

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510046498.6

A61K 38/48

A61K 9/00

A61P 17/02

A61P 31/04

A61P 31/12

[43] 公开日 2005 年 12 月 21 日

[11] 公开号 CN 1709503A

[22] 申请日 2005.5.20

[21] 申请号 200510046498.6

[71] 申请人 张 华

地址 116600 辽宁省大连市开发区哈尔滨路
34 号

[72] 发明人 张 华

[74] 专利代理机构 大连科技专利代理有限责任公司

代理人 龙 锋

权利要求书 1 页 说明书 20 页

[54] 发明名称 人溶菌酶凝胶剂、制法及应用

[57] 摘要

本发明涉及生物医药领域，人溶菌酶凝胶剂，含有人溶菌酶 300U ~ 300 万 U/mL，另外还提供其制法及应用，本发明基因重组人溶菌酶发掘了新的医疗用途，开拓了一个新的应用领域。安全无毒副作用，有很好的药用前景。并且基因重组人溶菌酶来源丰富，制备工艺简单，使用方便。本发明人溶菌酶凝胶剂发掘了人溶菌酶药物的新的剂型，人溶菌酶安全无毒副作用，有很好的药用前景。来源丰富，制备工艺简单，制成凝胶剂使用方便，可直接涂抹于创面并形成一层膜，药物剂量精确，药物在创面保留时间长，作用时间长，效果更佳。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、人溶菌酶凝胶剂，其特征是：含有人溶菌酶 300U~300 万 U/mL。

2、根据权利要求 1 所述的人溶菌酶凝胶剂，其特征是：含有杀螨止痒剂 SM-650。

3、根据权利要求 1 所述人溶菌酶凝胶剂，其特征是：人溶菌酶为基因工程表达的重组人溶菌酶或基因工程表达人溶菌酶的氨基端带有（谷氨酸-丙氨酸）₂ 或（谷氨酸-丙氨酸）₃ 修饰的人溶菌酶或基因工程表达或化学合成突变体重组人溶菌酶。

4、根据权利要求 1 所述的人溶菌酶凝胶剂，其特征是：由以下原料制成，纯度 95%的基因重组人溶菌酶 300U~300 万 U/mL/g，聚乙二醇 400 在 60~600，硬脂醇 10~30，甘油 5~50，吡咯烷铜酸钠 5~50，尼泊金甲酯 0.15~1.5，蒸馏水 18.5~268.5。

5、根据权利要求 1 所述的人溶菌酶凝胶剂，其特征是：由以下原料制成，纯度 95%的基因重组人溶菌酶 300U~300 万 U/mL/g，羧甲基纤维素钠 1~10，甘油 2~20，吡咯烷铜酸钠 5~50，尼泊金甲酯 0.15~1.5，蒸馏水 91.85~918.5。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的人溶菌酶凝胶剂在治疗由金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌、铜绿假单胞菌、表葡菌、丙酸杆菌和耐药菌引起的痤疮、烫伤、烧伤和皮肤病中的应用。

7、根据权利要求 1-5 任一所述的人溶菌酶凝胶剂在治疗由金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌、铜绿假单胞菌、表葡菌、丙酸杆菌和耐药菌引起的皮肤溃疡疾病及由病毒引起的皮肤病中的应用。

人溶菌酶凝胶剂、制法及应用

技术领域：

本发明涉及生物医药领域，特别是人溶菌酶药物及其制法、应用。

背景技术：

抗生素创造了许多医学奇迹，使许多疾病消失无踪，如肺炎、脑膜炎、产褥热、败血症、结核等。21 世纪的今天，耐药菌的发展令人触目惊心。如耐青霉素的肺炎链球菌，过去对青霉素、红霉素、磺胺等药品都很敏感，现在几乎“刀枪不入”。肺炎克雷伯氏菌对西力欣、复达欣等 16 种高档抗生素的耐药性高达 51.85%—100%。而耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌（MRSA）除万古霉素外已经无药可治。从细菌的耐药发展史可以看出，在某种新的抗生素出现以后，就有一批耐药菌株出现。开发一种新的抗生素一般需要 10 年左右的时间，而一代耐药菌的产生只要 2 年的时间，抗生素的研制速度远远赶不上耐药菌的发展速度。目前急需开发一种针对不同耐药菌株均有效的“超级抗生素”用于临床治疗。

发明内容：

本发明的目的是克服上述不足问题，提供一种人溶菌酶凝胶剂，剂型合理，使用方便、作用时间长、疗效更高，另外还提供其制法，制法简单易操作，提供其最适合的应用，以更佳的提高其作用效果。

本发明为实现上述目的所采用的技术方案是：人溶菌酶凝胶剂，含有人溶菌酶 300U~300 万 U/mL。

所述凝胶剂中还可以加入杀螨止痒剂 SM-650。

所述人溶菌酶为基因工程表达的重组人溶菌酶或基因工程表达人溶菌酶的氨基端带有（谷氨酸-丙氨酸）₂或（谷氨酸-丙氨酸）₃修饰的人溶菌酶或基因工程表达或化学合成突变体重组人溶菌酶。

所述人溶菌酶凝胶剂的配方可以是下述两种：

(1) 纯度 95%的基因重组人溶菌酶 300U~300 万 U/mL/g，聚乙二醇 400 在 60~600，硬脂醇 10~30，甘油 5~50，吡咯烷铜酸钠 5~50，尼泊金甲酯 0.15~1.5，蒸馏水 18.5~268.5。

(2) 纯度 95%的基因重组人溶菌酶 300U~300 万 U/mL/g，羧甲基纤维素钠 1~10，甘油 2~20，吡咯烷铜酸钠 5~50，尼泊金甲酯 0.15~1.5，蒸馏水 91.85~918.5

本发明所述凝胶剂的制法：将纯度 95%的基因重组人溶菌酶制得 300U~300 万 U/mL/g，将各原料在常温下混合均质，在符合 GMP 要求的制药工厂，按制药规程完成，制成凝胶剂。

本发明人溶菌酶凝胶剂在治疗由金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌、铜绿假单胞菌、表葡菌、丙酸杆菌和耐药菌引起的痤疮、烫伤、烧伤、皮肤疾病中的应用。

在治疗由金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌、铜绿假单胞菌、表葡菌、丙酸杆菌和耐药菌引起的皮肤溃疡疾病以及病毒引起的皮肤病中的应用。

本发明人溶菌酶凝胶剂发掘了人溶菌酶药物的新的剂型，人溶菌酶安全无毒副作用，有很好的药用前景。来源丰富，制备工艺简单，并可做成凝胶剂使用方便，而且针对某些疾病有其特殊的效果，水凝胶含 20%—40 的固体物，水性凝胶基质大多在水中溶胀成水性凝胶而不溶解。凝胶在释药系统周围形成一层稠厚的凝胶屏障，药物可以通过扩散作用通过凝胶屏障而释放，释放速度因凝胶屏障的作用而被延缓。本类基质一般易涂展和洗除，由于粘滞度较小而利于药物释放，特别是水溶性药物的释放，具有释药快、对皮肤无刺激性、无油腻感、能吸收组织渗出液不防碍皮肤正常功能。其他剂型与凝胶剂相比有不足，如喷雾剂、滴剂使用不如凝胶剂方便，药物剂量不如其精确，药物在创面保留时间短；膏剂由于粘滞度较大，容易黏附其它物质，或

者被其它物质黏附掉,药物剂量不如其精确,药物在创面保留时间短。而本发明凝胶剂使用方便,可直接涂抹于创面并形成一层膜,药物剂量精确,药物在创面保留时间长,作用时间长,效果更佳。

为了更好地理解本发明的实质,下面将用基因重组人溶菌酶的药理试验及结果来说明其在制药领域中的新用途。

基因重组人溶菌酶以配制 200 毫升培养基为基准,用 H₃PO₄—8 毫升、MgSO₄—5 克, K₂SO₄—6 克, KOH—3 克, CaSO₄·2H₂O—3.5 克, 加蒸馏水至 200 毫升, 高压灭菌后接种甘油管种子, 摇床转数为每分钟 250 转, 培养温度为 20—35℃, 在恒温床上培养 36—48 小时。进行种子罐培养后进行生产罐培养。将发酵表达完成的培养液进行提取纯化, 对提取纯化的蛋白浓缩液冰冻干燥, 测定蛋白量、纯度和溶菌酶活性保存。将制备好的纯度 95%~99% 活性 30000U/mL/g 基因重组人溶菌酶备用。

一、基因重组人溶菌酶 (HLZ) 体内外抗菌作用评价

1 体外抗菌作用

药品及试剂

1、人溶菌酶 (Human Lysozyme HLZ): 活性单位: 30000 单位/mL, 由大连奇龙生物技术研究所提供。

2、对照溶菌酶 (contral Lysozyme, CLZ): 白色粉末, 活性单位: 50000 单位/mg, 美国 SIGMA 公司产品, 批号: L6876。

3、克拉霉素: 效价 948 μ/mg, 中国药品生物制品检定所标准品, 批号:

4、罗红霉素: 效价 878 μ/mg, 中国药品生物制品检定所标准品, 批号:

5、注射用阿莫西林: 哈尔滨制药厂产品, 批号: 010504。

6、琼脂糖 (B10WEST AGAROSE):

7、三羟甲基氨基甲烷 (Tris): 成都化学试验厂, 批号 010211

试验菌株:所用菌株均为 2001.4-2002.4 月于四川、北京地区收集的临床分离致病菌。经本室用 API 方法重新鉴定后用于试验。

质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC25923

大肠埃希菌 ATCC25922

铜绿假单孢菌 ATCC27853

培养基:1、Tris-HCl 缓冲液: 0.1M Tris 100ml, 0.1M HCl 70ml, High Water 800ml, 测 PH 值, 用 HCl 溶液调至 PH7.2, 加 High Water 至 1000ml。

2、Tris-HCl 脂琼培养基: 在 Tris-HCl 缓冲液中加入脂琼糖 116℃ 灭菌后使用。

3、M-H 培养基: 中国药品生物制品检定所产品, M-H 肉汤培养基: 称取 25g 加 1000ml 蒸馏水, 加热溶解, 分装, 高压灭菌, 116℃ 20 分钟。M-H 固体培养基: 称取 36g, 加 1000ml 蒸馏水, 高压灭菌, 116℃ 20 分钟, 用于革兰阳性、阴性需氧菌的药敏试验。

4、血培养基, 即在 M-H 培养基中加 5-10%脱纤维兔血配制而成, 用于肠球菌、链球菌的药敏试验。

试验方法: 体外抗菌活性 (MIC) 测定: 采用琼脂二倍稀释法测定受试药物对试验菌株的最低抑菌浓度 (MIC)。将受试药物用灭菌蒸馏水溶解, 适当稀释。分别取 1ml 药液加 9ml 融化的 Tris-HCl 琼脂糖固体培养基混匀, 以二倍稀释, 制备系列含药平皿。每皿所含药物终浓度分别为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.06、0.03……0.001mg/ml; 用多点接种仪将稀释至 10⁵CFU/ml 的试验菌液接种于各含药平皿表面, 置于 37℃ 培养 8-10 小时, 取出分别吸取 6ml 融化的 M-H 培养基 (50℃) 覆盖上述系列平皿表面, 再置于 37℃ 培养 10 小时取出, 观察结果, 以无细菌生长平皿内所含最低药物浓度为该菌的最低抑菌浓度 (MIC)。

2、体内抗菌作用评价

药品：人溶性酶 来源同前。

克拉霉素 来源同前。

罗红霉素 来源同前。

阿莫西林 来源同前。

细菌：金黄色葡萄球菌 01193，金黄色葡萄球菌 MRSA021923 均为临床分离致病菌。

动物：昆明种小鼠，体重 18-22 克，由本所动物室提供。

试验方法：

1、体内保护试验：挑取一定量的菌苔接种于 2ml M-H 液体培养基中，37℃培养 6 小时后，取出用灭菌干酵母液进行适当稀释（10⁻¹，10⁻²，10⁻³，10⁻⁴），再取昆明种小鼠，随机分组，每组 5 只鼠，分别腹腔感染不同菌量的受试菌液，测定引起小鼠 100%死亡的最小致死菌量（MLD）。再按 1:0.5 剂间距设置 5 个剂量组，每组 10 只鼠，每只小鼠腹腔感染 1MLD 菌量的菌液 0.5ml，感染后即刻静脉注射受试药 0.5ml，设感染对照组（不给药），观察 1 周，记录小鼠死亡数。按 Bliss 法计算半数有效剂量 ED₅₀ 及 95%可信限。

2、小鼠皮肤烧伤感染模型的疗效评价：昆明种小鼠 26-30g，随机分组，每组 5 只鼠，分别皮肤烧伤感染模型喷涂金黄色葡萄球菌菌液 100ml，菌量为 10⁸CFU/ml，连续喷 5 次（间隔 10 分钟喷一次），末次喷菌后 6 小时，分别用无菌棉签挑取皮肤烧伤感染模型涂于无药琼脂平板表面，37℃培养 18 小时，皮肤烧伤感染模型感染细菌数在 >10³CFU/ml，且经革兰氏染色、光镜检测为金黄色葡萄球菌的小鼠为感染模型成功。选取皮肤烧伤感染模型感染成功小鼠随机分组，每组 10 只鼠，分别用喷雾器喷涂受试药物 100 μl/次，4 次/日，连续 5 日，每日采用咽拭子涂片法，于琼脂平板表面进行活菌计数，作统计学处理，与感染对照组和克拉霉素组、罗红霉素给药组作比较。

表1 人溶菌酶、鸡溶菌酶、克拉霉素和罗红霉素体内外抗菌活性

| 细菌 | MIC | | | |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| | HLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLA mg/ml | ROX mg/ml |
| 金葡 MRSA02-22 | 0.025(0.03) | 0.008(0.04) | >1 | >1 |
| 金葡 MRSA02-23 | 0.025(0.03) | 0.008(0.04) | >1 | >1 |
| 金葡 MRSA02-26 | 0.025(0.03) | 0.004(0.02) | >1 | >1 |
| 金葡 MRSA02-28 | 0.5(1.5) | 0.016(0.08) | >1 | >1 |
| 金葡 02-19-5 | 0.03(0.1) | <0.002(0.001) | >1 | >1 |
| 表葡 MssE25 | 0.016(0.05) | 0.004(0.02) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-29 | 0.063(0.2) | 0.5(2.5) | 0.03 | 0.5 |
| 表葡 MRSE 02-5 | <0.001(0.003) | <0.001(0.003) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-6 | <0.001(0.005) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-20-2 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | >1 | 1 |
| 表葡 MRSE 02-20-3 | <0.001(0.003) | 0.004(0.02) | >1 | 1 |
| 表葡 MRSE 02-20-4 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | >1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-20-5 | 0.004(0.012) | <0.001(0.005) | >1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-20-6 | 0.004(0.012) | <0.001(0.005) | >1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-20-7 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | 1 | 1 |
| 表葡 MRSE 02-20-8 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-20-9 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-20-1 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-3 | 1(3) | 0.015(0.08) | >1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-4 | 0.004(0.012) | 0.008(0.04) | 0.5 | >1 |

续表 2

| 细菌 | MIC | | | |
|---------------|---------------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| | HLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLA mg/ml | ROX mg/ml |
| 表葡 MRSE 02-10 | 0.004(0.012) | 0.25(1.25) | 1 | 1 |
| 表葡 MRSE 02-12 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | 0.008 | 0.125 |
| 表葡 MRSE 02-11 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-15 | 0.008(0.024) | 0.002(0.01) | 1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-17 | 0.004(0.012) | <0.001(0.005) | 0.25 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-18 | <0.001(0.003) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-20 | 0.008(0.024) | <0.001(0.005) | >1 | >1 |
| 表葡 MRSE 02-21 | 0.016(0.05) | 0.25(1.25) | <0.001 | <0.001 |
| 表葡 MRSE 02-22 | 0.004(0.012) | <0.001(0.005) | <0.001 | <0.001 |
| 丙酸杆菌 02-7-4 | 0.008(0.02) | 4(20) | 0.002 | 0.002 |
| 丙酸杆菌 02-7-5 | 0.008(0.02) | 0.25(0.63) | <0.001 | <0.001 |
| 丙酸杆菌 02-7-6 | 0.008(0.02) | 0.063(0.31) | 0.008 | 0.25 |
| 丙酸杆菌 02-7-9 | 0.063(0.2) | 0.125(0.63) | 0.008 | 0.016 |
| 丙酸杆菌 02-7-7 | 0.125(0.4) | 0.016(0.08) | 0.032 | 0.25 |
| 丙酸杆菌 03-2-22 | 0.032(0.1) | 0.5(2.5) | 1 | 1 |
| 丙酸杆菌 03-2-30 | 0.063(0.2) | 4(10) | >1 | >1 |
| 丙酸杆菌 03-2-32 | 0.016(0.05) | 0.25(1.25) | 0.008 | 0.5 |
| 丙酸杆菌 03-2-33 | 0.032(0.1) | 2(10) | >1 | >1 |
| 丙酸杆菌 03-2-36 | 0.063(0.2) | 4(20) | 0.25 | 0.5 |
| 丙酸杆菌 03-2-37 | 0.032(0.1) | >4(20) | >1 | 1 |
| 丙酸杆菌 03-2-39 | 0.032(0.1) | 0.5(2.5) | 0.5 | 1 |

续表 3

| 细菌 | MIC | | | |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| | HLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLZ mg/ml(万 μ /ml) | CLA mg/ml | ROX mg/ml |
| 大肠埃希菌 03-2-41 | 0.032(0.1) | 0.5(2.5) | >1 | >1 |
| 大肠埃希菌 03-2-42 | 0.016(0.05) | 0.5(2.5) | 0.063 | >1 |
| 大肠埃希菌 03-2-43 | <0.001(0.003) | >4(20) | 0.016 | 0.25 |
| 大肠埃希菌 03-2-45 | 0.032(0.1) | 2(10) | 0.25 | 0.5 |
| 大肠埃希菌 03-2-51 | 0.032(0.1) | >4(20) | >1 | >1 |
| 大肠埃希菌 03-2-52 | 0.032(0.1) | >4(20) | >1 | 0.25 |
| 大肠埃希菌 03-2-53 | 0.008(0.024) | 4(20) | 0.03 | 0.25 |
| 大肠埃希菌 032-54 | 0.032(0.1) | 1(5) | >1 | 1 |
| 大肠埃希菌 03-2-56 | 0.032(0.1) | >4(20) | 0.016 | 0.25 |
| 大肠埃希菌 03-2-57 | <0.001(0.003) | 2(10) | 0.032 | 0.25 |
| 大肠埃希菌 03-2-58 | <0.001(0.003) | 4(20) | >1 | 0.5 |
| 大肠埃希菌 03-2-59 | 0.032(0.1) | 4(20) | 0.125 | 0.25 |
| 沙雷氏菌 2-31-8 | 0.008(0.02) | 0.5(0.25) | 0.008 | 0.016 |
| 沙雷氏菌 2-31-8 | 0.008(0.02) | 1(5) | 0.008 | 0.016 |
| 沙雷氏菌 2-31-8 | 0.008(0.02) | 0.125(0.63) | 0.016 | 0.016 |
| 肺炎克雷伯菌 02-6-14 | 0.25(0.8) | 1(5) | 0.063 | >1 |
| 肺炎克雷伯菌 02-6-18 | 0.5(1.5) | >4(20) | 0.5 | 1 |

试验结果 (1) 人溶菌酶对临床分离菌株的体外抗菌活性见表 1。
 (2) 克拉霉素、罗红霉素、阿莫西林与人溶菌酶以 1: 1 联合用药的体外抗菌作用结果见续表 2。(3) 人溶菌酶对 379 株临床分离致病菌的 MIC₅₀、MIC₉₀ 见续表 3。

以上试验结果表明：人溶菌酶体外具有一定抗菌作用，体内对伤口感染溃烂的疗效较确切。

二、动物模型试验：

A、人溶菌酶对大鼠的镇痛作用（大鼠甩尾法）

选用 120-150 克 SD 健康大鼠 50 只，雌雄各半，动物自由饮水。试验室温度控制在 22-28℃ 左右，动物喂饲大鼠标准饲料。在 TF—光热测痛仪（光源为 12V，50W）热照射下 10 秒钟内反应的大鼠，随机分为 5 组，每组 10 只，雌雄各半。设空白对照组、人溶菌酶三个剂量组（120、60、30IU/只）、鸡溶菌酶（阳性对照）30IU/，均尾部涂药。涂药前和涂药后 0.5—4 小时测每只大鼠的疼痛反应（甩尾）时间，若痛阈升高到照射 30 秒钟不用尾时即中断照射，以免损伤皮肤与起泡，并以 30 秒计算。试验重复一次。

试验结果见表 17-21，结果表明，涂抹人溶菌酶 30、60、120IU/只三小时内，其痛阈明显升高，具有镇痛作用。

表 17-21 (A) 人溶菌酶外涂对大鼠的镇痛作用（甩尾法）
（第一次试验结果）

| 组别 | 剂量 (IU/只) | 动物数 (只) | 疼痛反应时间 (秒, X±SD) | | | | | |
|----------|--------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 (h) |
| 空白 对照 | — | 10 | 5.2 ±1.69 | 5.7 ±2.16 | 6.4 ±2.46 | 6.4 ±3.34 | 6.8 ±3.91 | 10.3 ±5.33 |
| 鸡溶 菌酶 | 30 | 10 | 5.5 ±1.72 | 11.4** ±4.5 | 14.0** ±6.93 | 14.7** ±7.67 | 15.2** ±7.45 | 12.7** ±6.99 |
| 人溶 菌酶 | 120 | 10 | 5.3 ±1.77 | 13.6** ±6.98 | 15.2** ±7.42 | 13.4** ±6.38 | 15.4** ±6.62 | 14.9 ±6.54 |
| 人溶 菌酶 | 60 | 10 | 5.3 ±1.89 | 9.8* ±4.05 | 12.9** ±6.69 | 12.7* ±6.9 | 13.5* ±6.72 | 12.4 ±6.65 |
| 人溶 菌酶 | 30 | 10 | 5.2 ±1.93 | 8.6* ±2.67 | 12.4* ±7.49 | 10.9 ±7.09 | 11.7 ±6.89 | 10.1 ±7.5 |

注：经统计学处理，与空白对照组比较，*P<0.05，**P<0.01。

表 17-21 (B) 人溶菌酶外涂对大鼠的镇痛作用（甩尾法）

| 组别 | 剂量 (IU/只) | 动物数 (只) | 疼痛反应时间 (秒, X±SD) | | | | | |
|----------|--------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|
| | | | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 (h) |
| 空白 对照 | — | 10 | 5.5 ±1.58 | 5.9 ±1.66 | 6.5 ±1.78 | 6.6 ±4.95 | 6.9 ±6.35 | 9.8 ±6.73 |
| 鸡溶 菌酶 | 30 | 10 | 5.7 ±1.64 | 12.3** ±4.6 | 15.0** ±7.99 | 13.8* ±7.99 | 13.6* ±7.6 | 11.7 ±6.9 |
| 人溶 菌酶 | 120 | 10 | 5.8 ±1.23 | 14.2** ±6.54 | 15.7** ±6.78 | 14.5** ±7.11 | 14.3* ±7.44 | 13.5 ±7.69 |
| 人溶 菌酶 | 60 | 10 | 5.6 ±1.89 | 12.6** ±4.05 | 14.3** ±6.69 | 14.0* ±6.9 | 13.8* ±6.72 | 12.5 ±6.65 |
| 人溶 菌酶 | 30 | 10 | 5.7 ±1.34 | 10.0* ±4.47 | 12.0* ±7.85 | 10.7 ±4.27 | 10.1 ±3.84 | 11.2 ±4.5 |

注：经统计学处理，与空白对照组比较，*P<0.05，**P<0.01。

B、人溶菌酶对巴豆油诱发小鼠耳廓肿胀的影响

选用体重 27-30 克的健康雄性昆明小鼠 50 只，随机分成 5 组，每组 10 只。动物自由饮水。试验室温度控制在 22-28℃ 左右。动物喂饲大鼠标准饲料。第一组为空白对照组；第二、三、四组为人溶菌酶，剂量分别为 120、60、30IU/只；第五组为鸡溶菌酶（阳性对照），30IU/只。首先，各组小鼠全部右耳内侧涂 1% 巴豆油 30 μL 致炎，（巴豆油，浅棕色油状液体，药用级，批号 000309，由江西吉水县华宝天然药用厂生产。临用前用乙醇：水：乙醚 25：5：70 混合溶媒配制成 1% 浓度备用。）半小时后分别用双蒸水 20 μl、人溶菌酶（6000IU/ML）20 μl、人溶菌酶（3000IU/ML）20 μl、人溶菌酶（1500IU/ML）20 μl、鸡溶菌酶（1500IU/ML）20 μl 涂抹各组小鼠右耳内侧。致炎后 4 小时将小鼠脱颈椎致死，沿耳廓基线剪下左右两耳片，用 8mm 打孔

器冲下两耳片；精确称重，左右耳片重量之差为肿胀度。经 T 检验，比较药物组与空白对照组的差异，并求出抑制率。试验重复一次。试验结果见表 17-22。小鼠经外涂人溶菌酶 120、60、30IU/只，使小鼠由巴豆油诱发耳廓肿胀度明显减轻，经 T 检验，药物组与空白对照组比较，有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果表明人溶菌酶具有抗炎作用。

表 17-22 人溶菌酶对巴豆油诱发小鼠耳廓肿胀的影响

| 组别 | 剂量 (IU/只) | 第 1 次试验 | | 第 2 次试验 | |
|------|--------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| | | 肿胀度 (mg, $\bar{X} \pm SD$) | 抑制率 (%) | 肿胀度 (mg, $\bar{X} \pm SD$) | 抑制率 (%) |
| 空白对照 | — | 20.3 ± 3.40 | | 20.1 ± 4.01 | |
| 人溶菌酶 | 120 | 12.5 ± 5.56** | 38.42 | 13.6 ± 3.78** | 32.34 |
| 人溶菌酶 | 60 | 13.5 ± 4.67** | 33.50 | 15.1 ± 2.42** | 24.88 |
| 人溶菌酶 | 30 | 14.2 ± 3.77** | 30.05 | 15.4 ± 4.22* | 23.38 |
| 鸡溶菌酶 | 30 | 14.6 ± 2.12** | 28.08 | 15.1 ± 2.51** | 24.88 |

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

C 重组人溶菌酶对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响

(1) 受试药物

重组人溶菌酶：白色粉末，批号 020110，3 万单位/毫克，由大连奇龙生物技术研究所提供。临用时用无菌双蒸水配成所需浓度。

(2) 对照品

鸡溶菌酶：白色粉末，2 万单位/毫克，Lysozyme Sigma L6878。临用时用无菌双蒸水配制。

(3) 试剂

角叉菜胶，浅黄白色粉末，批号 21H0340，Sigam Chemical CO 生产。临用时用无菌生理盐水配成 1% 的浓度。

实验方法：选用体重 130-150 克的健康雄性 SD 大鼠 50 只，由四川抗菌素工业研究所动物中心提供。合格证：川实动管第 99-32 号。每笼 5 只。动物自由饮水，试验室温度控制在 22~28℃ 左右，动物喂

饲大鼠标准饲料。随机分成5组，每组10只。测量各鼠正常左后足跖容积。第1组为空白对照组，外涂等容积无菌双蒸水；第2、3、4组为人溶菌酶，剂量分别为120、60、30IU/只；第5组为鸡溶菌酶，剂量为30IU/只。每鼠外涂各组药物（20 μ l/只）一次后1小时，给大鼠左后足跖皮下注射1%的角叉菜胶0.1ml。致炎后半小时再涂一次药。致炎前和致炎后1、2、4、6小时按微量吸管测量法测定致炎前后大鼠左后足容积。致炎前后足容积差为肿胀度。试验重复一次。

数据处理和统计分析：对计量资料，把原始数据按组分别输入Microsoft Excel中，各组结果以算术平均数 \pm 标准差表示。根据《〈新药西药临床前研究指导原则汇编〉》中的有关新药药效研究中统计处理的指导原则，选择Student t检验进行各用药组均数与模型对照组均数、相同剂量的受试药组与对照品组的差异显著性检验。

试验结果见表4，大鼠外涂人溶菌酶30、60、120IU/只，在致炎后1-4小时内，使由1%角叉菜胶诱发的左后足跖肿胀度明显减轻。说明人溶菌酶具有抗炎作用，重组人溶菌酶不但有杀菌作用，而且有很好的抗炎作用。

表4（1）人溶菌酶对大鼠由角叉菜胶所致足跖肿胀的影响
（第一次试验结果）

| 组别 | 剂量 (IU/只) | 左后足跖 正常体积 | 致炎后不同时间足跖肿胀度 ($X \pm SD$, ml) | | | |
|----------|--------------|--------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| | | | 1hr | 2hr | 4hr | 6hr |
| 空白 对照 | — | 0.86 ± 0.06 | 0.35 ± 0.06 | 0.49 ± 0.05 | 0.42 ± 0.08 | 0.29 ± 0.13 |
| 人溶 菌酶 | 120 | 0.84 ± 0.07 | 0.24** ± 0.06 | 0.35** ± 0.05 | 0.34* ± 0.06 | 0.22 ± 0.07 |
| 人溶 菌酶 | 60 | 0.87 ± 0.09 | 0.30* ± 0.04 | 0.41** ± 0.05 | 0.35* ± 0.06 | 0.24 ± 0.08 |
| 人溶 菌酶 | 30 | 0.87 ± 0.08 | 0.29* ± 0.05 | 0.41* ± 0.08 | 0.34* ± 0.07 | 0.26 ± 0.08 |
| 鸡溶 菌酶 | 30 | 0.86 ± 0.08 | 0.29* ± 0.06 | 0.40** ± 0.05 | 0.34* ± 0.07 | 0.25 ± 0.10 |

注：经统计学处理，与空白对照组比较，*P<0.05，**P<0.01。

表 4（2）人溶菌酶对大鼠由角叉菜胶所致足跖肿胀的影响
（第二次试验结果）

| 组别 | 剂量 (IU/只) | 左后足跖 正常体积 | 致炎后不同时间足跖肿胀度 (X±SD, ml) | | | |
|----------|--------------|---------------|-------------------------|----------------|----------------|---------------|
| | | | 1hr | 2hr | 4hr | 6hr |
| 空白 对照 | — | 0.92 ±0.10 | 0.30 ±0.08 | 0.40 ±0.10 | 0.35 ±0.05 | 0.29 ±0.15 |
| 人溶 菌酶 | 120 | 0.90 ±0.10 | 0.22* ±0.06 | 0.31* ±0.08 | 0.30* ±0.05 | 0.25 ±0.07 |
| 人溶 菌酶 | 60 | 0.92 ±0.11 | 0.23* ±0.04 | 0.31* ±0.06 | 0.29* ±0.05 | 0.24 ±0.07 |
| 人溶 菌酶 | 30 | 0.92 ±0.09 | 0.25 ±0.07 | 0.32* ±0.06 | 0.29* ±0.05 | 0.25 ±0.07 |
| 鸡溶 菌酶 | 30 | 0.89 ±0.10 | 0.22* ±0.05 | 0.32* ±0.07 | 0.30* ±0.04 | 0.26 ±0.12 |

注：经统计学处理，与空白对照组比较，*P<0.05。

D 重组人溶菌酶（HLZ）加杀螨止痒剂 SM-650 体外杀螨作用评价

1、基因重组人溶菌酶浓缩液活性单位：300 单位/mL 试验

药品及试剂

1、基因重组人溶菌酶浓缩液（Human Lysozyme HLZ）活性单位：300 单位/mL，由大连奇龙生物技术研究所提供，

2、杀螨止痒剂 SM-650：白色粉末，纯度为≥99%，ph：6~8，生产单位：北京耐特生化技术研究所

试验螨虫

所用螨虫标本为第四军医大学临床门诊痤疮病人。

试验方法：

体外杀螨虫活性测定：采用图片法测定了人溶菌酶（HLZ）加杀螨止痒剂 SM-650 最低杀螨浓度（MIC）。将螨虫标本分离到玻片上，用人溶菌酶（HLZ）300 单位/mL，杀螨止痒剂 SM-650 1%/M1。滴到玻

片螨虫标本上，观察结果，以最低杀螨浓度（MIC）。

试验结果见表 5，结果表明人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 体外杀螨有杀灭作用。

表 5

| 螨虫标本 | 对照组 | 杀螨止痒剂 SM-650 | 人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 |
|------------|-----|--------------|-------------------|
| 1 号 12 个螨虫 | 0 | 51% | 62% |
| 2 号 18 个螨虫 | 0 | 48% | 59% |
| 3 号 16 个螨虫 | 0 | 49% | 61% |
| 4 号 11 个螨虫 | 0 | 50% | 65% |
| 5 号 19 个螨虫 | 0 | 53% | 66% |

2、基因重组人溶菌酶浓缩液活性单位：3000 单位/mL 试验

药品及试剂

1、基因重组人溶菌酶浓缩液（Human Lysozyme HLZ）活性单位：3000 单位/mL，由大连奇龙生物技术研究所提供，

2、杀螨止痒剂 SM-650：白色粉末，纯度为 $\geq 99\%$ ，ph：6~8，生产单位：北京耐特生化技术研究所

试验螨虫

所用螨虫标本为第四军医大学临床门诊痤疮病人。

试验方法：

体外杀螨虫活性测定：采用图片法测定了人溶菌酶（HLZ）加杀螨止痒剂 SM-650 最低杀螨浓度（MIC）。将螨虫标本分离到玻片上，用人溶菌酶（HLZ）3000 单位/mL，杀螨止痒剂 SM-650 1%/M1。滴到玻片螨虫标本上，观察结果，以半数杀螨浓度（MBC）。

试验结果见表 6，结果表明人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 体外杀螨有杀灭作用。

表 6

| 螨虫标本 | 对照组 | 杀螨止痒剂 SM-650 | 人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 |
|----------|-----|--------------|-------------------|
| 1号 12个螨虫 | 0 | 730% | 85% |
| 2号 18个螨虫 | 0 | 82% | 91% |
| 3号 16个螨虫 | 0 | 80% | 94% |
| 4号 11个螨虫 | 0 | 76% | 88% |
| 5号 19个螨虫 | 0 | 79% | 90% |

3、基因重组人溶菌酶浓缩液活性单位：30000 单位/mL 试验

药品及试剂

1、基因重组人溶菌酶浓缩液 (Human Lysozyme HLZ) 活性单位：30000 单位/mL，由大连奇龙生物技术研究所提供，

2、杀螨止痒剂 SM-650：白色粉末，纯度为 $\geq 99\%$ ，ph：6~8，生产单位：北京耐特生化技术研究所

试验螨虫

所用螨虫标本为第四军医大学临床门诊痤疮病人。

试验方法：

体外杀螨虫活性测定：采用图片法测定了人溶菌酶 (HLZ) 加杀螨止痒剂 SM-650 最低杀螨浓度 (MIC)。将螨虫标本分离到玻片上，用人溶菌酶 (HLZ) 30000 单位/mL，杀螨止痒剂 SM-650 1%/Ml。滴到玻片螨虫标本上，观察结果，以无活螨虫为杀螨浓度。

试验结果见表 7，结果表明人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 体外杀螨有杀灭作用。

表 7

| 螨虫标本 | 对照组 | 杀螨止痒剂 SM-650 | 人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 |
|----------|-----|--------------|-------------------|
| 1号 12个螨虫 | 0 | 100% | 100% |
| 2号 18个螨虫 | 0 | 100% | 100% |
| 3号 16个螨虫 | 0 | 100% | 100% |
| 4号 11个螨虫 | 0 | 100% | 100% |
| 5号 19个螨虫 | 0 | 100% | 100% |

采用图片法测定了人溶菌酶 (HLZ) 加杀螨止痒剂 SM-650 对临床

分离五人份的螨虫标本体外杀螨作用,结果表明:人溶菌酶加杀螨止痒剂 SM-650 对螨虫有杀灭作用。杀螨止痒剂 SM-650 最低杀螨浓度 MICRange 为 0.2%-2%。

E 重组人溶菌酶抑制豚鼠牛血清白蛋白过敏反应试验模型

选用体重 250 克左右的健康豚鼠 20 只,雄性,随机均分四组,每组 5 只,进行静脉注射牛血清白蛋白造模。将造模后的 20 只小鼠重新合并后再随机分成四组,分别设立三个给药组和一模型组。重组人溶菌酶临床气雾剂治疗时药液的浓度为 15000u/ml,初步拟定剂量为 15000 u/次,每日 3~5 次,即 0.5mg/次/日。(按体表面积推算至豚鼠剂量为 1.3×10^{-3} mg/只(250g 体重计),由于人通气量 9000ml/分相当于豚鼠通气量 31ml/分的 290 倍,人用单次剂量 0.5mg/70kg 相当于小鼠剂量 1.3×10^{-3} mg/250g 的 280 倍,以上二者较为接近)。所以设定用临床人用浓度 0.5mg/ml 对小鼠进行雾化治疗,另考虑到临床人用气雾吸入重组人溶菌酶气体利用率较高,而小鼠在雾化缸内只能靠自身呼吸吸入含药气体,故只有延长吸入时间才能确保吸入药量,设定为一小时。在 15000u/ml 为低剂量浓度基础上再配制 30000u/ml、60000u/ml 二浓度作为中、高剂量组治疗时的药液浓度。在第二十一天给每只豚鼠静脉注射牛血清白蛋白前一个小时,将豚鼠置于玻璃干燥器后,用 PAR1. BOY 压缩喷雾器雾化不同浓度的重组人溶菌酶液对豚鼠进行雾化预防。然后给每只豚鼠静脉注射牛血清白蛋白 1mg,肉眼观察豚鼠形态变化情况和死亡数量及时间。

实验结果豚鼠静脉注射牛血清白蛋白后 10 秒钟模型组出现咳嗽、气促和挠唇现象。30 秒钟后模型组豚鼠全部死亡。给药重组人溶菌酶组 30 小时豚鼠仍然全部存活。给药重组人溶菌酶组和一模型组有明显区别。见表 8、见表 9。

表 8

| 组别 | 动物数 (只) | 用药后 10 秒 | 用药后 30 秒 | 用药后 60 秒 |
|--------|------------|----------|----------|----------|
| 模型对照组 | 5 只 | 4 只 | 0 只 | 0 只 |
| 模型高剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |
| 模型中剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |
| 模型低剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |

表 9

| 组别 | 动物数 (只) | 用药后 10 小时 | 用药后 20 小时 | 用药后 30 小时 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 模型对照组 | 0 只 | 0 只 | 0 只 | 0 只 |
| 模型高剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |
| 模型中剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |
| 模型低剂量组 | 5 只 | 5 只 | 5 只 | 5 只 |

综合以上实验结果表明,对豚鼠静脉注射牛血清白蛋白进行过敏反应试验重组人溶菌酶雾化保护,有很好的保护预防效果。其保护预防效果与使用剂量无明显量效关系。

F、重组人溶菌酶抗疱疹病毒抑制豚鼠角膜炎试验模型

选用体重 250 克左右健康豚鼠 20 只,雄性,将 20 只豚鼠随机均分四组,每组 5 只,进行滴眼液造模。首先用细针在豚鼠的眼角膜上轻微划出三道痕迹,然后用四川抗菌素工业研究所实验动物中心提供 I 型疱疹病毒 100~1000TCID₅₀ 感染豚鼠的眼角膜,每天三次。第三天豚鼠眼角膜出现轻微角膜炎,第四天豚鼠眼角膜出现红肿,角膜炎加重。将造模后的 20 只豚鼠重新合并后再随机分成四组,分别设立三个给药组和一模型组。

重组人溶菌酶滴眼液以 15000u/ml (每滴 1500U) 为低剂量浓度基础上再配制 30000u/ml (每滴 3000U)、60000u/ml (每滴 6000U)

二浓度作为中、高剂量组治疗时的药液浓度。在第五天开始给豚鼠眼角膜用重组人溶菌酶滴眼液，每天三次，每次每只眼一滴，肉眼观察豚鼠形态变化情况及时间。

实验结果给药重组人溶菌酶滴眼液第二天，给药重组人溶菌酶滴眼液中、高剂量组治疗效果凸现，豚鼠角膜红肿减轻。给药重组人溶菌酶滴眼液第三天，给药重组人溶菌酶滴眼液低剂量组也出现好转治疗效果。给药重组人溶菌酶滴眼液第六天，给药模型低、中、高组豚鼠角膜炎和红肿全部消退好转。模型对照组豚鼠角膜红肿，角膜炎加重并出现溃疡。给药重组人溶菌酶组和一模型组有明显区别。见表10、见表11。

表10

| 组别 | 动物数 (只) | 用药第一天 | 用药第二天 | 用药第三天 |
|--------|------------|---------|---------|---------|
| 模型组对照 | 5只 | 角膜红肿角膜炎 | 角膜红肿角膜炎 | 角膜红肿角膜炎 |
| 模型高剂量组 | 5只 | 角膜红肿角膜炎 | 红肿减轻 | 红肿减轻 |
| 模型中剂量组 | 5只 | 角膜红肿角膜炎 | 红肿减轻 | 红肿减轻 |
| 模型低剂量组 | 5只 | 角膜红肿角膜炎 | 角膜红肿角膜炎 | 红肿减轻 |

表11

| 组别 | 动物数 (只) | 用药第四天 | 用药第五天 | 用药第六天 |
|--------|------------|---------|------------------|------------------|
| 模型组对照 | 5只 | 角膜红肿角膜炎 | 角膜红肿、角膜炎 角膜溃疡 | 角膜红肿、角膜炎 角膜溃疡 |
| 模型高剂量组 | 5只 | 角膜炎减轻 | 角膜红肿角膜炎 消退 | 恢复正常 |
| 模型中剂量组 | 5只 | 角膜炎减轻 | 角膜红肿角膜炎 消退 | 恢复正常 |
| 模型低剂量组 | 5只 | 角膜炎减轻 | 角膜红肿角膜炎 消退 | 恢复正常 |

综合以上实验结果表明，试验重组人溶菌酶对抗I型疱疹病毒100~1000TCID₅₀感染豚鼠，有很好的治疗效果。其治疗效果与使用

剂量有明显量效关系。

用法与用量：

直接作用于病灶局部给药 1500u~30000u/g 外用，每日 2~3 次，每次按病灶部位大小给药。

具体实施方式：

下面结合实施例对本发明做进一步的描述，但不限于实施例。

实施例 1：

基因重组人溶菌酶的制备：基因重组人溶菌酶经高压灭菌后接种甘油管种子，摇床转数为每分钟 250 转，培养温度为 20℃，在恒温床上培养 36 小时。进行种子罐培养后进行生产罐培养。将发酵表达完成的培养液进行提取纯化，对提取纯化的蛋白浓缩液冰冻干燥，测定蛋白量、纯度和溶菌酶活性保存备用。

人溶菌酶凝胶剂的制备：将纯度 95%的基因重组人溶菌酶制得 3 万 U/mL/g，聚乙二醇 400 在 100，硬脂醇 12，甘油 10，吡咯烷铜酸钠 15，尼泊金甲酯 0.16，蒸馏水 26 在常温下混合均质，在符合 GMP 要求的制药工厂，按制药规程完成，制成凝胶剂。

实施例 2：

根据实施例 1 相同的制法制备重组人溶菌酶，然后将纯度 95%的基因重组人溶菌酶制得 30 万 U/mL/g，羧甲基纤维素钠 5，甘油 15，吡咯烷铜酸钠 22，尼泊金甲酯 0.35~1.5，蒸馏水 118 在常温下混合均质，在符合 GMP 要求的制药工厂，按制药规程完成，制成凝胶剂。

实施例 3：

根据实施例 1 相同的制法制备重组人溶菌酶，然后将纯度 95%的基因重组人溶菌酶制得 100U 万 U/mL，聚乙二醇 400 在 300，硬脂醇 23，甘油 30，吡咯烷铜酸钠 33，尼泊金甲酯 1.0，蒸馏水 258，杀螨止痒剂 SM-650 纯度为 $\geq 99\%$ ph: 6~8（商品）1，在常温下混合均质，制成凝胶剂。

实施例 4

根据实施例 1 相同的制法制备重组人溶菌酶，然后将纯度 95% 的基因重组人溶菌酶制得 260 万 U/mL/g，羧甲基纤维素钠 8，甘油 8，吡咯烷铜酸钠 30，尼泊金甲酯 0.85，蒸馏水 800 在常温下混合均质，在符合 GMP 要求的制药工厂，按制药规程完成，制成凝胶剂。