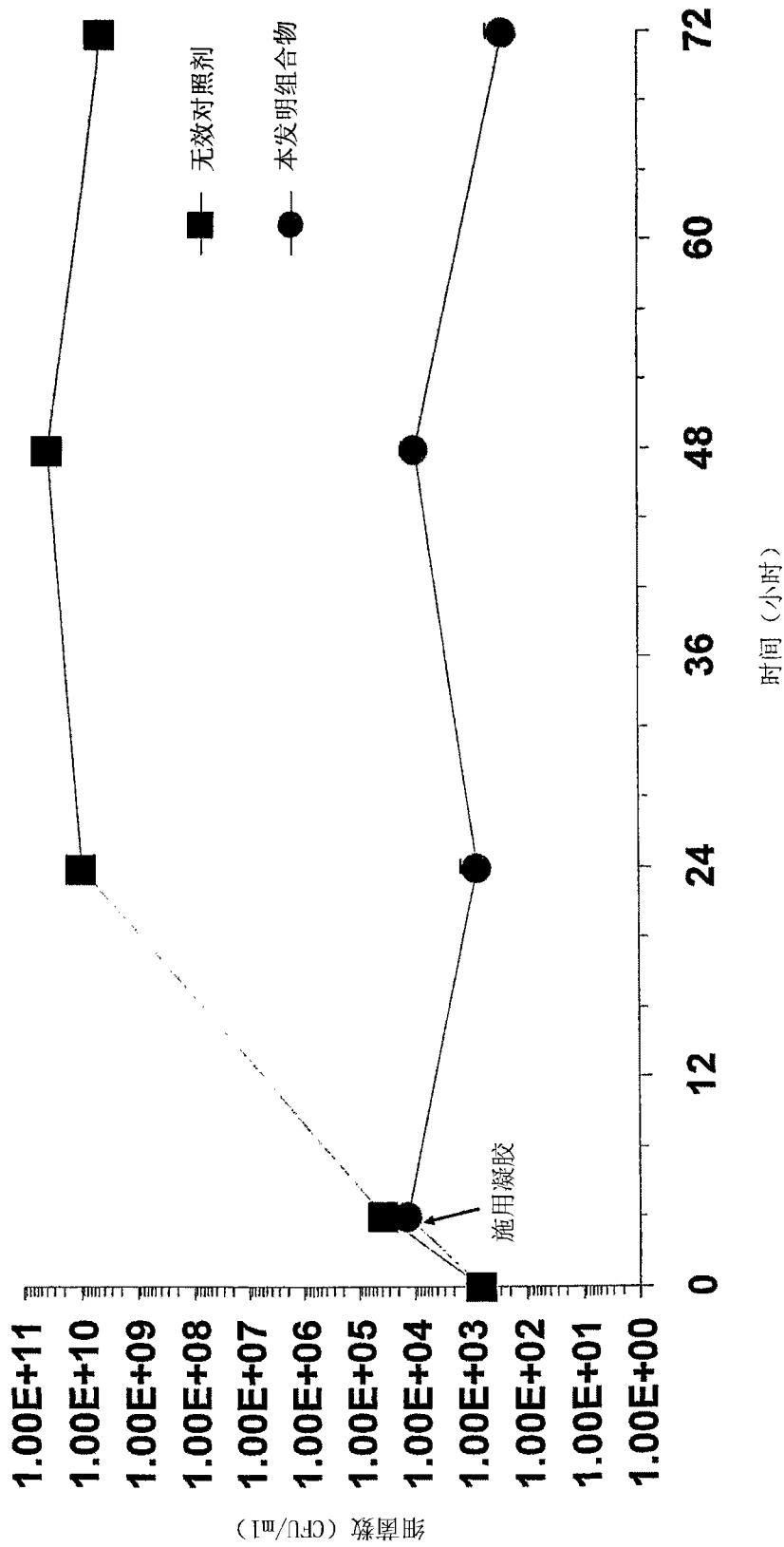


图7

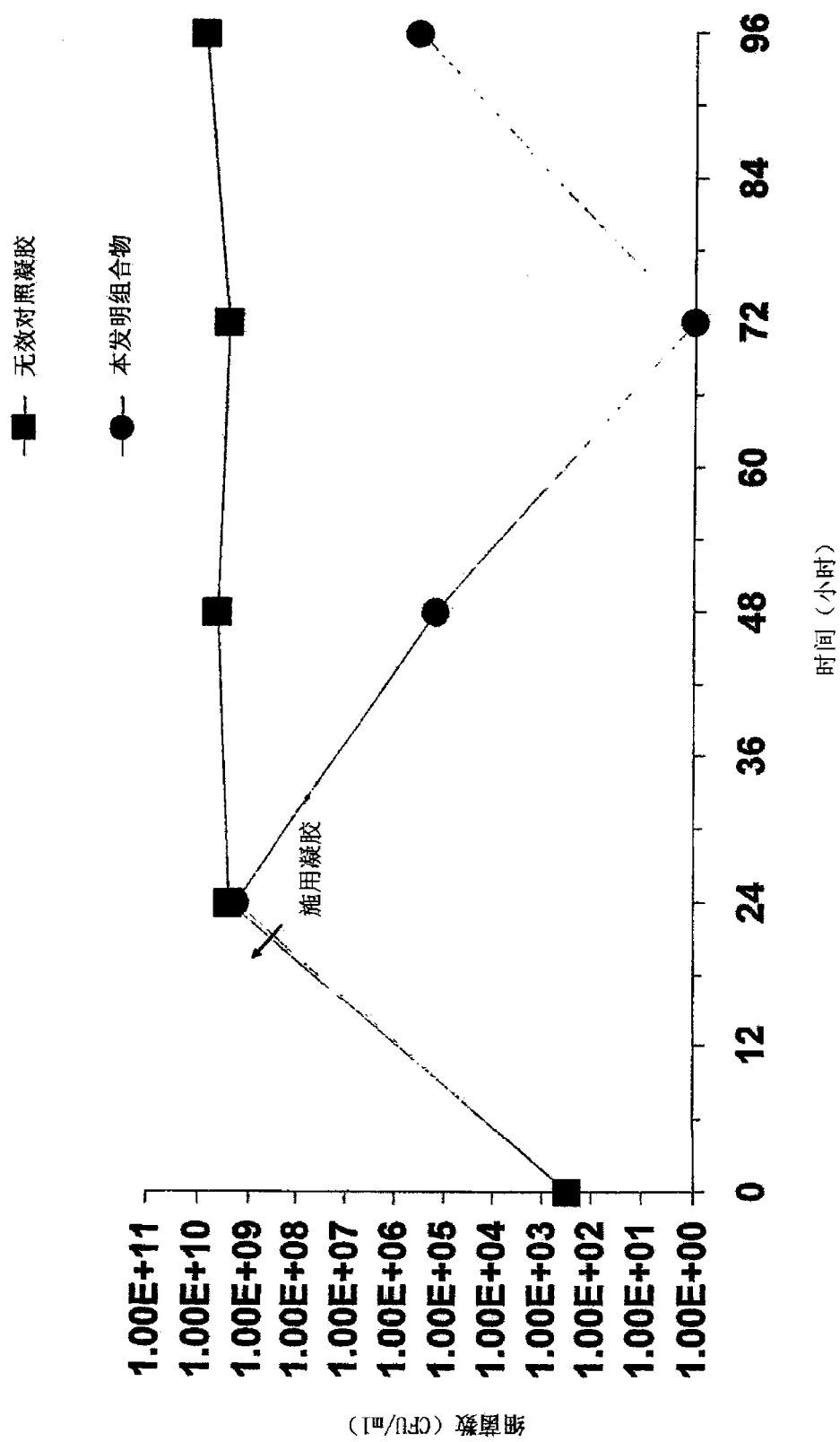


图 8

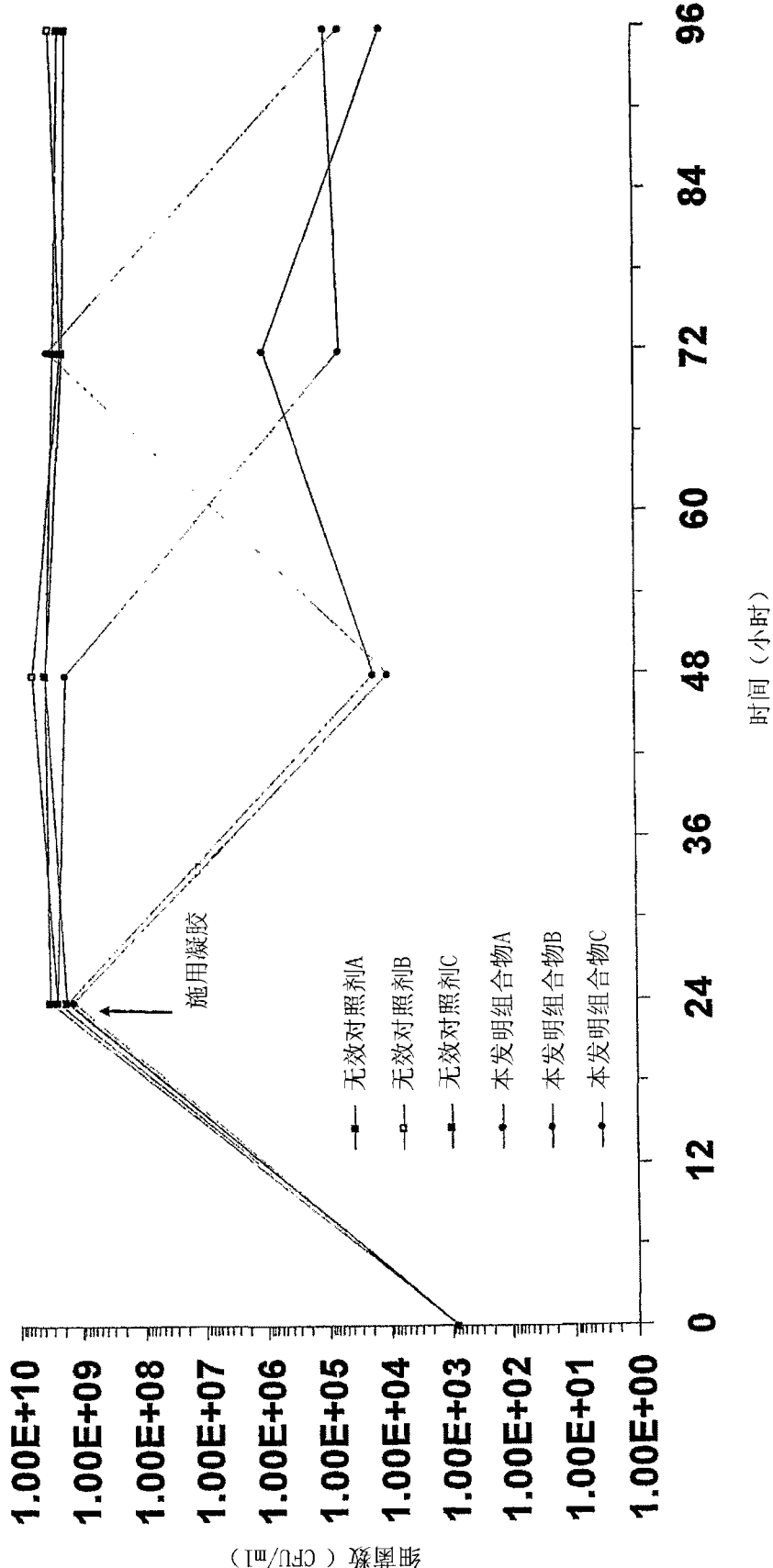


图9