



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105307664 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201480019582. 6

(22) 申请日 2014. 03. 06

(30) 优先权数据

PCT/CA2013/050324 2013. 04. 26 CA

61/773, 912 2013. 03. 07 US

61/834, 654 2013. 06. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/050180 2014. 03. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/134731 EN 2014. 09. 12

(71) 申请人 凯恩生物科技有限公司

地址 加拿大马尼托巴

(72) 发明人 P·V·戈万德 K·勒夫特里

N·亚堪达瓦拉 C·弗洛里奇

S·玛德亚萨

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖 陶家蓉

(51) Int. Cl.

A61K 33/30(2006. 01)

A23B 4/20(2006. 01)

A61K 31/194(2006. 01)

A61K 31/198(2006. 01)

A61P 17/02(2006. 01)

A61P 31/02(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 31/10(2006. 01)

权利要求书4页 说明书15页 附图11页

(54) 发明名称

抗微生物-抗生物膜组合物及其使用方法

(57) 摘要

公开了用于预防和治疗涉及细菌生物膜的食源性疾病和伤口感染的包含螯合剂、金属离子盐、胶凝剂或缓冲剂、抗微生物剂、抗生物膜剂和 pH 调节剂或缓冲剂的组合物。该组合物的抗感染性质包括减少或杀灭在多种微生物的生物膜中出现的厌氧/好氧/兼性革兰氏阴性和革兰氏阳性伤口感染相关细菌。该组合物可以是乳液、乳膏、油膏、敷料、绷带、洗液、浸泡剂、凝胶、喷剂或其他合适的形式,包括特定装置。另外,本发明提供了一种使用纳米颗粒或其他高效递送系统递送单独含有一种或两种螯合剂或含有螯合剂与金属离子盐的配制组合物的高效方法。

1. 一种用于抑制与伤口感染相关的细菌的生长或生物膜形成的组合物,所述组合物选自下组:

(a) 选自下组的一种或多种螯合剂:EGTA、DTPA、EDDHA、IDA、CDTA、HEDTA、HEIDA、NTA、EDTA 二钠或四钠盐、柠檬酸钠、柠檬酸钾、卵传铁蛋白、乳铁蛋白和血清铁传递蛋白;和任选的

(b) 选自下组的锌盐:氯化锌、葡萄糖酸锌、乳酸锌、柠檬酸锌、硫酸锌和乙酸锌。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述螯合剂是 EDTA 二钠和柠檬酸钠中的一种或多种。

3. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述锌盐是氯化锌。

4. 如权利要求 2 所述的组合物,其特征在于,所述组合物选自下组:

a. EDTA 二钠和柠檬酸钠,

b. EDTA 二钠和氯化锌,

c. 柠檬酸钠和氯化锌,和

d. 柠檬酸钠、EDTA 二钠和氯化锌。

5. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 2500mg/L 至约 10000mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 5000mg/L 至约 10000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 500mg/L 至约 5000mg/L。

6. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 10000mg/L 至 25000mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 50000mg/L 至 100000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 1000mg/L 至 5000mg/L。

7. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 5000mg/L 至 10000mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 25000mg/L 至 50000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 500mg/L 至 1000mg/L。

8. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 1000mg/L 至 5000mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 10000mg/L 至 25000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 100mg/L 至 500mg/L。

9. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 500mg/L 至 1000mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 5000mg/L 至 10000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 10mg/L 至 100mg/L。

10. 如权利要求 1-4 所述的组合物,其特征在于,EDTA 二钠为约 100mg/L 至 500mg/L 所述组合物,柠檬酸钠为约 1000mg/L 至 5000mg/L 所述组合物,并且氯化锌为约 10mg/L 至 100mg/L。

11. 如权利要求 1-10 所述的组合物,其特征在于,所述组合物用于针对与以下状况中的一种或多种相关的细菌和细菌生物膜:伤口感染、囊性纤维化感染、乳腺炎、耳炎、和与食源性疾病和医院相关的感染。

12. 如权利要求 1-11 所述的组合物,其特征在于,所述组合物用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、凝固酶阴性葡萄球菌 (*Coagulase negative staphylococci*) (CoNS)、万古霉素耐药性

肠球菌 (Vancomycin resistant Enterococci) (VRE)、碳青霉烯耐药性肺炎克雷伯氏菌 (Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌 (*Malassezia pachydermatis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、大肠杆菌 0157 : H7 (*Escherichia coli* 0157 : H7)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、克雷伯氏菌 (*Klebsiella* spp.)、肠杆菌 (*Enterobacter* spp.) 和柠檬酸杆菌 (*Citrobacter* spp.)。

13. 如权利要求 1-11 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含 EDTA 二钠和柠檬酸钠,并用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、凝固酶阴性葡萄球菌 (Coagulase negative staphylococci) (CoNS)、万古霉素耐药性肠球菌 (Vancomycin resistant Enterococci) (VRE)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌 (*Malassezia pachydermatis*)、大肠杆菌 0157 : H7 (*Escherichia coli* 0157 : H7)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

14. 如权利要求 1-11 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含 EDTA 二钠和氯化锌,并用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌 (*Malassezia pachydermatis*) 和大肠杆菌 0157 : H7 (*Escherichia coli* 0157 : H7)。

15. 如权利要求 1-11 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含柠檬酸钠和氯化锌,并用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌 (*Malassezia pachydermatis*) 和大肠杆菌 0157 : H7 (*Escherichia coli* 0157 : H7)。

16. 如权利要求 1-11 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含柠檬酸钠、EDTA 二钠和氯化锌,并用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌 (*Malassezia pachydermatis*)、

大肠杆菌 0157 : H7 (*Escherichia coli* 0157 : H7) 和单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)。

17. 如权利要求 1-16 所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含选自下组的一种或多种成分:水、缓冲剂、稳定剂、胶凝剂、表面活性剂、草药、维生素、矿物质、胞外基质、抗微生物剂、抗生素和 pH 调节剂。

18. 如权利要求 1-17 所述的组合物,其特征在于,所述组合物制备成以下的一种或多种形式:消毒溶液、浸溶液、乳液、乳膏、油膏、凝胶、喷剂、敷料、纱布、绷带、热可逆凝胶喷剂、缠绕物、粘合剂、带、浸泡剂和香油。

19. 如权利要求 1-18 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含脂质体或纳米颗粒或合适的装置递送系统。

20. 如权利要求 1-19 所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含选自下组的抗感染化合物:DispersinB、藻酸盐裂解酶、乳链菌肽、乳铁蛋白、血清铁传递蛋白、卵转铁蛋白、卵清蛋白、卵类粘蛋白、硫酸鱼精蛋白、氯己定、十六烷基氯化吡啶鎓、三氯生、磺胺嘧啶银、苯扎氯铵、过氧化氢、柠檬酸、柠檬酸钾、5-氟尿嘧啶、顺式-2-壬烯二酸、DNA 酶 I、蛋白酶 K、银、镓、银、细菌素和抗微生物肽。

21. 一种预防或治疗伤口感染的方法,所述方法包括局部或非局部使用权利要求 1-20 所述的组合物。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述伤口感染选自以下感染中的一种或多种:割伤、瘀青、手术部位、撕裂、磨擦、刺穿、切口、枪击、灼烧、脓皮病、中耳炎、外耳炎/内耳炎、奶牛乳房(乳腺炎)、特应性皮炎、湿疹、压迫性溃疡、静脉和动脉腿部溃疡、糖尿病足溃疡的感染。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括多次施用所述组合物。

24. 如权利要求 21-23 所述的方法,其特征在于,所述方法用于治疗以下的一种或多种:人、家畜、农场动物、动物园动物、体育动物,和宠物动物,如狗、马、猫、牛、猪、山羊和绵羊。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述方法用于治疗人、狗、猫或马。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述方法用于治疗人。

27. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述方法用于治疗狗、猫和马。

28. 如权利要求 1-20 所述的组合物用于预防或治疗以下感染中的一种或多种的用途:割伤、瘀青、手术部位、撕裂、磨擦、刺穿、切口、枪击、灼烧、脓皮病、耳炎、奶牛乳房(乳腺炎)、特应性皮炎、湿疹、压迫性溃疡、静脉和动脉腿部溃疡、糖尿病足溃疡和囊性纤维化(CF)。

29. 如权利要求 1-20 所述的组合物的用途,所述用途包括预防或治疗与食源性疾病相关的细菌感染或者医院或社区获得性细菌感染。

30. 如权利要求 28-29 所述的用途,所述用途还包括在以下一种或多种中的用途:医院、医用设备、机构或工厂、牲口棚、食品和肉类加工企业、水果和蔬菜。

31. 如权利要求 28-29 所述的用途,其特征在于,所述用途用于治疗以下的一种或多种:人、家畜和农场动物,以及动物园动物、体育动物或宠物动物,如狗、马、猫、牛、猪、山羊

和绵羊。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述用途用于人。

33. 如权利要求 32 所述的用体,其特征在于,所述用途用于以下的一种或多种:狗、猫、马和牛。

34. 如权利要求 30 所述的方法,其特征在于,所述方法包括肉类加工和包装企业中的冲洗水管线或肉类加工线以及清洁设备。

35. 一种预防或处理肉类腐败的方法,所述方法包括在肉类或肉类产品上局部或非局部使用权利要求 1-20 所述的组合物。

36. 一种对肉类进行消毒的方法,所述方法包括在肉类或肉类产品上局部使用权利要求 1-20 所述的组合物。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的方法,其特征在于,所述肉类或肉类产品包括以下的一种或多种:牛肉、猪肉、羔羊肉、山羊肉、马肉、鸡肉和鱼肉。

38. 如权利要求 35 或 36 所述的方法,其特征在于,所述肉类或肉类产品包括以下的一种或多种:由猪、牛、绵羊、山羊和马的肠或肠部制成的香肠肠衣,以及用于制成人造香肠肠衣的胶原或纤维素。

39. 如权利要求 35-38 所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下的一种或多种:涂覆、喷涂、喷雾、注射、浸泡、冲洗、浸渍和漂洗。

抗微生物 - 抗生物膜组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 7 日提交的题为“抗微生物组合物及其用于治疗 and 预防伤口感染的用途”的美国临时专利申请号 61/773, 912 ;2013 年 4 月 26 日提交的题为“抗微生物 - 抗生物膜组合物及其使用方法”的国际专利申请号 PCT/CA2013/050324 ;和 2013 年 6 月 13 日提交的题为“抗微生物 - 抗生物膜组合物及其使用方法”的美国临时专利申请号 61/834, 654 的权益和优先权。上述专利申请的内容通过引用明确纳入本文的详细说明中。

发明领域

[0003] 本发明可涉及使用抗微生物和抗生物膜组合物来预防和/或治疗伤口感染的方法。还可涉及配制用于伤口护理、消毒剂、美容剂和医用设备 / 装置的应用的包含螯合剂、锌盐、抗微生物剂和药学上可接受的赋形剂的组合物的方法。更具体地,本发明可涉及递送含有两种或更多种螯合剂和锌盐的药学上可接受的制剂的高效方法。

[0004] 发明背景

[0005] 从微生物的视角来看,正常、完整的人和动物皮肤的主要功能是控制在皮肤表面上存活的微生物群并防止下方组织被潜在的病原体集落定殖和入侵。皮下组织的暴露(即,伤口)提供了潮湿、温暖并有营养的环境,其有助于微生物定殖和增殖。

[0006] 由于大多数情况下,伤口定殖存在多种微生物,涉及具有潜在致病性的多种微生物,任何伤口都具有受到感染的一定风险。在感染事件中,伤口无法愈合,患者遭受增加的创伤以及增加的治疗成本。一般的伤口处理实践越来越需要资源。超过 2% 的美国人患有这类慢性非愈合性伤口,并且美国健康护理系统每年因此花费 200 亿美元。伤口对于人类和动物都是巨大的世界性问题。

[0007] 因此,不仅出于对患者而言增加的创伤,也从其对财政资源的负担和健康护理系统内低成本管理要求增加的角度来看,健康护理人员中关于伤口感染的担心是合情合理的。大多数伤口感染是由以下细菌导致的:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (20%)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) (14%)、肠球菌 (*Enterococci spp.*) (12%)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (8%)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (8%)、肠杆菌 (*Enterobacter spp.*) (7%)、变形杆菌 (*Proteus spp.*) (3%)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) (3%)、链球菌 (*Streptococci*) (3%) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) (3%)。

[0008] 伤口通常具有多个愈合障碍。伤口愈合和感染受到细菌在伤口环境内产生稳定兴旺的群落的能力和宿主控制细菌群落的能力之间的关系的影响。由于细菌能够在它们粘附于表面之后迅速形成它们自己的保护性微环境(生物膜),宿主控制这些生物体的能力可能随着生物膜群落的成熟而降低。在稳定的生物膜群落内,好氧菌和厌氧菌之间的相互作用可能增加它们的净致病作用,增强它们导致感染并延迟愈合的潜力。在过去的几年中,一些人已经将生物膜与慢性伤口联系起来。对慢性伤口的显微镜评价显示在至少 60% 的慢性伤口中,具有在集群细菌周围粘附的胞外聚物质的组织良好的生物膜。

[0009] 近年来,人们付出了很多努力使用抗生素和抗微生物剂来治疗人和动物中非愈合性临床感染的伤口。这些抗微生物剂是不同的化学组合物并且可包括肽、消毒剂(美国专利号 6,700,032)、抗生素、银离子/化合物(美国专利申请公开号 2005/0035327)、壳聚糖(美国专利申请公开号 2006/0210613;美国专利号 6,998,509)、呋喃西林、铋硫醇和木糖醇(WO 2005/058381)。

[0010] 其他人已经进行了多次尝试来产生包含抗微生物剂的伤口护理器具如敷料或绷带,凝胶和软膏。例如,美国专利号 3,930,000 公开了使用尿囊酸银锌(silver zinc allantoinate)来杀灭。从微生物的视角来看,正常、完整的人和动物皮肤的主要功能是控制在皮肤表面上存活的微生物群并防止下方组织被潜在的病原体集落生长和入侵。皮下组织的暴露(即,伤口)提供了潮湿、温暖并有营养的环境,其有助于微生物定殖和增殖。

[0011] 历史上,已经假设导致慢性感染的细菌的性质与在液体生长基质中悬浮生长的细菌的性质相似。然而,过去 20 年间的研究显示,许多慢性感染是生物膜模式的微生物生长的结果。与其浮游对应物相比,生物膜中的细菌对抗生素/抗微生物剂有 100 至 1000 倍的抗性。最近的研究已经证明,生物膜是慢性伤口无法愈合的潜在原因(Singh 和 Barbul, Wound Rep Reg. 16 :1,2008)。另外,James 等(Wound Rep Reg. 16 :37-44,2008)最近已经证明,在超过 60% 的与慢性伤口(如糖尿病足溃疡、静脉腿部溃疡和压迫性溃疡)关联的细菌感染中存在生物膜。

[0012] 慢性伤口感染通常是缓慢发展的持续性感染,似乎很少被免疫防御解决,并且对抗微生物疗法的响应短暂。因此,存在对开发同时具有抗生物膜和抗微生物活性的用于预防和治疗涉及生物膜的急性以及慢性伤口的伤口护理产品的尚未实现的临床需求。同时具有抗生物膜和抗微生物活性的组合物通过抑制生物膜形成和/或通过破坏预先形成的生物膜来杀死对抗生素/抗微生物剂和身体免疫系统具有高度抗性的生物膜细菌。此外,也存在对包含通常认为是安全的(GRAS)物质的非抗生素伤口护理或消毒剂组合物的需求。

[0013] 在屠宰场或肉类加工企业中,存在肉类和设备(例如,绞肉机、切割机、切块机、搅拌机、填料器等)受到食物毒性微生物的污染的问题。在常规的肉类加工企业中,次氯酸钠用作肉类灭菌加工期间的抗微生物剂。肉类(如尸体)通常被浸入次氯酸钠溶液中持续一段时间。然而,存在粘附于肉上的次氯酸钠的反应产物对人体的安全性问题。

[0014] 因此,需要对人有高度安全性并具有长效抗微生物能力的用于肉类灭菌的抗微生物剂。这类抗微生物剂将使肉类更新鲜并保存更久,并且降低或防止产品的降解。

发明内容

[0015] 本发明可提供用于预防、净化或治疗急性和慢性伤口感染,或用于水果、蔬菜、肉类产品、肉类和食品加工企业的消毒的组合物和方法。

[0016] 本发明的一个实施方式可提供包含(a)一种或多种螯合剂,和(b)一种或两种金属离子盐的组合物。

[0017] 在另一个实施方式中,本发明的组合物包含:(a)少量的至少 2 种螯合剂,(b)少量的至少 1 种金属离子盐,其中各组分(a)和(b)的量对于形成针对伤口感染的有效抗感染组合物和作为消毒剂应用而言是足够的。

[0018] 在另一个实施方式中,本发明的组合物包含:(a)少量的至少 2 种螯合剂,(b)少量

的至少一种金属离子盐,和(c)药学上可接受的赋形剂。

[0019] 本发明的另一个实施方式提供了包含 2 种螯合剂和一种或两种金属离子盐的抗感染组合物,其有效针对细菌和真菌引起的伤口感染(割伤、瘀青、手术部位、撕裂、磨擦、刺穿、切口、枪击、灼烧、脓皮病、特应性皮炎、湿疹、压迫性溃疡、静脉和动脉腿部溃疡、糖尿病足溃疡等的感染)、囊性纤维化(CF)-相关的感染、社区或医院获得性感染或者食源性疾病。

[0020] 本发明的组合物可用于针对一种或多种选自下组的感染相关细菌或酵母:甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、凝固酶阴性葡萄球菌(Coagulase negative staphylococci) (CoNS)、万古霉素耐药性肠球菌(Vancomycin resistant Enterococci) (VRE)、碳青霉烯耐药性肺炎克雷伯氏菌(Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*) (MRSP)、皮屑芽孢菌(*Malassezia pachydermatis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、大肠杆菌 0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* spp.)、肠杆菌(*Enterobacter* spp.)和柠檬酸杆菌(*Citrobacter* spp.)。

[0021] 本发明的另一个实施方式可提供包含至少 2 种螯合剂和一种或两种金属离子盐的用于针对兽医伤口感染、或乳腺炎和耳炎相关的细菌和真菌的抗感染组合物。

[0022] 在一个实施方式中,螯合剂为约 5000mg/L 至约 50000/L 组合物。在一个实施方式中,金属离子盐为约 1000mg/L 至约 10000mg/L 组合物。

[0023] 螯合剂可选自下组:EDTA、EGTA、DTPA、EDDHA、IDA、CDTA、HEDTA、HEIDA、NTA、柠檬酸钠、柠檬酸钾、卵转铁蛋白(ovotransferrin)和乳铁蛋白。金属离子盐可选自下组:氯化锌、乳酸锌、柠檬酸锌、葡萄糖酸锌、硫酸锌、乙酸锌、银离子或磺胺嘧啶银、硫酸银、硝酸银和碳酸银。

[0024] 在另一个实施方式中,螯合剂是 EDTA 和柠檬酸钠,并且金属离子盐是氯化锌或硫酸锌。EDTA 可以约 10mg/ml 存在,并且柠檬酸钠可以约 10mg/ml 存在。氯化锌或乙酸锌可以约 1mg/ml 存在。

[0025] 组合物还可包含选自下组的一种或多种成分:水、柠檬酸盐缓冲液、柠檬酸、稳定剂、调味剂、维生素、矿物质、草药、表面活性剂、抗微生物肽、抗微生物剂和 pH 调节剂。

[0026] 本发明还可教导以多种方式制备用于伤口护理应用的合适制剂的方法,例如,消毒溶液、乳液、乳膏、凝胶、喷剂、热可逆凝胶喷剂、糊料、香油、绷带、敷料、纱布、伤口冲洗器具、缠绕物和乳腺炎乳头浸溶液。

[0027] 本发明还教导了制备用于消毒剂和化妆品的合适制剂的方法。消毒剂在对水果、

蔬菜、食品和肉类加工企业、医院、牲口棚、医用仪器、和其他工业和机构设施的消毒中具有应用。化妆品包括香波和抗微生物润肤乳液和乳膏。

[0028] 本发明还可教导预防或处理肉类腐败的方法,包括在肉类或肉类产品上局部使用该组合物。该方法可包括以下的一种或多种步骤:涂覆、喷涂、喷雾、注射、浸泡、冲洗、浸渍和漂洗。

[0029] 该制剂还可包括天然或合成调味剂和着色剂。也可向本发明的组合物中加入增稠剂,如瓜尔胶、卡波姆、聚乙二醇、普流罗尼克 F-127、藻酸钠、羧甲基纤维素、黄原胶和其他药理学上可接受的增稠剂。

[0030] 其他制剂将是本领域技术人员显而易见的。本发明的组合物可包括抗生物膜酶(纤维素酶、 β -N-乙酰基葡萄糖酶、DispersinB、木瓜蛋白酶、DNA 酶 1 等)、抗微生物肽、抗生素(庆大霉素、环丙沙星、氨基青霉素、头孢孟多酯钠(cefamendole nafate)、利福平等)、抗微生物剂(三氯生、氯己定、季铵化合物、银、银盐等)和其他抗生物膜化合物。

[0031] 本发明还教导了使用脂质体或纳米颗粒递送系统增强组合物中抗感染化合物的稳定性和功效。

附图说明

[0032] 图 1 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独及其组合对甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0033] 图 2 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独及其组合对甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌(MRSP)生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0034] 图 3 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独及其组合对绿脓假单胞菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0035] 图 4 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.062mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独及其组合对单核细胞增生利斯特氏菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0036] 图 5 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠+EDTA、柠檬酸钠+ $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0037] 图 6 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠+EDTA、柠檬酸钠+ $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌(MRSP)生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0038] 图 7 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠+EDTA、柠檬酸钠+ $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对绿脓假单胞菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0039] 图 8 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠+EDTA、柠檬酸钠+ $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对猪霍乱沙门氏菌 ATCC 10708 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0040] 图 9 是显示柠檬酸钠(3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml)和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠+EDTA、柠檬酸钠+ $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对大肠杆菌 O157:H7 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0041] 图 10 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独及其组合对大肠杆菌 O157:H7 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0042] 图 11 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对表皮葡萄球菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0043] 图 12 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对凝固酶阴性葡萄球菌 (CoNS-42) 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0044] 图 13 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对无乳链球菌 ATCC 12386 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0045] 图 14 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对肺炎克雷伯氏菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0046] 图 15 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对鲍氏不动杆菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0047] 图 16 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对嗜麦芽糖寡养单胞菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0048] 图 17 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对万古霉素耐药性肠球菌 (VRE) 生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0049] 图 18 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对粪肠球菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0050] 图 19 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对奇异变形菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0051] 图 20 是显示柠檬酸钠 (3mg/ml)、EDTA(0.25mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.1mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对白色念珠菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0052] 图 21 是显示柠檬酸钠 (1.5mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.05mg/ml) 单独以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合对皮屑芽孢菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0053] 图 22 是显示柠檬酸钠 (1.5mg/ml)、EDTA(0.125mg/ml) 和 $ZnCl_2$ (0.05mg/ml) 单独及其组合对皮屑芽孢菌生长和生物膜形成的抑制作用的柱状图。

[0054] 发明详述

[0055] 定义

[0056] 术语“抗微生物剂”是指杀死或抑制或停止微生物（包括但不限于细菌和酵母）生长的化合物或组合物。

[0057] 术语“生物膜”是指包封在自己产生的胞外聚合基质中，并且连接到生物或非生物表面的有结构的微生物群落。生物膜中的细菌对抗生素 / 抗微生物剂的抗性比其浮游（游离存活的）对应物高 1000 倍。

[0058] 术语“生物膜形成”是指微生物连接到表面并且随后发展成多层细胞。

[0059] 术语“抗生物膜”是指抑制微生物生物膜形成并破坏或打散预先形成的生物膜。

[0060] 术语“感染”是指微生物如正常情况下在体内不存在的细菌、病毒和寄生虫的入侵和增殖。感染可能没有症状或是亚临床的，或者其可引起症状并且是临床上明显的。感染可能保持局部性，或者其可通过血液或淋巴管扩散而变成全身性的（全体）。在身体中天然存活的微生物并不被认为是感染。

[0061] 术语“伤口”是指一种受伤的类型，其中皮肤被撕裂、切开或刺穿（开放的伤口），或者钝力损伤导致暗伤（封闭的伤口）。在病理学上，其具体指对皮肤真皮破坏，尖锐损伤。

[0062] 术语“急性伤口”是指新产生的并处于愈合的第一阶段的那些伤口。急性伤口的特征在于皮肤层已由外力或物体刺破或破坏。如果不在预期的时间框架内愈合或者由于差的供血、氧、营养或卫生，任何急性伤口都可能发展成慢性伤口。应该适当地处理急性伤口以避免感染、发炎或持续压迫。急性伤口基于多种原因（如撕裂、磨擦、刺穿、切口、枪击、烧伤）和尺寸及深度的类型（浅表或深度）分类。

[0063] 术语“慢性伤口”是指不会仅仅随着时间而自动修复的伤口。慢性伤口通常被认为“卡”在伤口愈合的阶段之一中，并且通常在较为年老的成年人群中看到。通常，如果预期在 2-3 个月以内伤口不会愈合，则其被认为是慢性的。慢性伤口包括压迫性溃疡（例如，褥疮）、动脉和静脉腿部溃疡、和糖尿病性溃疡。

[0064] 术语“消毒剂”是指应用于非生命物体以破坏该物体上生存的微生物的物质。消毒剂不必杀死所有的生物体，尤其是耐受性细菌孢子；其比灭菌效果差，灭菌是杀死所有类型生命的极端物理和 / 或化学过程。消毒剂不同于诸如抗生素的破坏体内微生物的其他抗微生物剂，以及破坏活组织上的微生物的防腐剂。消毒剂也与杀生物剂不同，后者往往破坏所有的生命形式，不仅仅是微生物。消毒剂通过破坏微生物的细胞壁 / 细胞膜或者干扰代谢和生长来发挥作用。

[0065] 术语“抑制”是指至少降低伤口相关的细菌生长和生物膜形成。

[0066] 治疗目的的术语“哺乳动物”是指可被分类为哺乳动物的任何动物，其中包括人、家畜和农场动物、以及动物园动物、体育动物或宠物，如狗、马、猫、牛、猪、羊等。

[0067] 术语“预防”是指至少防止与细菌相关的病症在哺乳动物中发生，尤其是当发现该哺乳动物倾向于患有疾病但还未诊断患有该疾病时。

[0068] 术语“对象”是指需要治疗的活脊椎动物，如哺乳动物（优选人和宠物动物）。

[0069] 术语“治疗有效量”是指足够高以使待治疗对象病症明显积极改善的组合物的量。

[0070] 本文所用的“预防性量”包括预防性的量，例如，足够防止或保护抵抗伤口、皮肤感染和相关疾病及其症状的量，以及有效缓解或愈合伤口、皮肤感染、相关疾病及其症状的量。在同时给予抗微生物剂与适用于本发明的方法的肽时，所述肽和 / 或抗微生物剂可以一定剂量给予，该剂量低于当抗微生物剂作为唯一活性成分给予时所需要的剂量。通过给

予较低剂量的活性成分,可降低与之相关的副作用。

[0071] “治疗”是指为了阻止已存在疾病病理学的进一步发生或改变而进行的干预措施。因此,“治疗”既指治疗性措施又指预防性方法。需要治疗的那些患者包括已经患有感染的人以及那些需要预防感染发生的人。关于伤口感染,“治疗”是指至少缓解对象(如哺乳动物,包括但不限于人)中与细菌感染相关的伤口愈合病症,该对象至少部分受到所述病症的影响,并且包括但不限于调节、抑制病症和/或缓解病症。

[0072] 术语“金属离子盐”是指金属离子的盐,如氯化锌、乳酸锌、柠檬酸锌、葡萄糖酸锌、硫酸锌、乙酸锌、银离子或磺胺嘧啶银、硫酸银、硝酸银和碳酸银。

[0073] 本发明可教导具有抗微生物和抗生物膜活性的抗感染组合物,其含有螯合剂和其他抗微生物剂,例如抗微生物剂/抗生物膜化合物,金属离子盐和胶凝剂,表面活性剂或稳定剂的组合。

[0074] 新型组合物将螯合剂和金属离子盐组合以使用比抗微生物组合物所需的正常量少的螯合剂和/或金属离子盐的量来实现对细菌生长和生物膜的显著抑制。如果某些应用需要,可使用较高浓度的这些化合物。

[0075] 待在本发明的抗微生物组合物中使用的螯合剂的量可以是 10000 至 100000mg/L。这一所述范围的上端可用于制备将在使用前稀释的浓缩产品。对于非浓缩产品,本发明中使用的量优选为约 5000 至 10000mg/L。优选地,范围是约 1000 至 5000mg/L。

[0076] 使用的螯合剂的量应该是约 1000 至 5000mg/L。如果该组合物配制为浓缩物,则可应用该范围的上端。对于非浓缩产品,本发明中使用螯合剂的量优选为约 500 至 5000mg/L。优选地,该范围是约 1000 至 3000mg/L,更优选约 2000 至 3000mg/L。

[0077] 制备

[0078] 通过一种方法,如果形成含有一种或两种螯合剂和金属离子盐的双组分组合物,则这些化合物将以以下方式组合。通过充分搅拌,可使螯合剂,随后是金属离子盐溶于水。然而,应注意到可颠倒添加顺序。

[0079] 另外,可优选将抗微生物剂/抗微生物肽、抗生素、抗生物膜化合物、季铵化合物和表面活性剂与螯合剂在抗微生物组合物中合并。本发明的组合物包含:(a) 少量的至少一种或两种螯合剂;(b) 少量的金属离子盐或螯合铁的糖蛋白或抗微生物肽或抗生素或抗生物膜化合物;和(c) 保守量的选自下组的至少一种化合物:稳定剂和/或胶凝剂和/或表面活性剂,其中,组分(a)、(b)和(c)各自的量足够组合形成对于预防和治疗急性和慢性伤口感染(割伤、瘀青、手术部位、撕裂、磨擦、刺穿、切口、枪击、灼烧、脓皮病、特应性皮炎、湿疹、压迫性溃疡、静脉和动脉腿部溃疡、糖尿病足溃疡等的感染)而言有效的抗感染组合物。

[0080] 组合物中活性组分的浓度可随着需要变化以减少使用本发明的组合物来预防或治疗伤口感染和消毒的时间的量。本领域技术人员可容易地确定活性组分浓度的这些变化。

[0081] 组合物

[0082] 本发明可包括用于预防和治疗伤口感染的包含至少两种螯合剂和一种金属离子盐的独特和强化的抗感染组合物。

[0083] 在一个实施方式中,含有两种螯合剂和金属离子盐的组合物包含抗微生物化合

物。含有螯合剂和金属离子盐的组合物与抗微生物 / 抗生物膜化合物对伤口感染相关细菌生长和生物膜形成有强化的抑制作用。此外,向含有螯合剂和金属离子盐的组合物中加入抗微生物化合物使该组合物有效抵抗引起食源性疾病的微生物污染和伤口感染相关的病原体。

[0084] 在本发明的一个实施方式中,强化的抗微生物 - 抗生物膜组合物包含至少一种或两种螯合剂,一种金属离子盐和一种或多种抗微生物剂,其包括防腐剂(例如,三氯生、氯己定盐、十六烷基氯化吡啶鎓等)、抗生素和细菌素(例如,乳链菌肽、表皮素、高利丹宁(gallidennin)、肉桂霉素、耐久霉素、乳链球菌素 481 等)和螯合铁的糖蛋白(卵传铁蛋白、乳铁蛋白和血清铁传递蛋白)。另外,伤口愈合或消毒组合物可包含如下成分:如柠檬酸盐(例如,柠檬酸、柠檬酸锌、柠檬酸钠、柠檬酸钾等)、矿物质(例如,矿物盐,如氯化锌、葡萄糖酸锌、乳酸锌、柠檬酸锌、硫酸锌、乙酸锌、银、硫酸银、磺胺嘧啶银、硝酸银、碳酸银等)和三萜类化合物(例如,齐墩果酸和乌索酸)和壳聚糖。

[0085] 在一个实施方式中,组合物包含抗生素和一种或两种螯合剂以及一种金属离子盐。抗生素是熟知的。抗生素组包括但不限于, β -内酰胺抑制剂(例如,青霉素、氨苄青霉素、阿莫西林、甲氧西林等)、头孢菌素类(例如,头孢噻吩、头孢霉素等)、氨基糖苷类(例如,链霉素、妥布霉素等)、多烯类(例如,两性霉素、制霉菌素等)、大环内酯类(例如,红霉素等)、四环素类(例如,四环素、多西环素等)、硝基咪唑(例如,甲硝唑)、喹诺酮类(例如,萘啶酸)、利福霉素类(例如,利福平)、和磺酰胺类(例如,磺胺)、硝基芳族化合物(例如,氯霉素)和吡啶类(例如,异烟肼)。

[0086] 在一个实施方式中,组合物包含防腐剂、一种或两种螯合剂以及一种金属离子盐。防腐剂是杀灭或抑制身体外表面上微生物的生长的试剂。防腐剂包括但不限于,三氯生、氯己定盐和十六烷基氯化吡啶鎓。

[0087] 在一个实施方式中,组合物包含抗生物膜化合物、一种或两种螯合剂以及金属离子盐。抗生物膜化合物包括但不限于,DisperinB、DNA 酶 I、蛋白酶 K、腺苷三磷酸双磷酸酶、顺式-2-壬烯二酸、藻酸盐裂解酶、乳铁蛋白、镓、纤维素和 5-氟尿嘧啶。

[0088] 在一个实施方式中,组合物有效抑制伤口感染和食源性疾病相关细菌的生长和生物膜形成。该组合物也有效破坏或打散预先形成的生物膜,这使得生物膜包埋的细菌更易于被抗微生物剂的杀灭。在合适的环境条件(如湿度和 pH)下,可使用本发明的实施方式来调节感染。

[0089] 本发明的一个实施方式也可包括其他药学上可接受的载剂、稀释剂和添加剂如抗氧化剂、抗炎化合物、维生素、组织降解酶、赋予制剂在预期接受者中的等渗性的缓冲剂和溶质;和水性和非水性无菌悬浮液,其可包括悬浮剂、表面活性剂和增稠剂。

[0090] 伤口护理制剂

[0091] 可向多种用于向伤口施用 / 递送组合物的制剂中加入本发明的组合物,包括但不限于,消毒溶液、乳液、乳膏、凝胶、喷剂、凝胶喷剂、绷带、敷料、缠绕物、纱布、带、粘合剂和伤口冲洗器具。为了提供这类制剂,本发明的组合物与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0092] 制剂包括,但不限于,可通过任意已知的方法制备的包含一种或两种螯合剂和金属离子盐,以及防腐剂、抗生素、抗微生物剂、螯合铁的糖蛋白、细菌素、胞外基质或壳聚糖

的组合物。

[0093] 通常,制备抗感染组合物的方法可包括将药学上可接受的运载体与有效量的两种螯合剂和金属离子盐,与防腐剂、抗生素、细菌素、抗微生物肽或壳聚糖组合。

[0094] 可使用多种运载体和赋形剂来配制本发明的实施方式,并且多种运载体和赋形剂是熟知的。这类药学上可接受的载剂包括,但不限于,水、乙醇、润湿剂如聚乙二醇、甘油和山梨糖醇、胶凝剂如纤维素衍生物、聚氧丙烯 / 聚氧乙烯嵌段共聚物、羧甲基纤维素、普流罗尼克 F-127、藻酸钠、聚乙二醇、增稠剂如 Carbopol™ 934。

[0095] 治疗方法

[0096] 本发明的另一个方面可包括治疗伤口感染的方法,并且也包括对伤口表面以及食品 / 肉类加工企业进行消毒的方法。通常,通过向对象的受感染伤口施用有效量的一种或多种螯合剂和金属离子盐与一种或多种抗微生物剂的组合来有效减少伤口感染。

[0097] 在销售消费用肉类如鸡肉、牛肉和猪肉之前,需要阻止或延缓致病性微生物的生长,并且优选杀死可能由于其在肉类中的存在导致食物中毒的致病性微生物如细菌。因此,本发明还提供了预防或处理肉类腐败的方法,包括在肉类或肉类产品上局部使用本发明的组合物。肉类或肉类产品可以是以下中的一种或多种:牛肉、猪肉、羔羊肉、山羊肉、马肉、鸡肉和鱼肉。肉类或肉类产品可包括用于制成香肠肠衣的猪、牛、绵羊、山羊和马的肠或肠部。它们还可包含用于制成人造香肠肠衣的胶原或纤维素。

[0098] 该组合物可通过以下的一种或多种施用:涂覆、喷涂、喷雾、注射、浸泡、冲洗、浸渍和漂洗。冲洗可包括肉类加工和包装企业中的冲洗水管线或肉类加工线以及清洁设备。

[0099] 对于对肉类进行处理或消毒的用途,成分的优选浓度范围可包括:

[0100] (i) 柠檬酸钠: (a) 50,000mg/L-100,000mg/L, (b) 25,000mg/L-50,000mg/L, (c) 10,000mg/L-25,000mg/L, (d) 5,000mg/L-10,000mg/L, 和 (e) 1,000mg/L-5,000mg/L。

[0101] (ii) EDTA 二钠: (a) 10,000mg/L-25,000mg/L, (b) 5,000mg/L-10,000mg/L, (c) 1,000mg/L-5,000mg/L, (d) 500mg/L-1,000mg/L, 和 (e) 100mg/L-500mg/L。

[0102] (iii) 氯化锌: (a) 1,000mg/L-5,000mg/L, (b) 500mg/L-1,000mg/L, (c) 100mg/L-500mg/L, 和 (d) 10mg/L-100mg/L。

[0103] 在一个实施方式中,将一种或多种螯合剂和金属离子盐一起配制成本文所述的药学上可接受的药物,其包含运载体和有效量的包含一种或多种螯合无机和金属离子盐作为活性成分的组合物。

[0104] 本发明的伤口护理组合物的示例性给药方案是至少一次或两次向对象(动物或人)的伤口表面施用本发明的组合物。按照这一实施方式,根据伤口的类型和感染的严重程度,对象应每天 1-3 次向伤口表面施用本发明的组合物。对于动物或宠物,可每天两次或三次使用乳液或乳膏、或凝胶或喷剂或敷料形式的本发明的组合物。

[0105] 在本发明的另一个实施方式中,强化的伤口抗感染组合物并不存在任何抗生素耐药性担忧和生物相容性 / 安全性问题。同时,包含一种或两种螯合剂(EDTA 和柠檬酸钠)和金属离子盐(氯化锌或硫酸锌或乳酸锌)的本发明的组合物具有 GRAS(一般认为安全)的状态并且所有这些成分是食物以及饲料添加剂。

[0106] 参考以下的实施例将更好地理解本发明。这些实施例旨在表示本发明的具体实施方式,并不是对本发明范围的限制。

实施例

[0107] 实施例 1:柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌单独及其组合对甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 生长和生物膜形成的抑制作用

[0108] 金黄色葡萄球菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有所有化合物 (氯化钠 +EDTA+ 氯化锌) 的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比,包含柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌的组合物显示出对生物膜形成的强化抑制作用 (图 1)。

[0109] 实施例 2:柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌单独及其组合对甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (MRSP) 生长和生物膜形成的抑制作用

[0110] 伪中间葡萄球菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有所有化合物 (氯化钠 +EDTA+ 氯化锌) 的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比,包含柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌的组合物显示出对生物膜形成的强化抑制作用 (图 2)。

[0111] 实施例 3:柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌单独及其组合对绿脓假单胞菌生长和生物膜形成的抑制作用

[0112] 绿脓假单胞菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有所有化合物 (氯化钠 +EDTA+ 氯化锌) 的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比,包含柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌的组合物显示出对生物膜形成的强化抑制作用 (图 3)。

[0113] 实施例 4:柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌单独及其组合对单核细胞增生利斯特氏菌生长和生物膜形成的抑制作用

[0114] 单核细胞增生利斯特氏菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有所有化合物 (氯化钠 +EDTA+ 氯化锌) 的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后

用 33% 乙酸溶解染料, 并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比, 包含柠檬酸钠、EDTA 和氯化锌的组合显示对生物膜形成的强化抑制作用 (图 4)。

[0115] 实施例 5: 单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合对甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 生长和生物膜形成的抑制作用

[0116] 金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含有以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测: 弃去孔中的培养基, 用水对孔清洗 3 次, 并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料, 并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比, 柠檬酸钠 + EDTA 和柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 的组合显示对生物膜形成的强化抑制作用 (图 5)。

[0117] 实施例 6: 单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合对甲氧西林耐药性伪中间葡萄球菌 (MRSP) 生长和生物膜形成的作用

[0118] MRSP 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含有以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测: 弃去孔中的培养基, 用水对孔清洗 3 次, 并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料, 并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比, 柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA + $ZnCl_2$ 的组合显示对生物膜形成的强化抑制作用 (图 6)。

[0119] 实施例 7: 单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合对绿脓假单胞菌生长和生物膜形成的抑制作用

[0120] 绿脓假单胞菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含有以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测: 弃去孔中的培养基, 用水对孔清洗 3 次, 并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料, 并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比, 柠檬酸钠 + EDTA 和 EDTA + $ZnCl_2$ 的组合显示对生物膜形成的强化抑制作用 (图 7)。

[0121] 实施例 8: 单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合对猪霍乱沙门氏菌 ATCC 10708 的抑制作用

[0122] 猪霍乱沙门氏菌 ATCC 10708 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含有以及单独含有各化合物 (柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌) 及含有柠檬酸钠 + EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA + $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96- 孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。

使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 8）。

[0123] 实施例 9：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ ，和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对大肠杆菌 O157:H7 的抑制作用

[0124] 大肠杆菌 O157:H7 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ ，和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比，柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 9）。

[0125] 实施例 10：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，及其组合对大肠杆菌 O157:H7 的抑制作用

[0126] 大肠杆菌 O157:H7 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有所有化合物（氯化钠 +EDTA + 氯化锌）的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比，包含柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ 的组合物显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 10）。

[0127] 实施例 11：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对表皮葡萄球菌的抑制作用

[0128] 表皮葡萄球菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 11）。

[0129] 实施例 12：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对凝固酶阴性葡萄球菌 (CoNS-42) 的抑制作用

[0130] CoNS-42 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ ，和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems

Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 12）。

[0131] 实施例 13：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对无乳链球菌 ATCC 12386 的抑制作用

[0132] 无乳链球菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 13）。

[0133] 实施例 14：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对肺炎克雷伯氏菌的抑制作用

[0134] 肺炎克雷伯氏菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 14）。

[0135] 实施例 15：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对鲍氏不动杆菌的抑制作用

[0136] 鲍氏不动杆菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比，柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 15）。

[0137] 实施例 16：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$ ，以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对嗜麦芽糖寡养单胞菌的抑制作用

[0138] 嗜麦芽糖寡养单胞菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光

度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比,柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用(图 16)。

[0139] 实施例 17:单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$, 和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对万古霉素耐药性肠球菌 (VRE) 的抑制作用

[0140] VRE 的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物(柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌)及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33%乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比,柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用(图 17)。

[0141] 实施例 18:单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对粪肠球菌的抑制作用

[0142] 粪肠球菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物(柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌)及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33%乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比,柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用(图 18)。

[0143] 实施例 19:单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对奇异变形菌的抑制作用

[0144] 奇异变形菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物(柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌)及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33%乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比,柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用(图 19)。

[0145] 实施例 20:单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合对白色念珠菌的抑制作用

[0146] 白色念珠菌的过夜肉汤培养基在 TSB 中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物(柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌)及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 + $ZnCl_2$ 、和 EDTA+ $ZnCl_2$ 组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测:弃去孔中的培养基,用水对孔清洗 3 次,并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33%乙酸溶解染料,并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 相比,柠檬酸钠 +EDTA 的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用(图 20)。

[0147] 实施例 21:单独的柠檬酸钠、EDTA 和 $ZnCl_2$, 以及柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠

+ZnCl₂、和 EDTA+ZnCl₂组合对皮屑芽孢菌的抑制作用

[0148] 皮屑芽孢菌的过夜肉汤培养基在 Sabouraud 右旋糖肉汤中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 +ZnCl₂、和 EDTA+ZnCl₂组合的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比，柠檬酸钠 +EDTA、柠檬酸钠 +ZnCl₂和 EDTA+ZnCl₂的组合显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 21）。

[0149] 实施例 22：单独的柠檬酸钠、EDTA 和 ZnCl₂，及其组合对皮屑芽孢菌的抑制作用

[0150] 皮屑芽孢菌的过夜肉汤培养基在 Sabouraud 右旋糖肉汤中生长并用作接种体。在不含以及单独含有各化合物（柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌）及含有所有化合物（氯化钠 +EDTA+氯化锌）的含 TSB 的 96-孔微孔板中接种并在 37°C 下孵育 24 小时。使用 Labsystems Multiskan Ascent 酶标仪基于 600nm 下的吸光度测定浮游细胞的生长。生物膜通过如下方式检测：弃去孔中的培养基，用水对孔清洗 3 次，并用结晶紫对结合的细胞进行染色。然后用 33% 乙酸溶解染料，并且使用微量滴定板酶标仪来测定 630nm 处的吸光度。与单独的柠檬酸钠或 EDTA 或氯化锌相比，包含柠檬酸钠、EDTA 和 ZnCl₂的组合物显示出对生物膜形成的强化抑制作用（图 22）。

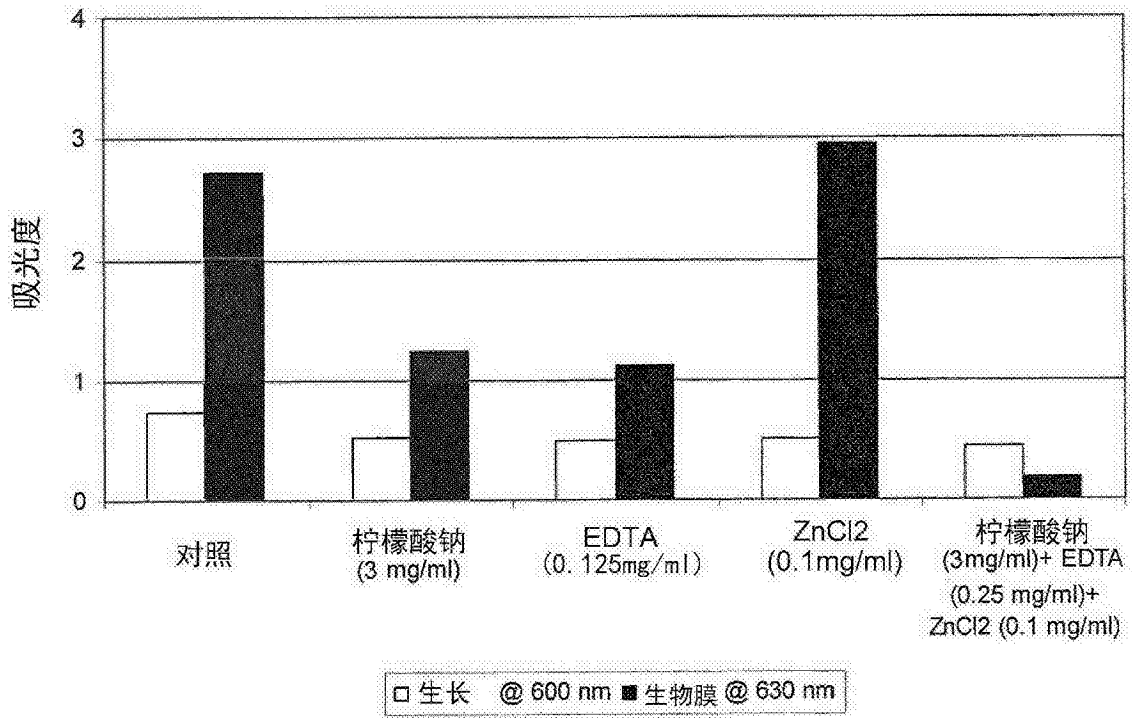


图 1

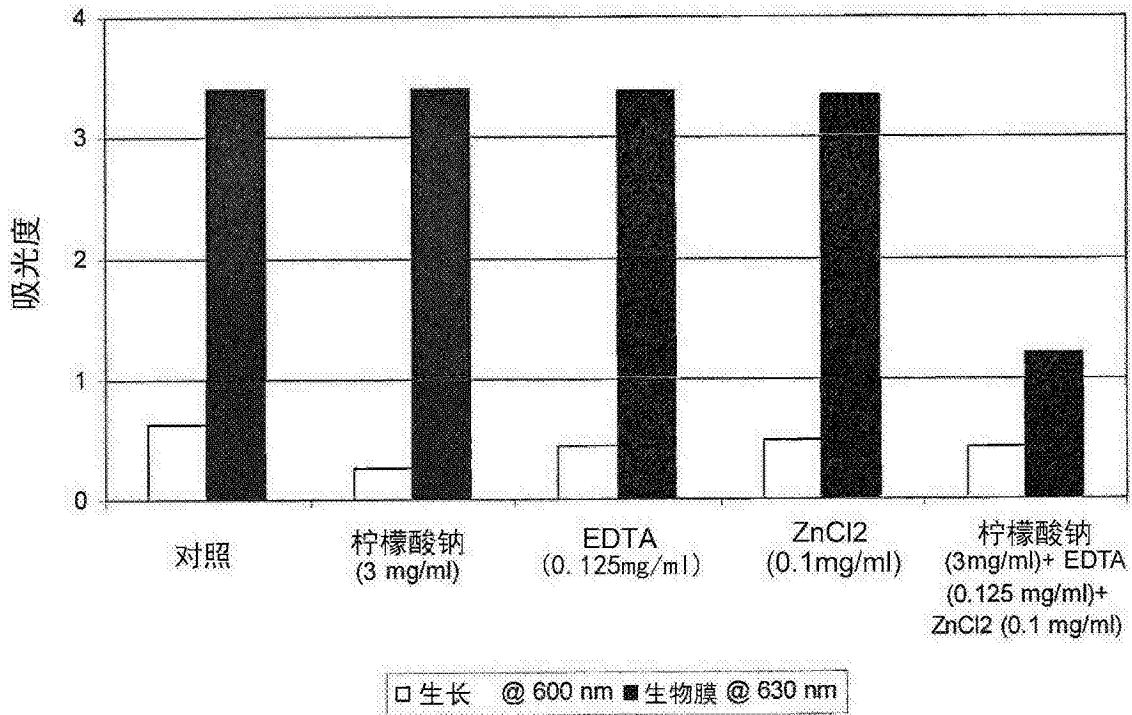


图 2

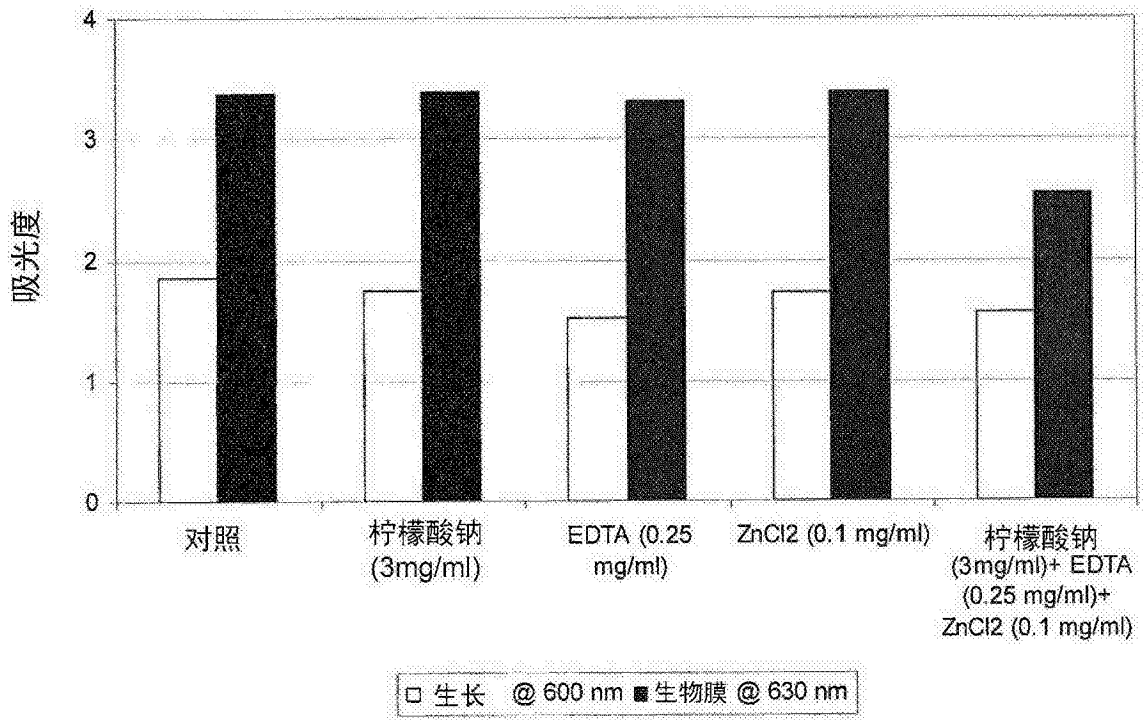


图 3

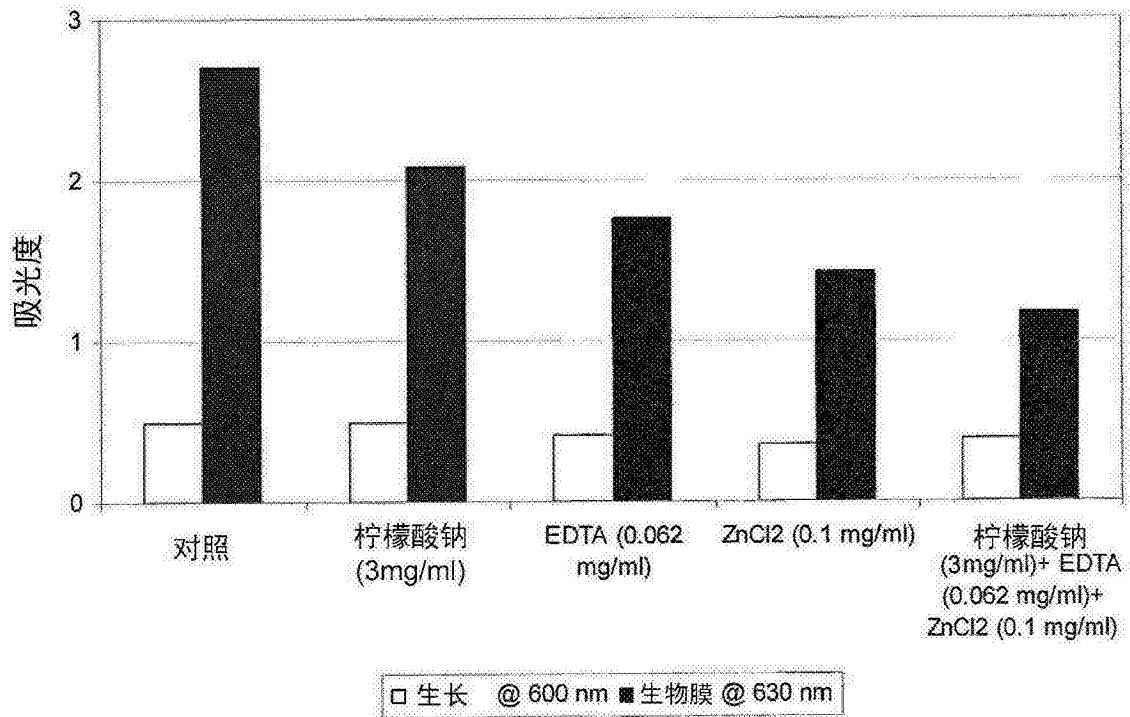


图 4

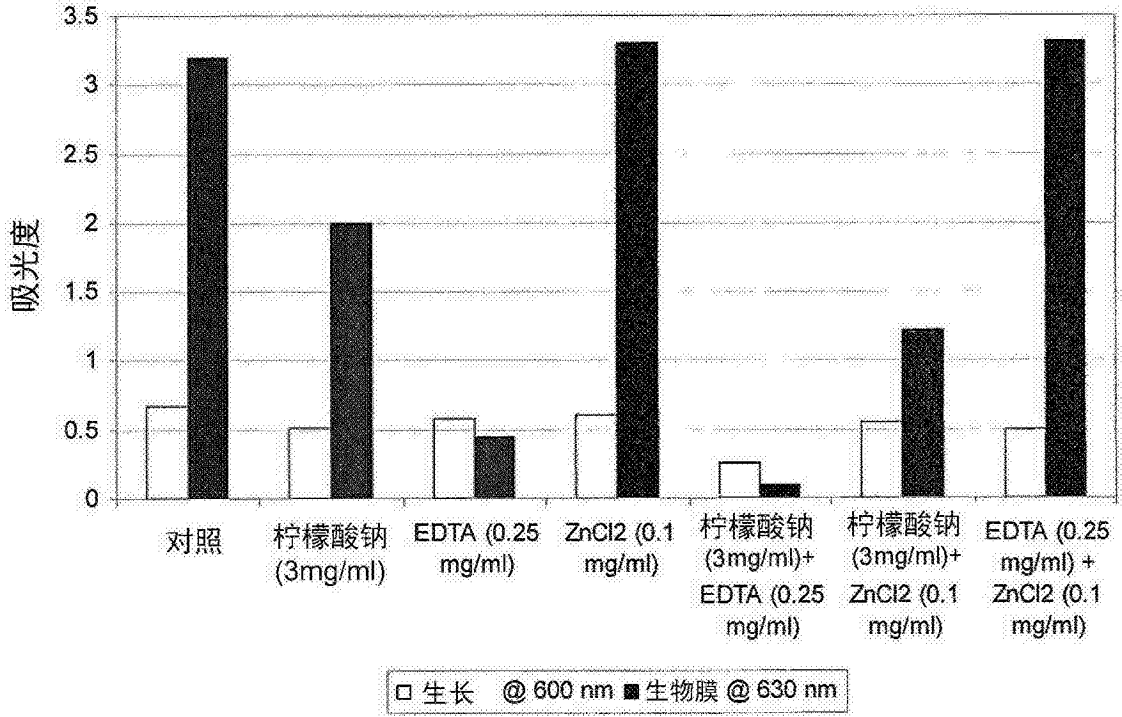


图 5

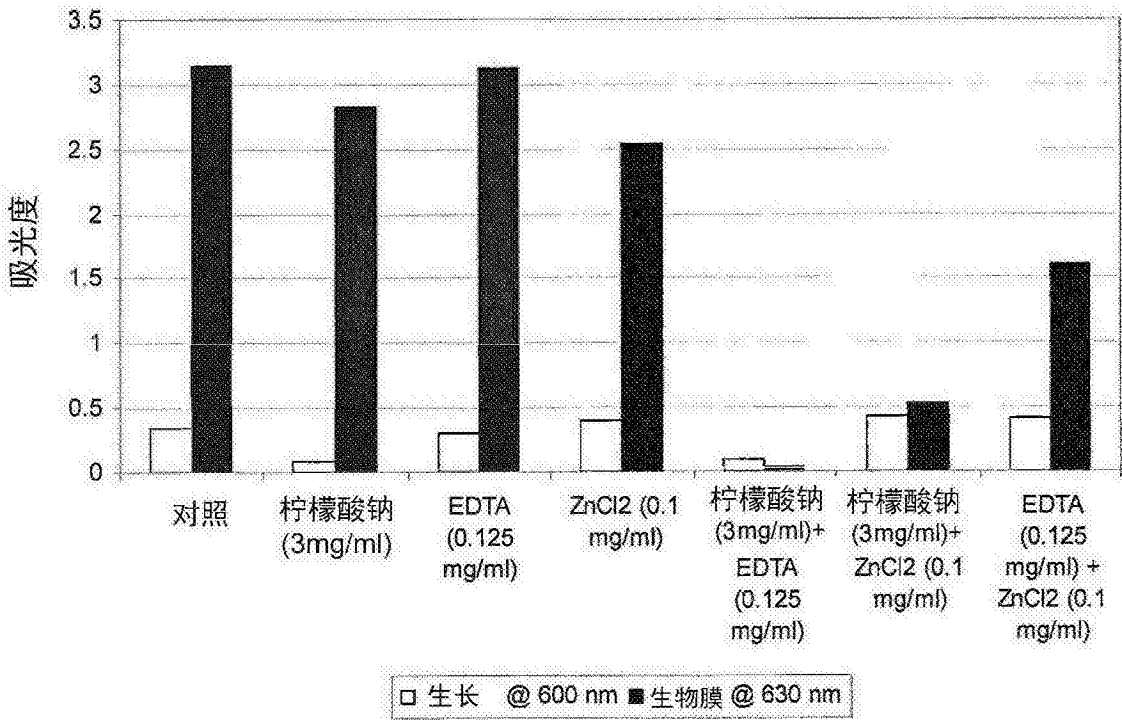


图 6

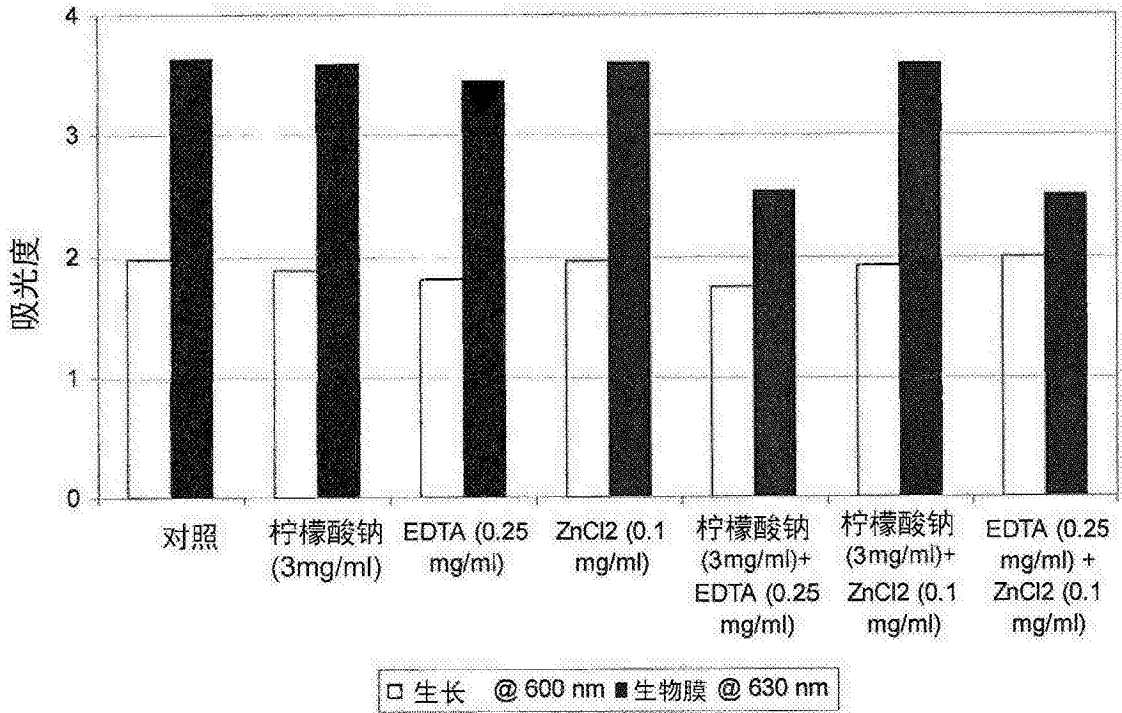


图 7

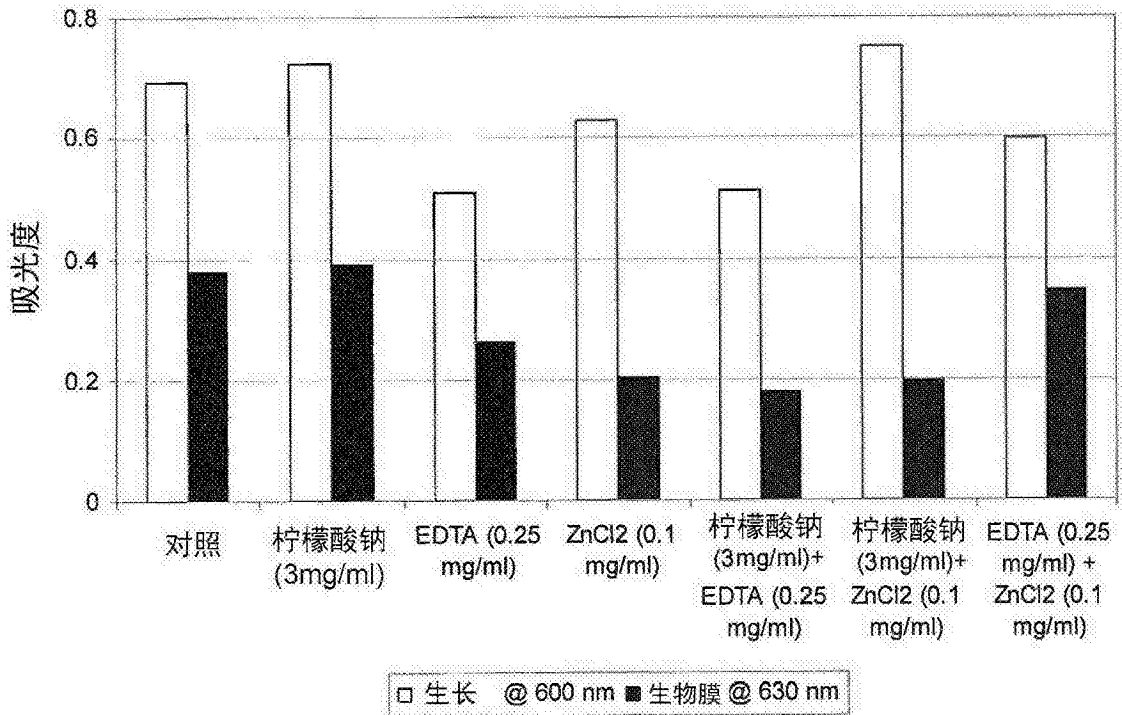


图 8

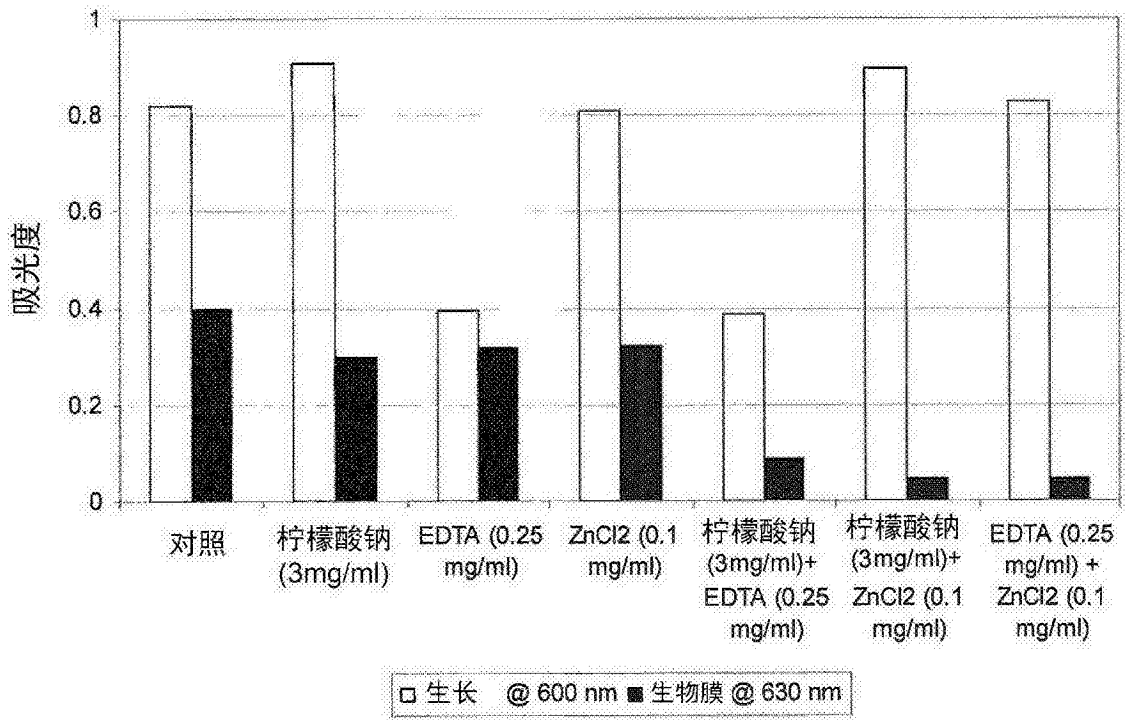


图 9

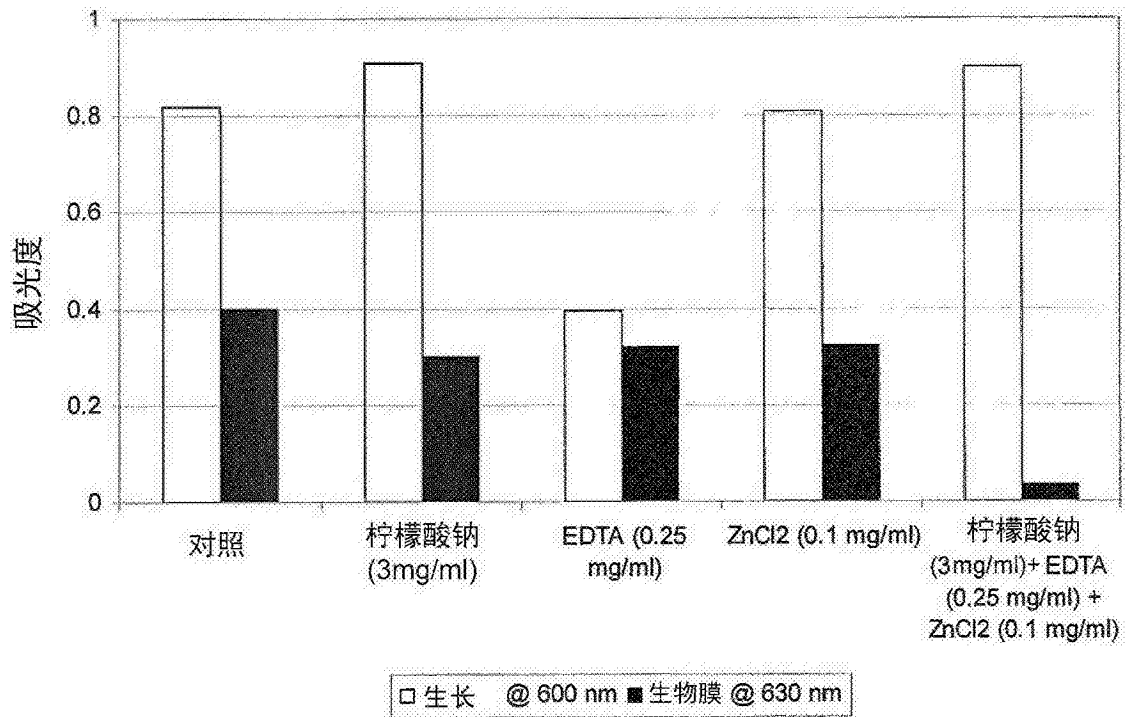


图 10

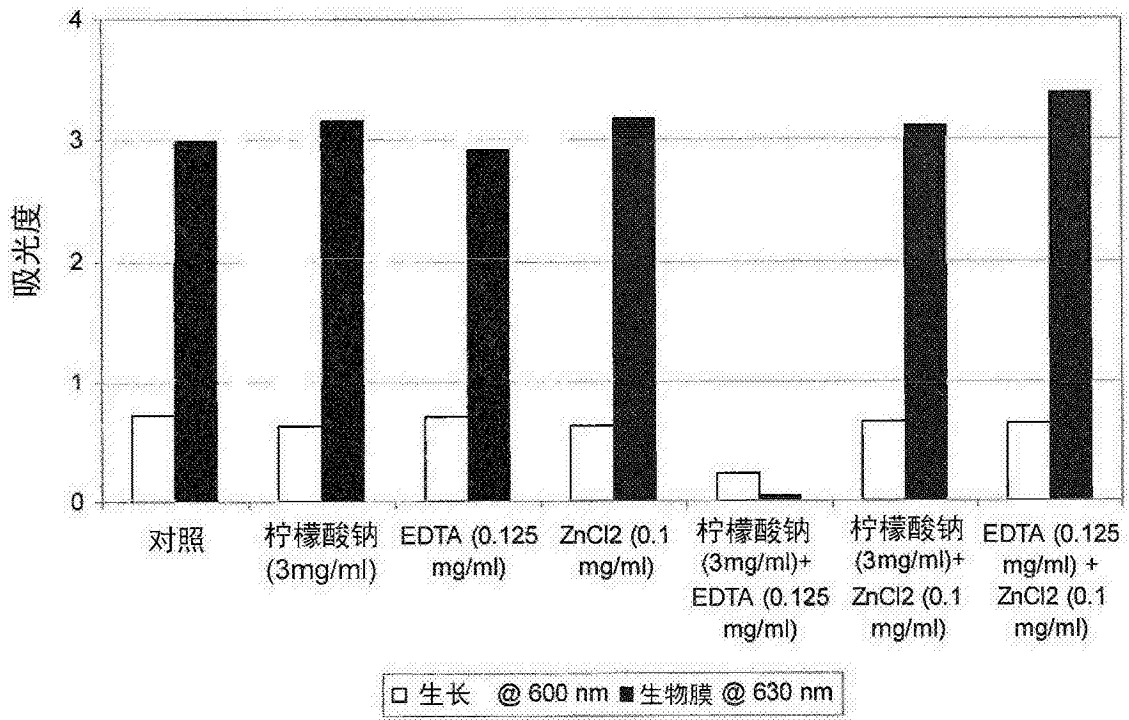


图 11

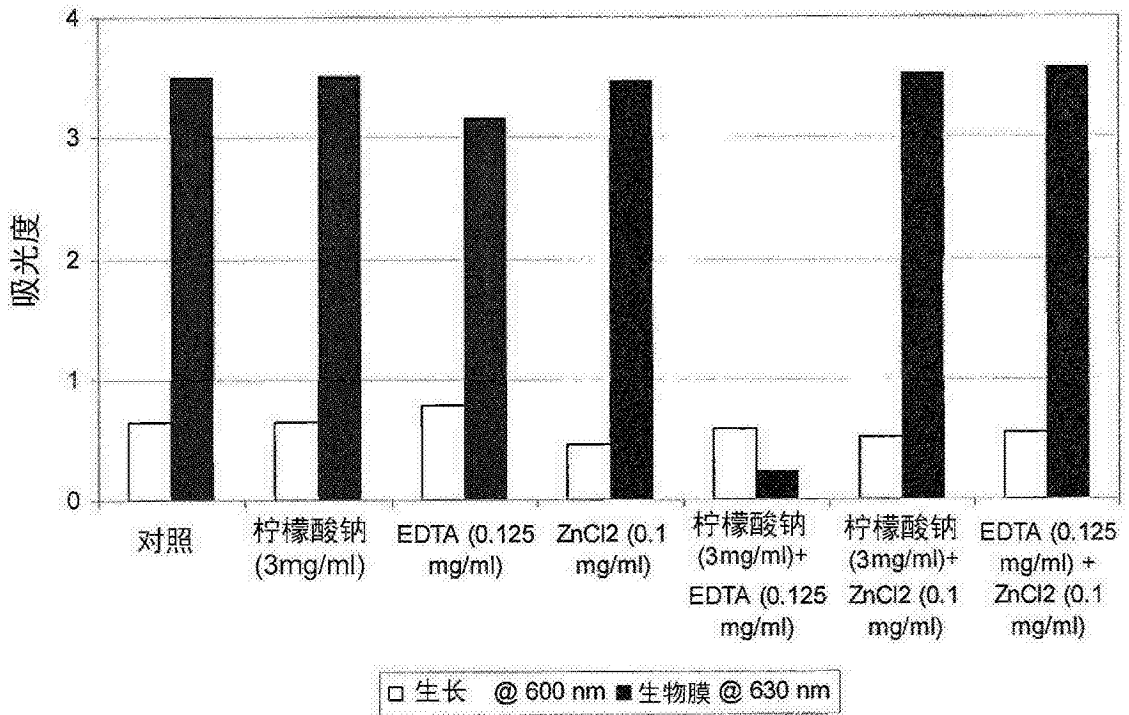


图 12

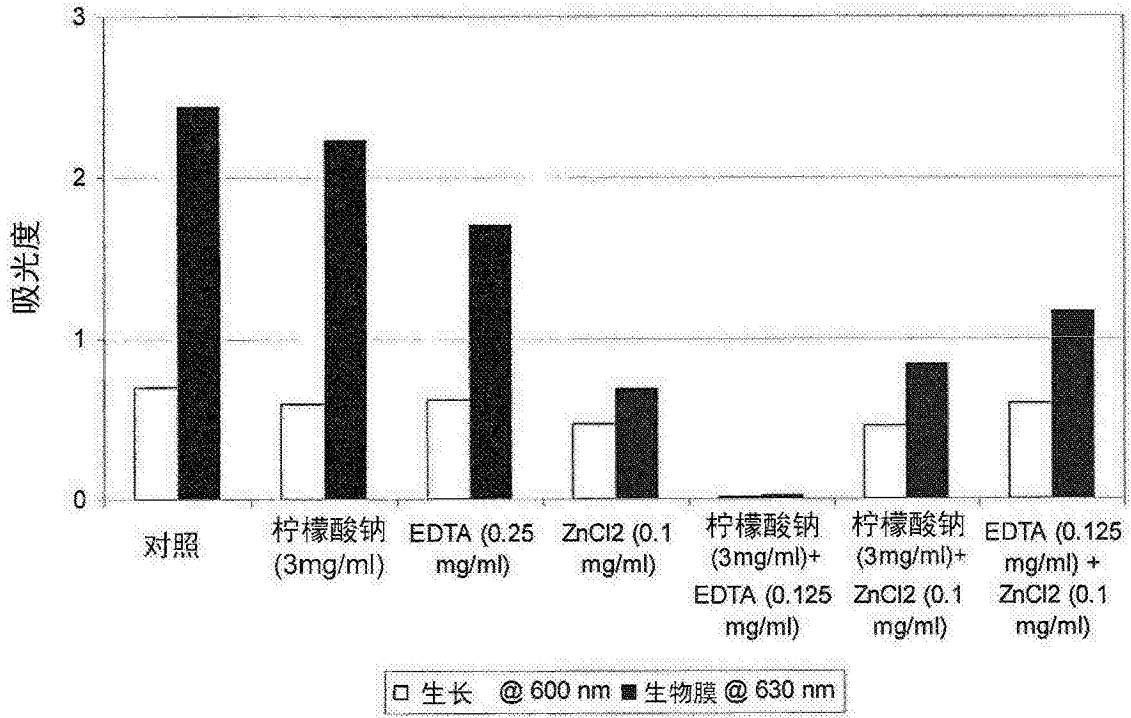


图 13

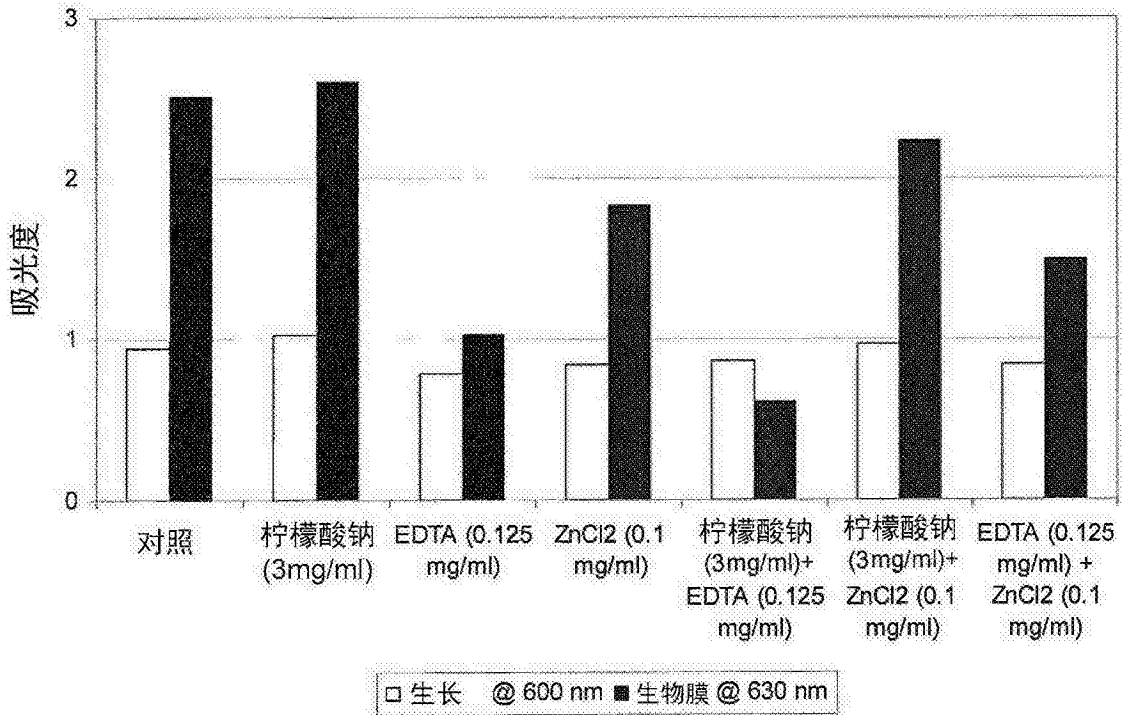


图 14

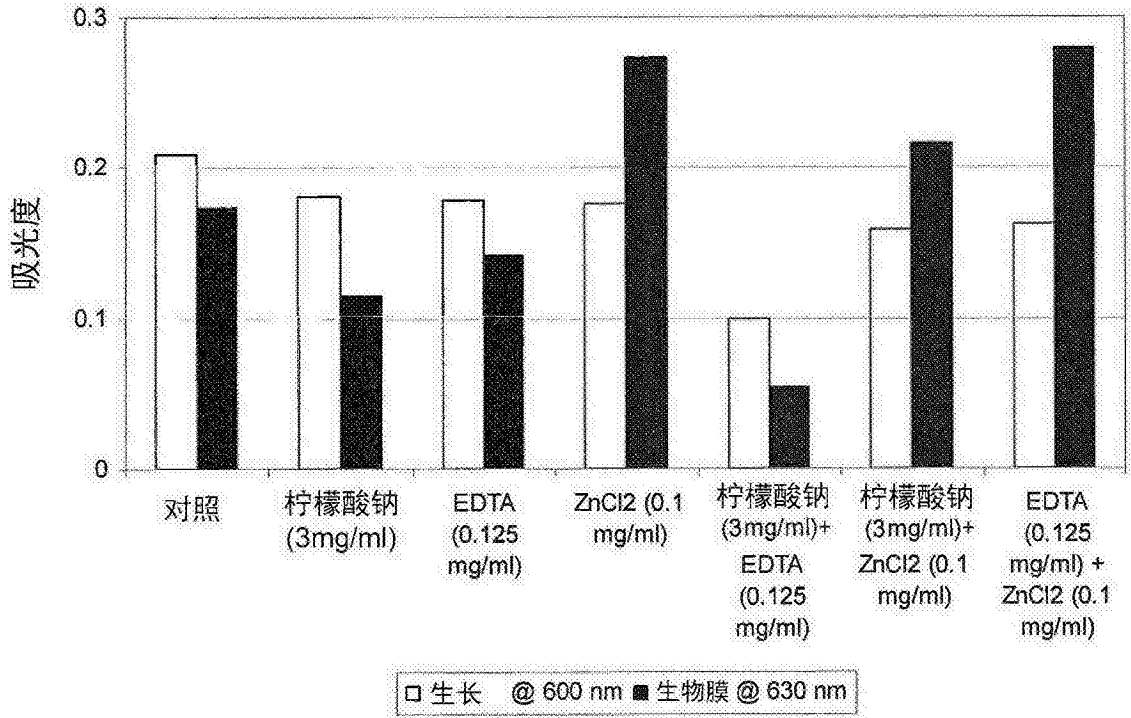


图 15

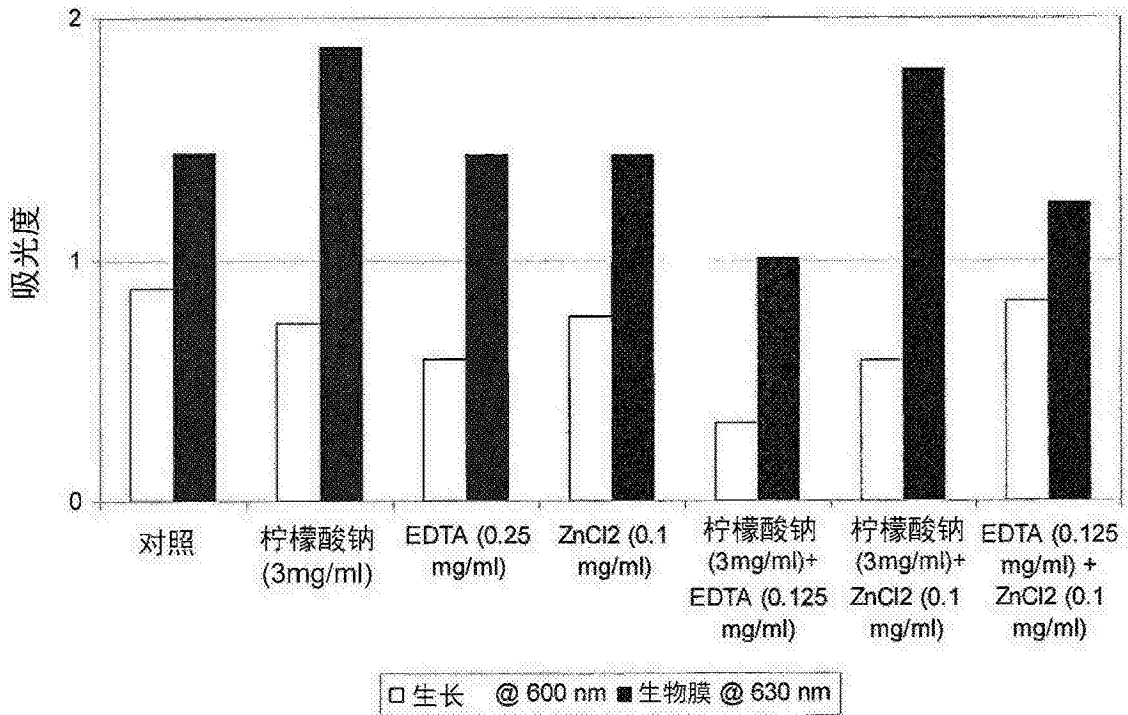


图 16

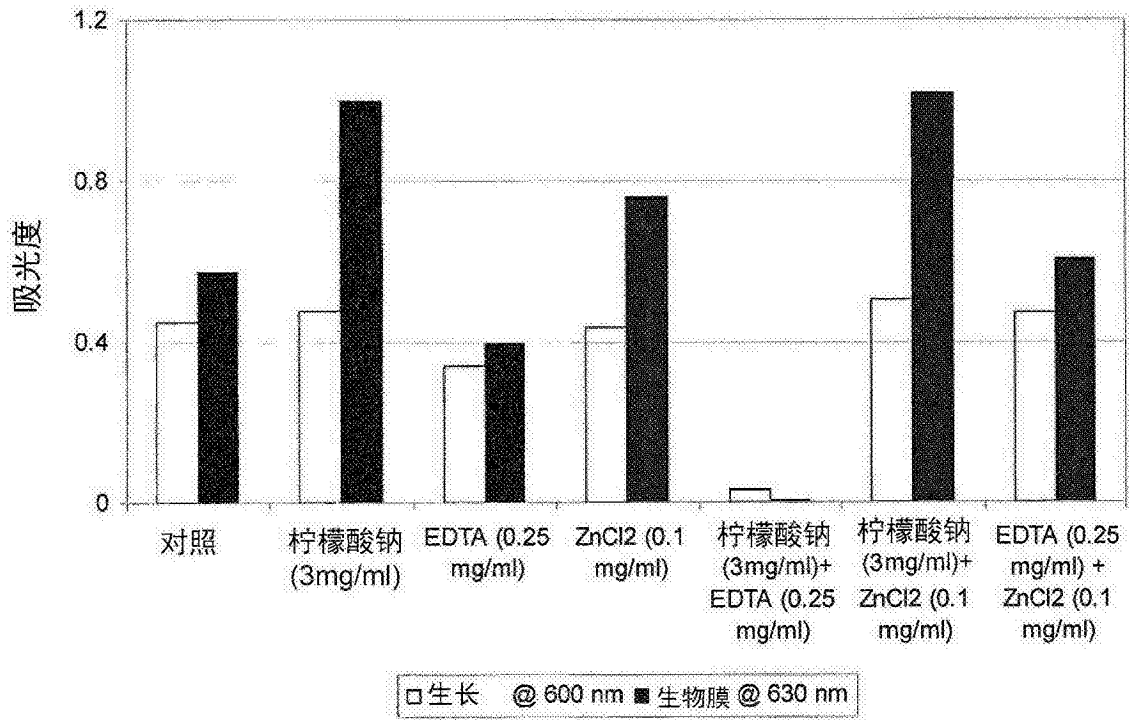


图 17

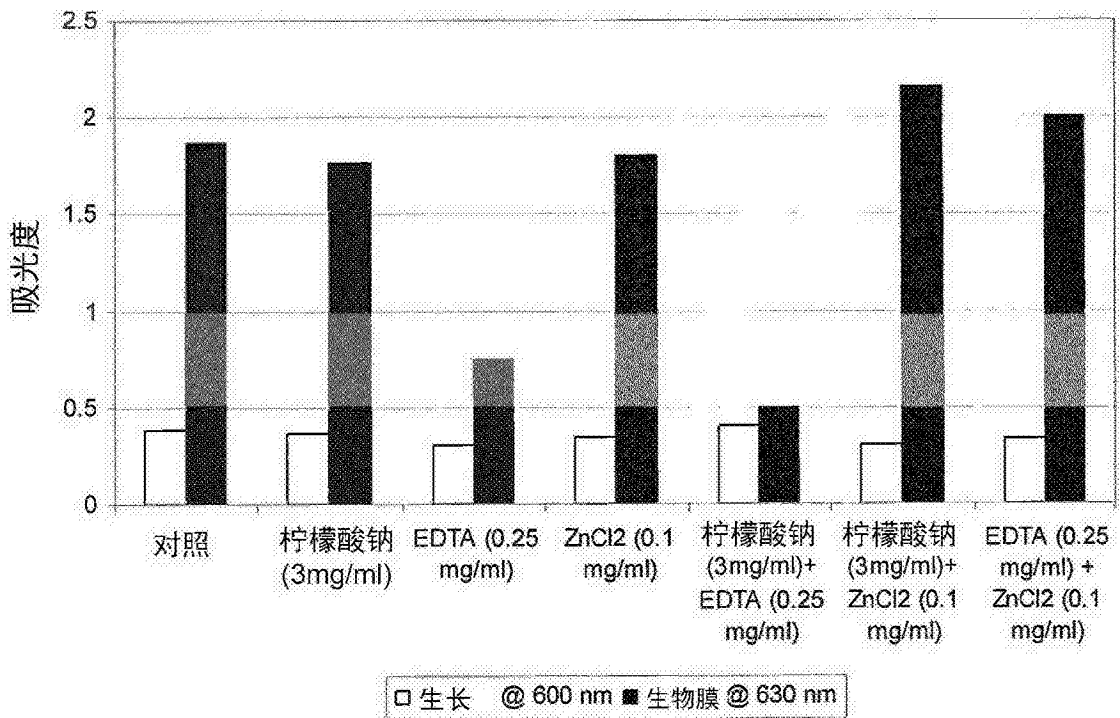


图 18

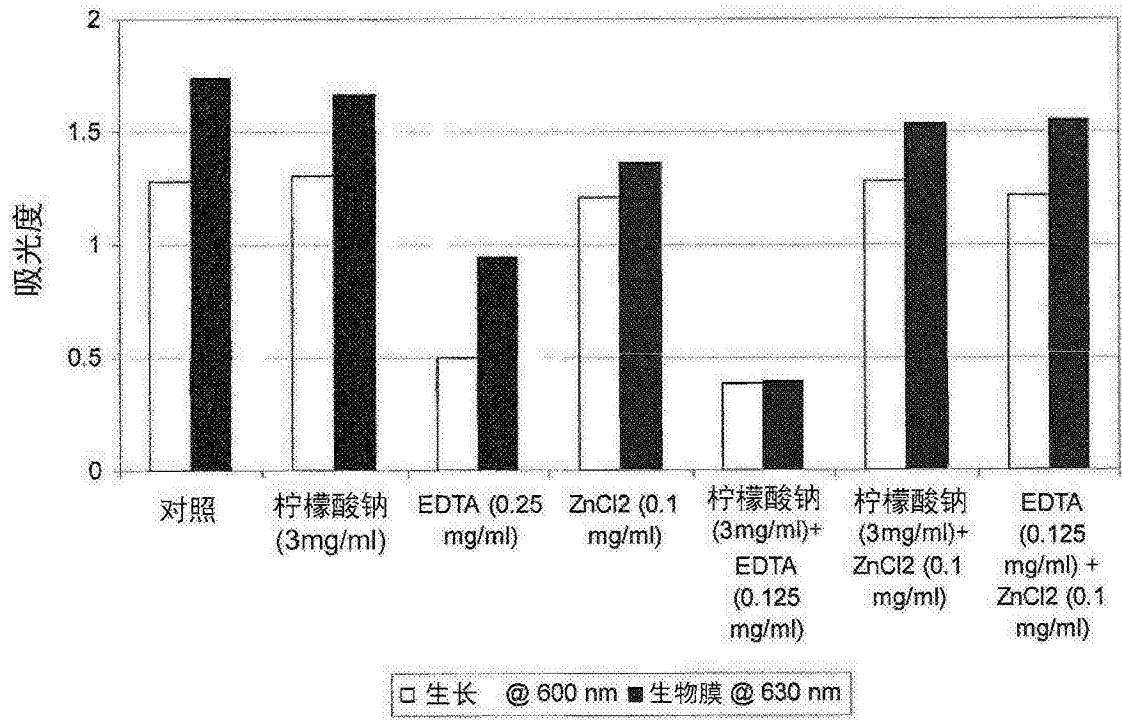


图 19

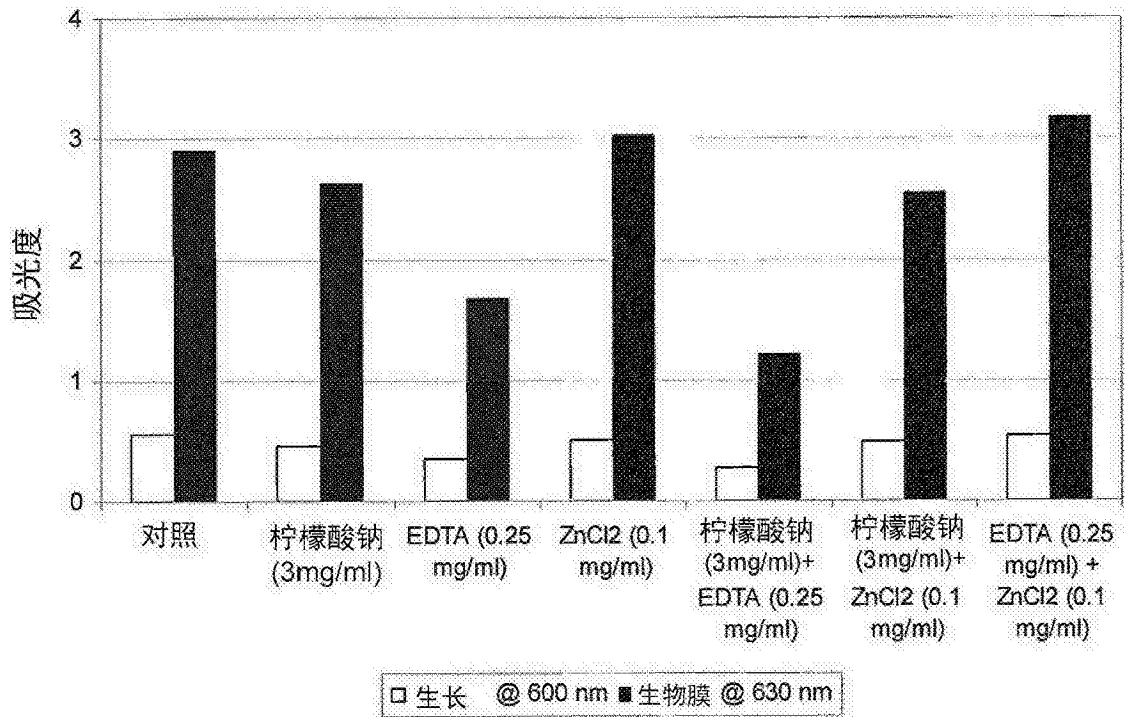


图 20

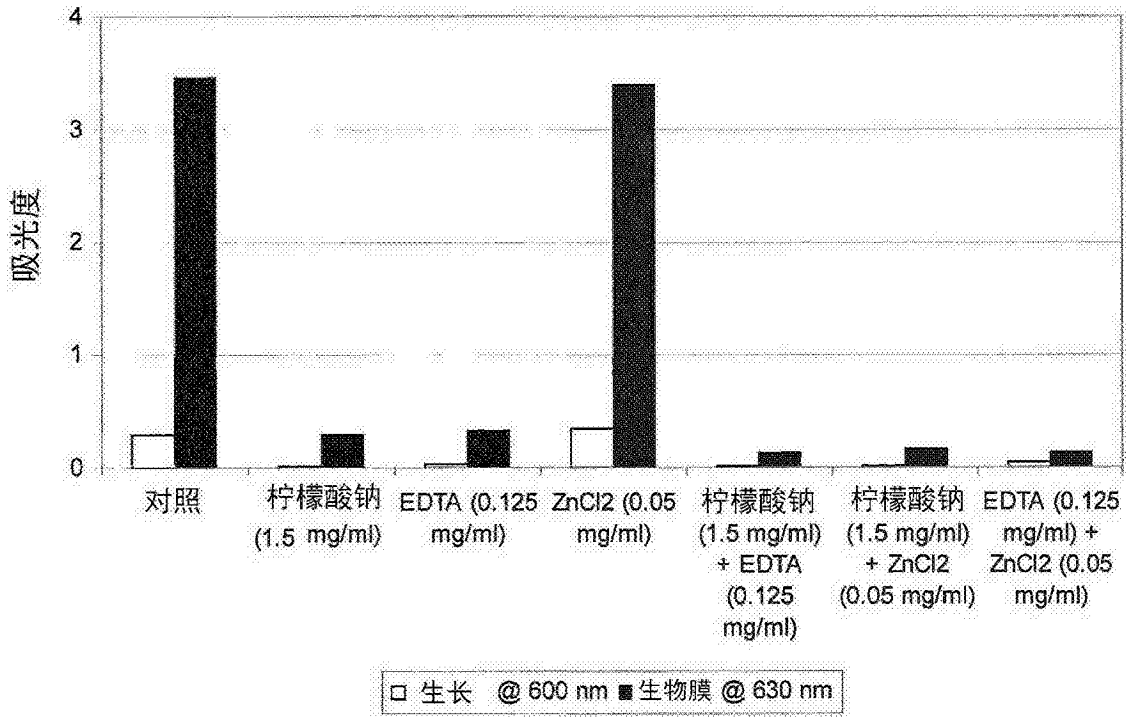


图 21

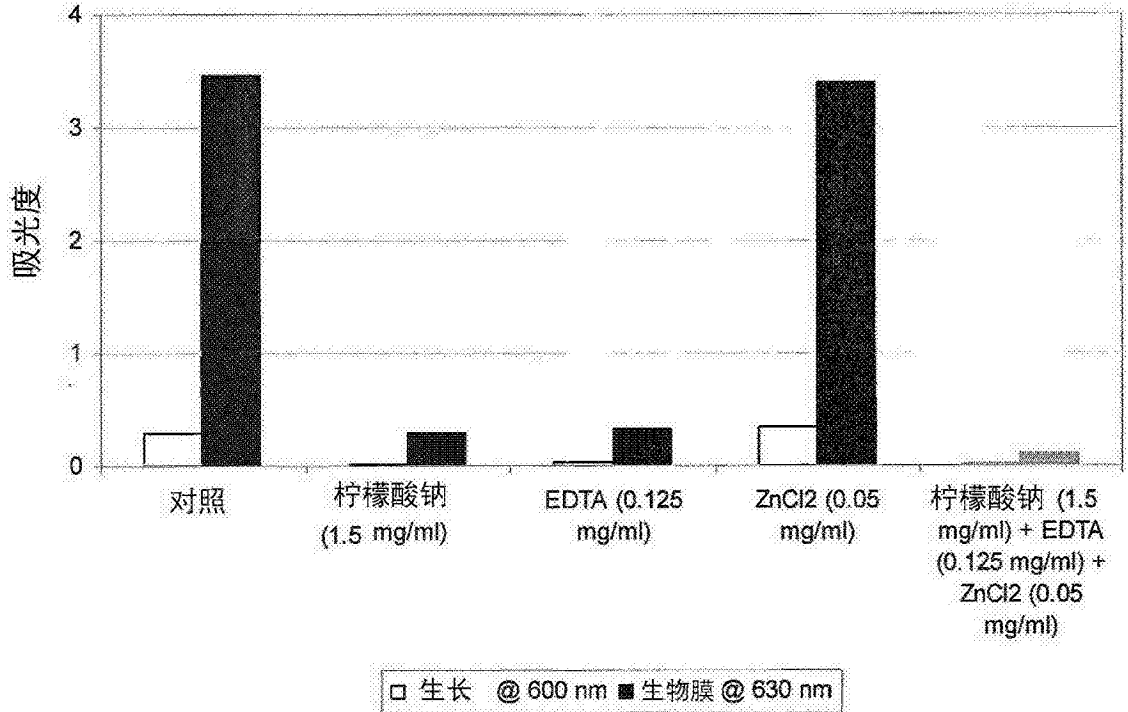


图 22