[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/74 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109596.9

[43] 公开日 2006 年 3 月 8 日

[11] 公开号 CN 1744905A

[22] 申请日 2003.12.10
[21] 申请号 200380109596.9
[30] 优先权
[32] 2002.12.10 [33] US [31] 60/432,182
[86] 国际申请 PCT/US2003/039479 2003.12.10
[87] 国际公布 WO2004/052308 英 2004.6.24
[85] 进入国家阶段日期 2005.8.9
[71] 申请人 百敖新纳斯有限公司
地址 美国马里兰州
[72] 发明人 S·M·威尔士 A·沙
J·J·蒙德

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 沙 捷

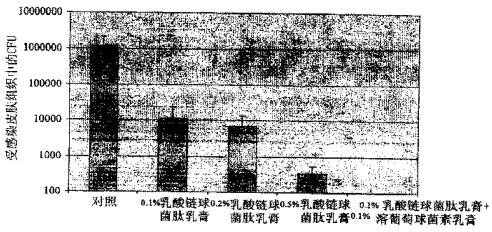
权利要求书 7 页 说明书 24 页 附图 8 页

[54] 发明名称

局部抗感染制剂

[57] 摘要

在药学上可接受的用于局部敷用的载体上包含有效量的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素的表面组合物。还公开了使用该局部组合物治疗皮肤或伤口感染的方法，包括但是不限于发生感染的擦伤、皮肤或表面切伤、烧伤或外科切口或褥疮。



1. 一种治疗皮肤或伤口感染的方法，包括在有需要的病人的感染部位敷用有效量的药学上可接受的用于局部敷用的载体上包含溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素的局部组合物。

2. 权利要求 1 所述的方法，包括对选自受感染的擦伤、皮肤或表面切伤、烧伤或外科切口或者褥疮的伤口感染进行治疗。

3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述局部组合物含有大约 0.10 至大约 10.0wt%的选自野生型溶葡萄球菌素，溶葡萄球菌素突变体、变体和断片，合成溶葡萄球菌素和重组溶葡萄球菌素的溶葡萄球菌素，并对葡萄球菌细胞壁肽聚糖中含五甘氨酸的桥具有蛋白水解活性。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述局部组合物含有大约 0.10 至大约 10.0wt%的一种或多种选自乳酸链球菌肽、枯草菌素、表皮素、gallidermin、肉桂霉素、耐久霉素、血管紧张肽转化酶抑制肽和 Pep 5 的羊毛硫抗生素。

5. 权利要求 4 所述的方法，其中所述局部组合物含有乳酸链球菌肽和表面活性剂、和/或螯合剂和/或香芹酚。

6. 权利要求 5 所述的方法，其中所述螯合剂包括 EDTA。

7. 权利要求 4 所述的方法，其中所述局部组合物含有重组乳酸链球菌肽变体。

8. 权利要求 4 所述的方法，其中所述局部组合物含有乳酸链球菌肽和溶葡萄球菌素。

9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述局部组合物除溶葡萄球菌素或羊毛硫抗生素外还进一步包括至少一种抗感染活性剂。

10. 权利要求 9 所述的方法，其中每一种抗感染活性剂或者抗菌酶均选自β-内酰胺、多粘菌素、糖肽、变溶菌素、溶菌酶、cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体和抗菌肽。

11. 权利要求 9 所述的方法，其中所述的局部组合物进一步含有杆菌肽和新霉素中的至少一种。

12. 权利要求 1 所述的方法，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是以喷雾、水雾、气溶胶、洗剂、乳膏、含水或非水溶液或液体、油、凝胶、软膏、糊剂、油膏、乳液或者悬浮液的形式。

13. 权利要求 12 所述的方法，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是水包油乳液基乳膏或者洗剂，所述乳膏或洗剂包括含有乙氧基化脂肪酸偏甘油酯的水相、含有硬脂的油相和乳化剂，所述乳化剂是水溶性聚合物在油相中的反相乳液。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中所述的水相含有选自 DMSO 和偏脂肪酸甘油酯的皮肤吸收促进剂。

15. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的局部组合物是含有以下成分的乳膏制剂：

大约 0.125 至大约 10wt%的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素；

大约 2 至大约 10 wt%的 SOFTISAN 378；

大约 0.25 大至约 3 wt%的 SOFTIGEN 767；

大约 2 至大约 8 wt%的 SEIGEL 305 或者 SIMUGEL 600；

0 至大约 10 wt% IMWITOR 308 和/或 IMWITOR 742；以及

大约 70 至大约 90 wt%水。

16. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的局部组合物涂覆在局部涂抹器的表面。

17. 一种局部组合物，其在药学上可接受的用于局部敷用的载体上含有有

效量的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素。

18. 权利要求 17 所述的局部组合物，其中所述溶葡萄球菌素或羊毛硫抗生素的量对于治疗皮肤感染或选自受感染的擦伤、皮肤或表面切伤、烧伤或外科切口或褥疮的受感染伤口是有效的。

19. 权利要求 17 所述的局部组合物，其含有大约 0.10 至大约 10.0 wt%的选自野生型溶葡萄球菌素，溶葡萄球菌素突变体、变体和断片，合成溶葡萄球菌素和重组溶葡萄球菌素的溶葡萄球菌素，并对葡萄球菌细胞壁肽聚糖中含五甘氨酸的桥具有蛋白水解活性。

20. 权利要求 17 所述的局部组合物，其含有大约 0.10 至大约 10.0wt%的一种或多种选自乳酸链球菌肽、枯草菌素、表皮素、gallidermin、肉桂霉素、耐久霉素、血管紧张肽转化酶抑制肽和 Pep 5 的羊毛硫抗生素。

21. 权利要求 20 的局部组合物，其含有乳酸链球菌肽，以及表面活性剂或螯合剂或香芹酚。

22. 权利要求 21 所述的局部组合物，其中所述的螯合剂是 EDTA。

23. 权利要求 20 所述的局部组合物，其含有重组乳酸链球菌肽变体。

24. 权利要求 20 所述的局部组合物，其含有溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽。

25. 权利要求 17 所述的局部组合物，其除了溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素外还进一步含有至少一种抗感染活性剂。

26. 权利要求 25 所述的局部组合物，其中每一种抗感染活性剂均选自β-内酰胺、多粘菌素、糖肽、变溶菌素、溶解酶、cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体和抗菌肽。

27. 权利要求 25 所述的局部组合物，其中所述的抗感染活性剂包括杆菌肽和新霉素中的至少一种。

28. 权利要求 17 所述的局部组合物，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是喷雾、水雾、气溶胶、洗剂、乳膏、含水或非水溶液或液体、油、凝胶、软膏、糊剂、油膏、乳液或者悬浮液的形式。

29. 权利要求 28 所述的局部组合物，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是水包油乳液基乳膏或者洗剂，所述乳膏或洗剂包括含有乙氧基化脂肪酸偏甘油酯的水相、含有硬脂的油相和乳化剂，所述乳化剂是水溶性聚合物在油相中的反相乳液。

30. 权利要求 29 所述的局部组合物，其中所述的水相含有选自 DMSO 和偏脂肪酸甘油酯的皮肤吸收促进剂。

31. 权利要求 17 所述的局部组合物，其是含有以下成分的局部乳膏形式：
大约 0.125 至大约 10wt%的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素；
大约 2 至大约 10 wt%的 SOFTISAN 378；
大约 0.25 至大约 3 wt%的 SOFTIGEN 767；
大约 2 至大约 8 wt% SEIGEL 305 或者 SIMUGEL 600；
0 至大约 10 wt% IMWITOR 308 和/或 IMWITOR 742；和
大约 70 至大约 90 wt%水。

32. 权利要求 17 所述的局部组合物，其涂覆在局部涂抹器的表面。

33. 一种对皮肤病原体种群进行去移殖的方法，包括对有需要的病人在其需要进行去移殖的部位局部敷用有效量的权利要求 17 所述的局部组合物。

34. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的局部组合物含有大约 0.10 至大约 10.0wt%的选自野生型溶葡萄球菌素，溶葡萄球菌素突变体、变体和断片，合成溶葡萄球菌素和重组溶葡萄球菌素的溶葡萄球菌素，并且对葡萄球菌细胞壁肽聚糖中含五甘氨酸的桥具有蛋白水解活性。

35. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的局部组合物含有大约 0.10 至大约 10.0wt%的一种或多种选自乳酸链球菌肽、枯草菌素、表皮素、gallidermin、肉桂霉素、耐久霉素、血管紧张肽转化酶抑制肽和 Pep 5 的羊毛硫抗生素。

36. 权利要求 35 所述的方法，其中所述的局部组合物含有乳酸链球菌肽，以及表面活性剂或螯合剂或香芹酚。

37. 权利要求 36 所述的方法，其中所述的螯合剂包括 EDTA。

38. 权利要求 35 所述的方法，其中所述的局部组合物含有重组乳酸链球菌肽变体。

39. 权利要求 35 所述的方法，其中所述的局部组合物进一步含有溶葡萄球菌素。

40. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的局部组合物除了溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素外进一步包括至少一种选自β-内酰胺、多粘菌素、糖肽、变溶菌素、溶解酶、cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体和抗菌肽的抗感染活性剂。

41. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的局部组合物进一步包括杆菌肽和新霉素中的至少一种。

42. 权利要求 33 所述的方法，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是以喷雾、水雾、气溶胶、洗剂、乳膏、含水或非水溶液或液体、油、凝胶、软膏、糊剂、油膏、乳液或者悬浮液的形式。

43. 权利要求 42 所述的方法，其中所述药学上可接受的用于局部敷用的载体是水包油乳液基乳膏或者洗剂，所述乳膏或洗剂包括含有乙氧基化脂肪酸偏甘油酯的水相、含有硬脂的油相和乳化剂，所述乳化剂是水溶性聚合物在油相中的反相乳液。

44. 权利要求 43 所述的方法，其中所述的水相含有选自 DMSO 和偏脂肪

酸甘油酯的皮肤吸收促进剂。

45. 权利要求 33 所述的方法，其中所述局部组合物是含有以下成分的乳膏制剂：

大约 0.125 至大约 10wt%的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素；

大约 2 至大约 10 wt%的 SOFTISAN 378；

大约 0.25 至大约 3 wt%的 SOFTIGEN 767；

大约 2 至大约 8 wt% 的 SEIGEL 305 或者 SIMUGEL 600；

0 至大约 10 wt% 的 IMWITOR 308 和/或 IMWITOR 742；以及

大约 70 至大约 90 wt%水。

46. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的局部组合物涂覆在局部涂抹器的表面上。

47. 一种水包油乳液基局部乳膏或洗剂组合物，其包括含有乙氧基化脂肪酸偏甘油酯的水相、含有硬脂的油相、乳化剂和在所述水相或者所述油相中的有效量的一种或多种抗感染活性剂，所述乳化剂是水溶性聚合物在水中的反相乳液。

48. 权利要求 47 所述的局部组合物，其中所述的水相含有选自 DMSO 和偏脂肪酸甘油酯的皮肤吸收促进剂。

49. 权利要求 47 所述的局部组合物，其涂覆在局部涂抹器的表面。

50. 权利要求 47 所述的局部组合物，其中所述乳化剂是聚丙烯酰胺在液体石蜡中的反相乳液。

51. 权利要求 47 所述的局部组合物，其中至少一种抗感染活性剂选自β-内酰胺、多粘菌素、糖肽、变溶菌素、溶解酶、cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体和抗菌肽。

52. 权利要求 47 所述的局部组合物，其中每一种抗感染活性剂都是选自溶

葡萄球菌素、羊毛硫抗生素、杆菌肽和新霉素。

53. 权利要求 51 所述的局部组合物，其中所述抗感染活性剂含有溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽。

54. 权利要求 47 所述的局部组合物，其是含有以下成分的局部乳膏形式，其中所述局部组合物是含有以下成分的乳膏制剂：

大约 0.125 至大约 10wt%的溶葡萄球菌素和/或一种或多种羊毛硫抗生素；

大约 2 至大约 10 wt%的 SOFTISAN 378；

大约 0.25 至大约 3 wt%的 SOFTIGEN 767；

大约 2 至大约 8 wt% 的 SEIGEL 305 或者 SIMUGEL 600；

0 至大约 10 wt% 的 IMWITOR 308 和/或 IMWITOR 742；和

大约 70 至大约 90 wt%水。

局部抗感染制剂

背景技术

细菌性皮肤和伤口感染是一个重大的问题，尤其是在公共场合，如医院、疗养院、学校(尤其是运动员更衣室)和医务室。高风险个体包括婴儿、老人、接受住院或者门诊侵袭性治疗的人(基本上包括离开医院前的任何病人)、患有各种易导致皮肤感染的疾病(包括存在外来物体、免疫减弱、免疫抑制)的人、恢复期病人和需要经常住院的慢性病人。在非人类病人中，有危险的个体包括动物园的动物、畜群和近距离饲养的动物(例如养在兽舍中的动物和厩养动物)，包括但是不限于猪、牛、绵羊、山羊等。

这些个体处于皮肤或伤口上的感染蔓延到其他器官系统中或者以另外的形式损伤其它器官系统的高风险中。此外，耐复合药物病原体菌株的出现增加了这种担心，需要及时地阻断和治疗这种感染。仅仅在美国，每年就有大约 14,000 人感染并死于在医院获得的耐药微生物感染(这种感染经常是从皮肤或伤口感染开始的)。在全球，多达 60% 的医院获得性感染(hospital-acquired infection)是由于耐药微生物引起的。

感染源经常是个体自身的皮肤菌群，或者是公共场合中其它个体的皮肤菌群。因此，如果进行适当的局部预防性治疗以便对那些进入曾出现感染情况的公共场合的人的皮肤菌群进行去移殖(decolonize)，就能明显降低感染的发病率。期望一旦确定去移殖配方(decolonizing formulation)，其对于治疗伤口和皮肤感染也有效。

金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌是在原发和继发性皮肤感染中最频繁遇到的病原体。在清除这些感染方面，例如莫匹罗星膏和新霉素之类的局部抗生素经常无效，而越来越流行的耐复合药物细菌进一步降低了传统抗生素的有效性。

金黄色葡萄球菌是高度致命的人类病原体。其是范围由局部皮肤感染到危及生命的菌血症和生命器官感染的多种人类疾病的诱因。如果不

果不迅速控制，金黄色葡萄球菌能够迅速地从初始感染部位蔓延到其它器官。虽然感染的焦点可能是不明显的，特别易受感染的器官包括心脏瓣膜、肾、肺、骨、脑脊膜和烧伤病人的皮肤。

铜绿假单胞菌是在原发和继发性皮肤感染中最经常遇到的病原体之一。感染通常来自被污染的水和溶液。感染的类型包括“游泳耳(swimmer's ear)”(被污染的池水)，眼睛(接触晶状体的溶液)，儿童的骨髓炎(铁钉刺穿运动鞋)，以及医院内的呼吸道、泌尿和伤口(尤其是烧伤)感染。

溶葡萄球菌素是最初由模仿葡萄球菌(原来称为 S. staphylolyticus)中鉴别出的有效抗菌剂。溶葡萄球菌素是一种细菌性肽链内切酶，能够分解葡萄球菌的细胞壁中特有的交联多聚甘氨酸桥，因此对葡萄球菌是高度致命的。用单一多肽链表达，溶葡萄球菌素的分子量大约为27kDa。

金黄色葡萄球菌(一种凝固酶阳性的葡萄球菌)的细胞壁桥，含有高比例的甘氨酸，因此溶葡萄球菌素对于溶解金黄色葡萄球菌特别有效。还证实了溶葡萄球菌素具有溶解表皮葡萄球菌和其它葡萄球菌菌株的能力。

Climo 等人的美国专利第 6,028,051 号公开了一种治疗葡萄球菌疾病的方法。治疗中每千克体重使用至少 50 毫克的溶葡萄球菌素，优选 100 毫克。相对高剂量的溶葡萄球菌素能够以单一剂量进行治疗或者以多剂量进行治疗。可以单独使用溶葡萄球菌素或者与另外的抗菌剂联用。该“051”号专利还公开了溶葡萄球菌素基因的克隆和测序为性质与野生型溶葡萄球菌素相似或者不同的溶葡萄球菌素的变种形式的分离提供了可能。

O'Callaghan 的美国专利第 6,315,996 号公开了使用溶葡萄球菌素作为有效抗生素对葡萄球菌角膜感染进行局部治疗的方法。Blackburn 等人的美国专利第 5,760,026 号公开了使用溶葡萄球菌素拭抹以消除和治疗葡萄球菌感染的方法，包括通过乳房注入剂治疗乳腺炎。该方法可用于奶牛。

羊毛硫抗生素(lantibiotic)是成孔羊毛硫氨酸(pore-forming lanthionines)，其与螯合剂或非离子表面活性剂联用对革兰氏阳性有机

体和革兰氏阴性有机体均显示出有效的杀菌活性。羊毛硫抗生素是由细菌产生的一组抗菌肽，其特征在于翻译后的修饰导致丝氨酸和苏氨酸残基脱水并且导致在肽链上形成羊毛硫氨酸环的分子内硫醚桥结构(羊毛硫氨酸和β-甲基羊毛硫氨酸)形成。羊毛硫抗生素作为食品防腐剂的天然效用已经被人们在发酵产品中使用了几个世纪了，例如酸奶、干酪、泡菜、发酵鱼等。2.5wt%的羊毛硫抗生素 Nisaplin™ 制剂已经作为工业食品防腐剂在世界范围内销售了 50 年以上。

乳酸链球菌肽(nisin)是最有特色和最广泛使用的羊毛硫抗生素。其是通过特定的乳酸菌(原来称为乳酸链球菌(Streptococcus lactis))菌株生产的具有 5 个羊毛硫氨酸环结构的 32 个氨基酸的 3.4kDa 阳离子肽。乳酸链球菌肽的杀菌活性与硫醚桥所产生的环以及脱氢残基有关。乳酸链球菌肽对于革兰氏阳性菌具有广谱杀菌性，相信这归因于以下的至少四种作用方式的结合：

(ⅰ)在膜上形成允许电解质和小代谢物通过的孔，破坏细胞的渗透压调节和能量代谢；

(ⅱ)阻止用于细胞壁构造的有效肽聚糖装配，以至于使细菌细胞不能为了进行分裂和繁殖而装配新鲜细胞壁结构；以及

(iii)与产芽孢细菌的芽孢外壳相互作用以便阻止发芽过程的完成。

前述各项均独立地导致细胞死亡。

虽然单独的乳酸链球菌肽的杀菌活性限于革兰氏阳性有机体，乳酸链球菌肽与例如 EDTA 的螯合剂或例如吐温 20 的非离子表面活性剂联用显示出对以大肠杆菌为代表的革兰氏阴性有机体的有效杀菌活性。乳酸链球菌肽杀菌迅速，对于给定目标有机体其最小杀菌浓度(MBC)值通常与最小抑制浓度(MIC)相等或是其两倍。

美国专利第 5,691,301 号和 5,753,614 号公开了当与螯合剂联用时对于革兰氏阴性菌具有广谱杀菌活性的乳酸链球菌肽和其它羊毛硫抗生素。美国专利第 5,762,948 号公开了乳酸链球菌肽和其它羊毛硫抗生素在奶牛乳腺炎预防中的用途。美国专利第 5,804,549 号公开了乳酸链球菌肽在治疗螺旋状弯曲杆菌胃肠感染中的用途。美国专利第 5,866,539 号和 5,910,479 号公开了对葡萄球菌属、链球菌属和肠球菌属细菌具有杀菌活性的肠胃外给药和皮下给药的乳酸链球菌肽和其它羊

毛硫抗生素的制剂。美国专利第 5,985,823 号公开了乳酸链球菌肽和其它羊毛硫抗生素在治疗难辨梭状芽孢杆菌结肠感染中的用途。

由于皮肤菌群之间脆弱的平衡，对皮肤进行去移殖以预防感染和对皮肤和伤口感染的现有病症进行治疗仍然特别具有挑战性。如果这一平衡受到干扰，皮肤菌群的病原体将不成比例地以耐药形式再度出现，例如，用对病原体缺乏有效性的制剂进行治疗，特别是如果这种制剂对于非病原体更加有效。已经证实，在过去已系统地显示出希望或在体外试验中抗病原体的很多小分子抗生素，当其被配制用于皮肤局部敷用时不适合去移殖或对皮肤或伤口感染进行治疗。仍然需要能够对皮肤进行去移殖以防止病原体感染并且能够对皮肤和伤口感染的现有病症进行治疗的有效局部制剂。

发明内容

本发明满足了这种需要。现在已经发现可以由溶葡萄球菌素和例如乳酸链球菌肽的羊毛硫抗生素制备局部制剂，该局部制剂在皮肤病感染和伤口感染的治疗中是有效的，同时不会将皮肤菌群的非病原体和病原体种群间的平衡扰乱到引起耐药病原体菌株出现的程度。适于进行治疗的感染伤口包括但不限于感染的皮肤擦伤、皮肤或表面切伤、烧伤和外科切口以及褥疮。

因此，根据本发明的一个方面，提供了一种在药学上可接受的用于局部敷用的载体上包含有效量的溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素的局部抗感染组合物。根据一个具体实施方式，溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素的量对皮肤或伤口感染的治疗有效。

局部组合物的形式可以是喷雾、水雾(mist)、气溶胶、洗剂、乳膏、含水或非水溶液或者液体、油、凝胶、粉末、软膏、糊剂、油膏、乳剂、悬浮液等，其可以任选地涂在例如绷带、药签、湿润的纺或无纺拭子等的局部涂药器的表面上。已经发现本发明的局部乳膏制剂具有良好的皮肤适应性，促进伤口愈合，独立地具有杀菌活性并且使抗感染活化剂的活性增强。然而，本发明不限于局部敷用乳膏。基本上任何适用于局部敷用的药物载体制剂都在本发明的范围之中。

已经发现当溶葡萄球菌素和例如乳酸链球菌肽的羊毛硫抗生素联用时产生协同效应。也就是说，已经发现乳酸链球菌肽和溶葡萄球菌素对葡萄球菌的分抑制浓度(Fractional Inhibitory Concentration)低于根据已知的两种抗生素单独作用于葡萄球菌的 MIC 所预想的联用制剂中各抗生素贡献的对葡萄球菌的 MIC。因此，本发明的局部抗感染组合物包括包含溶葡萄球菌素和一种或多种例如乳酸链球菌肽的羊毛硫抗生素的具体实施方式。

因为含有单独或联用的溶葡萄球菌素或乳酸链球菌肽的本发明的局部组合物在对皮肤病原体种群的去移殖中以及对皮肤和伤口感染的治疗中是有效的，本发明的另一方面提供了本发明组合物的使用方法。根据一个具体实施方式，提供了一种通过给有需要的病人在其感染部位敷用有效量的本发明的局部组合物从而对皮肤和伤口感染进行治疗的方法，该局部组合物含有有效治疗皮肤或伤口感染量的溶葡萄球菌素或者一种或多种羊毛硫抗生素。根据另一个具体实施方式，提供了一种通过给有需要的病人在需要进行去移殖的部位敷用有效量的本发明的局部组合物从而对皮肤病原体种群进行去移殖的方法，该组合物含有有效地对皮肤表面病原体种群进行去移殖的量的溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素。

根据任一具体实施方式的方法包括联用溶葡萄球菌素和一种或多种羊毛硫抗生素的方法，其中包括联用溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽的方法。本发明的局部抗感染组合物的使用显示了对皮肤病原体种群进行去移殖直到根除并且在迄今未知的更长时间内阻碍继发性重移殖(re-colonization)的明显能力。因此本发明的局部抗感染组合物有助于在医院中以及在大多数公众中对医院获得性细菌菌株的传播进行抑制。

虽然本发明不限于局部乳膏或洗剂制剂，本发明的另一方面提供了具有良好皮肤适应性、促进伤口愈合、独立地具有杀菌活性并且使抗感染活性剂的活性增强的局部乳膏或洗剂制剂。根据本发明的这一方面，提供了抗感染局部乳膏或洗剂制剂，其是一种水包油的乳液，其水相中含有乙氧基化的脂肪酸偏甘油酯，油相中含有硬脂、抗感染活性成分和乳化剂，该乳化剂是水溶性聚合物在油相中的反相乳液。

该乳剂制剂非常适合与溶葡萄球菌素和羊毛硫抗生素一起使用，因为其在不使这些蛋白质变性的条件下乳化。

尽管采用局部释放的形式，本发明的组合物和治疗方法减少了皮肤感染的扩散，从而在普遍人群中降低了总感染率。由于耐复合药物菌株的出现，公众中感染的总体降低是重要的。新感染数目的降低又使新耐药菌株出现的速率降低。可以通过参考优选实施方式和权利要求的详细说明获得本发明更完整的评价和很多其它预计优点，优选实施方式和权利要求公开了本发明的原理和当前其预计最佳实施方式。

附图说明

图 1A 显示了本发明的局部乳膏制剂中溶葡萄球菌素在皮肤感染模型中对金黄色葡萄球菌的功效。

图 1B 显示了本发明的局部乳膏制剂中乳酸链球菌肽在皮肤感染模型中对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的功效。

图 2 显示了本发明的溶葡萄球菌素乳膏在金黄色葡萄球菌皮肤感染模型中的剂量-响应性质，还显示了没有溶葡萄球菌素时该乳膏的独立杀菌活性。

图 3 在金黄色葡萄球菌皮肤感染模型中对本发明的溶葡萄球菌素局部乳膏和安慰剂乳膏进行了比较。

图 4 描绘了皮肤感染模型中本发明的乳酸链球菌肽局部乳膏的剂量-响应性质和当在本发明的局部乳膏中联用乳酸链球菌肽和溶葡萄球菌素时所发生的协同结果。

图 5 描绘了本发明的乳酸链球菌肽局部乳膏在皮肤感染模型中对铜绿假单胞菌的功效，以及当向制剂中加入 EDTA 时的这一功效的增强。

图 6 描绘了根据本发明配制的不含抗感染剂的局部乳膏基在皮肤移殖模型中对金黄色葡萄球菌的功效，以及向该制剂中加入 DMSO 引起的这一功效的增强。

图 7 描绘了当向乳膏中添加其他吸收促进剂时，根据本发明配制的不含试剂的局部乳膏制剂在皮肤移殖模型中的功效。

图 8 描绘了本发明的乳酸链球菌肽局部乳膏在皮肤移殖模型中对金黄色葡萄球菌的剂量-响应性质。

具体实施方式

本发明提供了含有溶葡萄球菌素或者例如乳酸链球菌肽的羊毛硫抗生素的局部杀菌组合物。本发明的组合物通过溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素的活性可用于在预防和治疗由任何易侵袭的细菌所引起的伤口和皮肤感染。皮肤感染可以是原发的或继发的。通过局部敷用本发明的组合物以便对皮肤病原体种群进行去移殖从而达到预防的作用。

这里使用的术语“溶葡萄球菌素”，包括任何在活体外或在活体内对葡萄球菌细胞壁肽聚糖中的含五甘氨酸的桥具有蛋白分解活性的酶或者抗葡萄球菌剂。本发明范围内的溶葡萄球菌素包括：野生型溶葡萄球菌素和相关蛋白质或者抗葡萄球菌剂、溶葡萄球菌素突变体、变体、完全合成及部分合成的溶葡萄球菌素、以及重组表达的溶葡萄球菌素蛋白。溶葡萄球菌素变体可以通过蛋白质的翻译后加工而产生(或者通过产生者菌株中存在的酶或者通过在加工的任何阶段中引入的酶或者试剂，或者通过结构基因的突变)。突变可以包括位点缺失、插入、位点突变、区域去除和置换突变。溶葡萄球菌素包括，例如，从模仿葡萄球菌、Ambicin L 中提纯的溶葡萄球菌素(球形芽孢杆菌生产的重组溶葡萄球菌素，可由纽约州的 Nutrition 21(从前的 AMBI)购买获得)，以及从乳酸菌表达系统或大肠杆菌表达系统中提纯的成熟溶葡萄球菌素，以及在共同未决的和共同拥有的 WO 03/82124 中列出的截短的溶葡萄球菌素，在此专门引入作为参考。

重组溶葡萄球菌素有较大的比活性，即每体积制剂中的活性量。溶葡萄球菌素是通过作为酶原的细菌自然产生的，该酶原随后被原形加工生成成熟蛋白质。当溶葡萄球菌素从细菌中分离时，活性形式和活性较低的酶原形式均存在于所得制剂中。酶原形式的活性比成熟活性形式的活性大约低 4 倍。自然产生的溶葡萄球菌素的活性形式又包括多肽的异种混合物。这种异种性是由于溶葡萄球菌素酶原的蛋白分解过程。这种蛋白溶解过程在全长溶葡萄球菌素的 N-末端附近的许多

个不同位点上发生并导致最终的活性溶葡萄球菌素分子的异种混合。这种变异性在源自天然来源的溶葡萄球菌素制剂中可以不同。

较小活性形式的溶葡萄球菌素的存在稀释了制剂中活性溶葡萄球菌素的浓度，该浓度通过酶原的存在进一步被稀释，从而降低了含有天然衍生的溶葡萄球菌素制剂的比活性。相反，重组溶葡萄球菌素制剂含有单一的完全活性形式的溶葡萄球菌素。在这种制剂中，不存在较小活性形式的溶葡萄球菌素或者酶原来稀释成熟形式的溶葡萄球菌素的活性。因此，含有重组溶葡萄球菌素的局部抗感染组合物与其自然衍生的对应物相比具有较高的比活性。

羊毛硫抗生素属于含有羊毛硫氨酸环的肽细菌素类。除了乳酸链球菌肽之外，该类中还包含枯草杆菌素、表皮素、gallidermin、肉桂霉素、耐久霉素、血管紧张肽转化酶抑制肽和 Pep 5。这些羊毛硫抗生素中的每一个都是通过不同的微生物产生的。然而，已经发现从枯草芽孢杆菌的某些菌种中得到的枯草菌素和从表皮葡萄球菌的某些菌种中得到的表皮素具有与乳酸链球菌肽非常相似的分子结构。由于分子相似性，其它羊毛硫抗生素作为抗感染剂将具有与乳酸链球菌肽相等的功效。因而，这里用的术语“羊毛硫抗生素”包括任何具有对细菌细胞壁所必需的肽聚糖装配进行抑制的能力或具有在细菌细胞膜上形成破裂孔的能力的含羊毛硫氨酸的细菌素，不管是天然细菌源或者其是否通过重组产生。

本发明范围内的羊毛硫抗生素包括野生型羊毛硫抗生素及其突变体和变体、完全合成及部分合成的羊毛硫抗生素、以及重组表达的羊毛硫抗生素。与溶葡萄球菌素一样，变体可以通过翻译后蛋白质加工或者通过结构基因突变产生。突变包括位点缺失、插入、位点突变、区域去除和置换突变。例如，乳酸链球菌肽包括从乳酸乳杆菌、Amibicin N 提纯的天然乳酸链球菌肽(可从 Nutrition 21 得到的乳酸链球菌肽的提纯形式)，以及成熟的或者变异的重组乳酸链球菌肽，例如通过用可从 NIZO Food Research(NIZO 食品研究中心)(荷兰)获得的极性较小的残基置换赖氨酸而产生的超过 20 种变体，包括乳酸链球菌肽变体 H27K 和 H31K。

乳酸链球菌肽的杀菌活性通常限于革兰氏阳性有机体。然而，当乳酸链球菌肽与螯合剂一起配制时，其也显示出对革兰氏阴性菌的有效杀菌活性。因此本发明的乳酸链球菌肽局部制剂也包括含有浓度为大约 1 至大约 5mM、最高可达 10mM 的螯合剂(例如 EDTA)的具体实施方式。

乳酸链球菌肽的活性也可以通过与浓度低至 0.01wt%的非离子表面活性剂一起配置而增强。适于用于本发明的非离子表面活性剂的例子包括甘油单月桂酸酯、蔗糖酯(例如蔗糖棕榈酸酯)、聚山梨醇酯 20、TRITON X100、Isoceteth-20、ARLASOLVE 200L、月桂基氧化胺、 聚癸葡萄糖、Phospholipid PTC、MEROXAPOL 105 等。因此本发明的乳酸链球菌肽制剂可以任选地含有大约 0.01 到大约 5.00wt%的非离子表面活性剂。

乳酸链球菌肽的活性还通过香芹酚(2-p-香荆芥酚) 而增强，香芹酚是一种从牛至和百里香中提取的精油，其也可以通过合成生产。香芹酚被 FDA 批准作为一种香料物质。因此本发明的乳酸链球菌肽制剂也可以任选地含有浓度为大约 0.025 到约 3.0mM 的香芹酚。

本发明组合物局部给药的剂型包括能够进行局部敷用并且甚至允许敷涂在皮肤和粘膜表面上并被其吸收的各种混合物和组合物。例子包括喷雾、水雾、气溶胶、洗剂、乳膏、水和非水溶液或液体、油、凝胶、粉末、软膏、糊剂、油膏、乳剂和悬浮液。溶葡萄球菌素或羊毛硫抗生素能够在无菌条件下与药妆品学上或药物学上可接受的载体以及任何可能需要的赋形剂、缓冲液或者推进剂(propellant)进行混合。可以通过将溶葡萄球菌素或者羊毛硫抗生素与在局部干燥、液体、乳膏和气溶胶制剂中普遍使用的药物或者药妆品稀释剂或者载体结合而制备。液体和粉末都能作为喷雾、水雾或者气溶胶释放。本发明包括病人专用的剂型和非病人专用的多个剂型，后者可以用于对暴露在例如生物恐怖袭击引起的炭疽(已经证实乳酸链球菌肽对其有活性)的病原体中的人群进行消毒。

粉末可以借助于任何合适的粉末基物形成，例如滑石、乳糖、淀粉等等。溶液可以用含水或非水基物配制，还可以包括一种或多种分散剂、悬浮剂、增溶剂等。局部凝胶使用分子量和浓度水平可以有效

地形成溶葡萄球菌素或者乳酸链球菌肽的含水或非水溶液或悬浮液的粘性溶液或胶态凝胶来制备。可以用于制备局部凝胶的聚合物包括多磷酸酯、聚乙二醇、高分子量聚乳酸、羟丙基纤维素、壳聚糖、聚苯乙烯磺酸酯等。已经发现壳聚糖使乳酸链球菌肽的溶解度增加，因此预期其将使其它羊毛硫抗生素的溶解度增加。

软膏、乳膏和洗剂是用，例如，用水性或油性基物并加入合适的增稠剂、胶凝剂、乳化剂、分散剂、悬浮剂或者稠度调节剂等而制备的。基物包括水、醇或者油，例如液体石蜡、矿物油或者例如花生油或蓖麻油的蔬菜油。可以根据基物性质使用的增稠剂包括软石蜡、硬脂酸铝、十八十六醇、丙二醇、聚乙二醇、多磷酸酯、聚乳酸、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、纤维素胶、丙烯酸酯聚合物、亲水性胶凝剂、壳聚糖、聚苯乙烯磺酸酯、凡士林、羊毛脂、氢化羊毛脂、蜂蜡等。

软膏、糊剂、乳膏、凝胶和洗剂还可以含有赋形剂，例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、聚硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石、氧化锌及其混合物。粉末和喷雾也可以含有赋形剂，例如硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。溶液、悬浮液或者分散体可以通过任何通常用于制备局部敷用气溶胶的已知方法转变成气溶胶。通常，这样的方法包括通常用惰性载气并且使增压的气体通过小孔以便对溶液、悬浮液或分散体的容器进行加压或者提供对其进行加压的方法。喷雾和气溶胶也可以含有通常的推进剂，例如氯氟烃或者挥发性未取代烃，例如丁烷和丙烷。

赋形剂包括促进皮肤吸收的化合物，例如二甲亚砜(DMSO)、脂肪酸偏甘油酯等，其所存在的含量可达配方总重的大约 10wt%。脂肪酸偏甘油酯的例子包括但不限于，可从德克萨斯州休斯顿德 SASOL 北美公司得到的 IMWITOR 742 和 IMWITOR 308。局部制剂也可以任选地包括非活性成分以便改进化妆品可接受性，这些成分包括但不限于保湿剂、表面活性剂、香味剂、着色剂、润肤剂、填料等。

局部组合物还可以包括其它抗感染剂，其例子包括杆菌肽，新霉素，多粘菌素，β-内酰胺，包括青霉素、甲氧苯青霉素、羟羧氧酰胺

菌素和头孢菌素，例如头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢孟多酯钠、头孢唑啉、头孢克肟、头孢美唑、cefonioid、头孢哌酮、头孢雷特、cefotanme、头孢噻肟、头孢替坦、头孢西丁、头孢泊肟酯、头孢他啶、头孢唑肟、头孢三嗪(ceftriaxone)、头孢曲松(cefriaxone)、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢菌素 C、头孢菌素 C 钠盐、头孢噻吩、头孢噻吩钠盐、头孢噻吩二水合物、头孢匹林、头孢拉定、头孢呋辛酯、氯碳头孢等，糖肽，抗菌酶，包括抗葡萄球菌酶，例如变溶菌素、溶菌酶、或者 cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体剂，以及其它抗菌肽，例如防御素。基本上任何在进行局部敷用时有效的抗感染剂都可以使用。因此，本发明治疗活性感染和对皮肤病原体种群进行去移殖的方法均包括单独或联合使用溶葡萄球菌素或者一种或多种乳酸链球菌肽，同时不加入其它抗感染剂或者加入至少一种其它抗感染剂的方法。

局部组合物可以通过撒粉末，喷洒气溶胶或者用病人或者保健人员的指尖或者用其它常规的方法(例如药签或者拭子)在所需皮肤区域上涂抹形成软膏、乳膏、洗剂、溶液或者凝胶的膜而进行直接给药。该产品可以首先涂敷到皮肤上，然后用指尖或涂抹器进行涂抹，或者涂敷到指尖上然后在皮肤上涂抹。该组合物也可以任选地首先涂覆在局部敷用器的表面，例如绷带、药签、湿的纺或无纺拭子等，然后涂敷到皮肤部位以接受组合物。

本发明的局部组合物可以用基础配方配制，该基础配方在所使用的成分、其数量以及制备方法方面，对于本领域普通技术人员来说基本上是常规的，所有这些均不需要进一步说明。本发明的局部组合物也可以根据迄今为止的乳液配方制备为乳膏或者洗剂，其除了具有良好的皮肤适应性和伤口愈合性能外还具有迄今为止难以实现的杀菌活性，特别适用于具有抗感染活性成分的制剂。

本发明的具有独立杀菌活性的乳液是水相、油相和乳化剂(其是水溶性聚合物在油相中的反相乳液)的水包油乳液，其可以作为抗感染局部乳膏或者洗剂基物。制备根据本发明这个实施方式的抗感染局部制剂是通过向杀菌乳液中加入抗感染活性成分。本发明的这个实施方式不限于使用溶葡萄球菌素或者例如乳酸链球菌肽的羊毛硫抗生素作为活性成分。本发明的独立杀菌的乳液将会使基本上任何在局部敷用时

有效的抗感染活性成分的活性增强，同时促进伤口愈合，另外显示良好的皮肤适应性。不仅乳液的杀菌活性是意想不到的。本发明的乳液也出乎预料地使抗感染剂的活性增强到超过了由乳液活性和抗感染剂的活性预计的贡献。

除了溶葡萄球菌素和羊毛硫抗生素之外，用于与本发明的独立杀菌乳液一起配制局部乳膏或者洗剂的抗感染活性成分包括其它抗感染活性剂，例如杆菌肽，新霉素，多粘菌素，β-内酰胺，包括青霉素、甲氧苯青霉素、羟羧氧酰胺菌素和头孢菌素，例如头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢孟多酯钠、头孢唑啉、头孢克肟、头孢美唑、cefonioid、头孢哌酮、头孢雷特、cefotanme、头孢噻肟、头孢替坦、头孢西丁、头孢泊肟酯、头孢他啶、头孢唑肟、头孢三嗪、头孢曲松、头孢呋辛、头孢氨苄、头孢菌素 C、头孢菌素 C 钠盐、头孢噻吩、头孢噻吩钠盐、头孢噻吩二水合物、头孢匹林、头孢拉定、头孢呋辛脂、氯碳头孢等，糖肽，抗菌酶，包括抗葡萄球菌酶，例如变溶菌素、溶菌酶、或者 cellozyl 胞壁质酶、抗菌抗体，以及其它抗菌肽，例如防御素，以及任何其它在局部敷用时有效的抗感染剂。本发明包括以上列出的抗感染剂的所有可能的多元组合。

使用反相乳液作为乳化剂允许在不会使对热和剪切敏感的抗感染剂(例如溶葡萄球菌素和羊毛硫抗生素)降解或变性的低温和低剪切条件下配制局部乳膏和洗剂。当被加入到水中时，乳化剂反向释放出水溶性聚合物，从而形成乳膏或洗剂的聚合凝胶基物，以使作为乳膏或洗剂基物的水包油乳液稳定。

合适的乳化剂是 SEPIGEL305(新泽西州费尔菲尔德的 Seppic 公司)，其是聚丙烯酰胺在液体石蜡中的反相乳液。SIMUGEL 600(Seppic 公司)也可以使用，其是聚丙烯酰胺的反相乳液。杀菌局部乳膏制剂将含有大约 2 至大约 8wt.%的反相乳液作为乳化剂，更通常含有大约 3 至大约 5 wt.%。杀菌局部洗剂制剂将含有大约 1 至大约 10 wt.%的反相乳液作为乳化剂，更通常含有大约 3 至大约 5 wt.%。

本发明的杀菌局部乳膏制剂将含有大约 2 至大约 20 wt.%的油相，通常含有大约 6 至大约 10 wt.%。杀菌局部洗剂制剂将含有大约 1 至大约 10 wt.%的油相，通常含有大约 3 至大约 5 wt.%。油相可以是“硬脂”，

其是室温下为固体的脂肪酸甘油三酸酯掺和物，例如可从 SASOL 北美公司得到的 SOFTISAN 378。

杀菌局部乳膏制剂将含有大约 70 至大约 90wt.%的水相，典型地含有大约 80 wt.%的水相。杀菌局部洗剂制剂将含有大约 85 至大约 99 wt.%水相，通常含有大约 93 至大约 98 wt.%。在杀菌局部乳膏和洗剂制剂中，水相均包括抗感染活性成分和水相赋形剂，随水而平衡存在。

典型的杀菌局部乳膏和洗剂制剂的水相中包括大约 2 至大约 10 wt.%的皮肤吸收促进剂作为赋形剂，例如 DMSO 或者脂肪酸偏甘油酯，例如 IMWITOR 308 和 IMWITOR 742，两者均可从 SASOL 北美公司得到。IMWITOR 308 主要是单辛酸甘油酯。IMWITOR 742 主要是癸酸和辛酸的甘油一酸酯、甘油二酸酯和甘油三酸酯的掺和物。典型的局部杀菌膏和洗剂制剂含有大约 0.25 至大约 5 wt.%的水溶性乙氧基化脂肪酸偏甘油酯作为水相赋形剂，更通常含有大约 1 至大约 3 wt.%，例如 SOFTIGEN 767，其也可从 SASOL 北美公司得到。

根据本发明的一个实施方式，通过将例如 SOFTISAN 78 的硬脂和例如 SEPIGEL305 和乙氧基化的脂肪酸偏甘油酯的乳化剂预混合而制备杀菌乳膏或洗剂制剂。该预混合物可以被稍微加热到不会使加入的抗感染剂降解或变性的温度而使硬脂液化，该温度通常在室温和体温之间，通常为大约 30℃。也可以使用更高的温度，可达 100℃及更高。然而之后必需加入任何易变性的成分前冷却使该混合物冷却。如果存在，对水、一种或多种抗感染剂和吸收促进剂单独进行预混合。所使用的水量将决定该制剂是乳膏还是洗剂。然后用低剪切搅拌对两种预混合物进行混合以便形成水包油乳液。

已经发现油相中含有硬脂而水相中含有乙氧基化脂肪酸偏甘油酯的乳液除了具有良好的皮肤适应性和伤口愈合性能外，还具有促进抗感染活性剂到病原体表面的输送的皮肤接触性能。这样的制剂在室温下储存稳定并在释放点(delivery point)将该局部产品保持治疗所需的时间长度。这样的乳液还在释放点提供保持抗感染剂活性的保护性基质。

可以使用量在大约 0.125 和大约 10wt.%或更多之间的一种或多种抗感染活性剂配制本发明的独立杀菌的乳膏或洗剂，注意到最佳剂量在这个范围内可以仅仅相差 0.05wt.%。因此代表性的乳膏和洗剂实施

方式包括一种或多种抗感染活性剂的总浓度在此范围内每次增加0.05wt.%。

乳膏或洗剂独立杀菌的制剂中的典型抗感染活性剂包括溶葡萄球菌素、羊毛硫抗生素、新霉素、杆菌肽及其组合等。典型的组合包括溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽。

如上所述，本发明不限于局部乳膏或洗剂制剂，更不用说乳膏或洗剂独立杀菌的制剂。基于常规的喷雾、水雾、气溶胶、洗剂、乳膏、含水和非水溶液或者液体、油、凝胶、软膏、糊剂、油膏、乳液和悬浮液的局部制剂将含有量为总浓度在大约 0.125 和大约 10wt%之间的溶葡萄球菌素、或羊毛硫抗生素、或联用的溶葡萄球菌素和羊毛硫抗生素以及任选地一种或多种其它抗感染剂，再次注意到最佳剂量可以仅仅相差 0.05%，以致代表性的乳膏和洗剂实施方式将包括在这个范围浓度每次仅仅增加 0.05 wt.%。典型的制剂联用溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽。

以上列出的任选的抗感染活性剂中，常用的那些包括新霉素、杆菌肽等。也可以与其中基础乳液独立杀菌的乳膏和洗剂制剂一起使用的典型组合是溶葡萄球菌素与亚临床浓度的杆菌肽或者新霉素联用。杆菌肽或者新霉素的亚临床浓度定义为有效防止耐溶葡萄球菌素的金黄色葡萄球菌出现的量。

本发明的局部组合物用于治疗例如脓疱病的皮肤感染和例如表面伤口和穿透伤口的伤口感染。适于治疗的伤口包括皮肤擦伤的伤口、皮肤或表面切伤、褥疮、烧伤和外科伤口。本发明的局部组合物还可以用于对皮肤病原体种群进行去移殖以防止继发，包括手术或导管插入前对区域进行预处理。为本发明的目的，皮肤病原体定义为包括生长性和非生长性状态下的天然皮肤菌群有机体和非天然有机体，包括但不限于金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单孢菌、Strep. pyrogenes 等。

这里所使用的“移殖”指的是皮肤病原体的亚临床存在，其中“受感染的”指的是皮肤或皮肤伤口的临床感染。因此本发明的治疗方法包括以临床和亚临床水平存在的皮肤病原体菌落数在统计上的明显减少。

因此，本发明的一个方面是指通过进行本发明抗感染局部组合物的给药，对患有临床皮肤感染或伤口感染的病人进行治疗的方法，包括患有擦伤、皮肤或表面切伤、或褥疮的病人，烧伤病人，带有血管内设备的病人和患有脓胞疮的病人。

如果对人类病人敷用抗感染局部组合物后，其引起感染进程中可辨识的或者医学上有意义的改进，例如，如在施加在取自治疗后的活性感染部位的样品上时通过这里所说明的皮肤移殖分析方法所测定的，则皮肤感染或伤口感染的治疗方法是有效的。因此，临床上的皮肤或伤口感染的“治疗”包括将有效量的本发明的抗感染局部组合物以一次剂量或多次剂量对感染部位进行给药，有效量是足以导致感染在医学上有意义的、可辨识的、或者统计上明显的减少、改善、减轻、或者根除的量。

本发明的另一方面是指对亚临床皮肤病原体种群进行去移殖以预防易感病人继发感染的方法，例如呼吸性病毒感染的病人、移植病人、HIV-感染的病人、烧伤病人、有血管内设备或者异物体的病人、恢复期的病人等，通过将有效量的本发明的抗感染局部组合物对皮肤进行给药以消除继发感染的原发源。

如果其引起取自在进行本发明的抗感染局部组合物的给药之前已经对一种或多种皮肤病原体呈阳性的人类病人的阳性培养基或可恢复细菌的频率的可辨识的减少，则本发明的抗感染局部组合物对皮肤病原体菌群的去移殖是有效的。如果在敷用后，取自在敷用前具有阳性病原体培养基的人类病人的培养基不呈阳性，本发明的抗感染局部组合物就“根除”了皮肤病原体菌落。

任一治疗方法的一个实施方式是指对皮肤移殖进行根除、去移殖或者阻碍，也指对其中存在任何葡萄球菌的危险分离物的活性皮肤和伤口感染进行治疗，包括多种孢荚(capsule)类型中的任何一种，以及耐甲氧苯青霉素、万古霉素、莫匹罗星(mupirocin)和其它抗生素的菌株。因此本发明通过降低葡萄球菌感染的频率和传播，具有抑制葡萄球菌的耐抗生素菌株到公众中的传播的附加益处。

当该组合物在暴露到皮肤病原体面前之前、同时或之后(无论这种暴露是由于病原体的有意安置还是一般性的暴露)进行局部给药时，如

果局部组合物能够减少哺乳动物皮肤上的病原体菌落数或者降低病原体存在的阳性皮肤培养的频率，则认为局部组合物在对皮肤病原体种群进行去移殖是有效的。例如，如果在进行了该局部组合物的局部给药之后，可以由皮肤或皮肤拭子样品中生长的细菌菌落的数目减少了，则认为该局部组合物对皮肤的去移殖是有效的。如本文所述的皮肤移殖检测方法，当本发明的抗感染局部组合物使菌落的数目减少了至少30%至达到100%时，其对皮肤有效地进行了去移殖。百分之百的去移殖是“根除”。

如果当该抗感染局部组合物在暴露之前、同时或之后(无论该暴露由于有意安置还是别的方式)进行给药时其能够阻止哺乳动物地皮肤移殖，则认为本发明的抗感染局部组合物“阻碍”了病原体的移殖。如本文所述的皮肤移殖检测方法，如果没有病原体菌落能够从取自用本发明的抗感染局部组合物进行了一段时期治疗(例如在暴露后 12 小时到 24 小时或者更长)的哺乳动物的皮肤组织或者皮肤拭子中生长，则本发明的抗感染组合物阻碍了定植。

因为本发明的根除、去移殖或阻碍皮肤病原体菌落的去移殖方法的目标是降低继发性病原体感染的频率，本发明抗感染局部组合物的有效量的给药包括其量足以表明继发性感染(例如系统侵染或者外伤或者手术部位的感染)的可能性出现了医学上有意义的、可辨识的或者统计上明显的减少。这样的实证可以包括，例如，动物研究或者危急病人的临床试验，包括保健工作者，新生儿和早产儿，经历了住院或门诊手术的人，烧伤受害者，接受内置导管、支架、关节置换等的病人，老年病人，褥疮病人，以及具有遗传、化学或病毒抑制免疫系统的那些人。

在临床环境中，人类病人皮肤病原体菌落的存在与否是通过在合适的细菌介质中培养皮肤拭子(经常是在肉汤培养基中经过整夜的富集后)而测定的。培养记录为病原体菌落存在或不存在。在这种定性分析系统中，可能难以辨识是阻碍了新菌落还是去移殖了现有菌落。一旦发生了阻碍或去移殖，病人可能由外部源重移殖。为了定性分析的目的，例如使用皮肤拭子，如果治疗实验时皮肤病原体菌落呈阴性的病

人保持一段时间仍然呈阴性，比如 12 至 24 小时或更长，则本发明的抗感染局部组合物“阻碍”了移殖。

“医学上有意义的”治疗包括任何改善了病人的病情，改善了病人的预后；改善了病人的预后；降低病人的发病率或者死亡率，降低未来移殖或感染的可能性，或者降低了病人群体中本文所说的细菌感染的发病率或者死亡率的任何治疗。“统计上明显的”明确测定或者鉴定结果将依靠所使用的准确的统计实验。本领域普通技术人员可以容易地从所使用的任何统计实验中得出的统计学上明显的结果，如实验本身参数所测定一样。这些公知的统计实验的例子包括但不限于，卡方检验(Chi-Squared test)，史蒂特氏检验(Student's test)，F 检验(F test)，M 检验(M test)，费舍尔精确检验(Fisher Text Exact)，二项精确检验(Binomial Exact Test)，泊松精确检验(Poisson Exact Test)，方差的单向或双向重复测量分析，和相关因子的计算(Pearson 和 Spearman)。

在本文中，如果去移殖方法产生(1)未来移殖或者感染的可能性在统计上明显降低；(2)在本发明的抗感染局部组合物最后给药后至少 12 小时或者更长时间内没有移殖；(3)在本发明抗感染局部组合物最后给药后至少 4 小时至大约 24 小时或者更长时间内皮肤病原体菌落数有医学上有意义的、可辨识的或者统计上明显的减少；(4)在最后给药后至少 4 小时至大约 24 小时或更长时间内取自皮肤的阳性培养的频率降低；(5)在最后给药后抗感染局部组合物在皮肤上具有至少 12 至大约 48 小时或更长时间的连续活性；(6)通过单剂量至高达十剂量或更多的本发明抗感染局部组合物而使皮肤病原体根除、去移殖或者阻碍；(7)对未来的皮肤病原体移殖的任何医学上有意义的、可辨识的或者统计上明显的阻碍或者预防；或者(8)治疗过的病人感染的可能性具有任何药学上有意义的、可辨识的或者统计上明显的减少，则认为去移殖方法氏“医学上有意义的”。

在本文中，临床皮肤或伤口感染的“药学上有意义的”治疗包括任何在进行单剂量至高达十剂量或更多的本发明的抗感染局部组合物的给药后改善病人病情；改善病人预后；减少病人的发病率和死亡率；或者减少病人未来移殖或感染的可能性的治疗。

由所提供的公开内容看来，本发明抗感染局部组合物的给药是在本领域技术人员的技术诀窍和经验之中的。具体的说，所需抗感染局部组合物的量、与合适载体的联用，剂量日程和药量可以在基于本领域标准的知识并且不背离所保护的发明的情况下而在宽范围内变化。在一个实施方式中，抗感染局部组合物可以一天给药一次、两次、三次或更多，进行至少一天或者直到感染解决，最长十天。这样剂量的给药用法对于非常年轻的病人、非常老的病人、康复的病人、怀孕的母亲、进行住院或者门诊侵袭疗法的那些人(基本上离开医院前的任何病人)、以及遭受各种使他们易于发生原发性或继发性皮肤感染的各种病情的病人是有效的。

病人可以是需要预防或治疗临床感染的任何人或任何非人类哺乳动物。计划进行局部给药的代表性病人是任何经受金黄色葡萄球菌或其它皮肤病原体感染或者移殖的哺乳动物，包括人和非人动物，例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪、马，灵长类动物，反刍类动物，包括奶牛和菜牛、绵羊、山羊、水牛和骆驼，以及毛皮动物和兽群动物，动物园和实验室的动物，农场、窝养和厩养动物，家养的宠物和兽医的动物。

本发明通过以下实施例进一步举例说明以教导本领域普通技术人员如何实施本发明。下面的实施例仅仅是对本发明起到说明作用并公开本发明的某些实施方式的各种有益性能。以下实施例不解释为限制本发明。

实施例

材料和方法

小鼠皮肤感染模型：在 TSB(SA5)中生长的金黄色葡萄球菌的过夜培养基；范围从 1 至 6×10^9CFUs/mL，在 4000xg 下离心 8 分钟并在相等体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中再悬浮。SKH1(hrhr)无毛小鼠或者刮毛的 CF1 小鼠(Charles River)腹膜内给予 0.2 ml 氯胺酮(80mg/kg)和甲苯噻嗪(32 mg/kg)镇静剂。用 70%酒精将小鼠的上背擦拭干净并使其变干。将大约 0.5cm 长的，由 Ethicon(爱惜康公司)制造并从 VWR 科技公司购买的 4-0 丝缝合的单缝线刚好系在上背的颈下方。用无菌棉签涂抹

器将细菌拭抹在缝线上直到该区域被溶液浸透。第二天早上束缚该小鼠并从背上拆除缝线。

感染模型的病理评价：如上所述用 SA5 感染无毛小鼠。在第 1、2、3 或 10 天用 CO_2 窒息使该小鼠死亡。在感染周围切除 0.5cm^2 的切片并在含有 10%福尔马林的 PBS 溶液中固定。对照小鼠完全未进行处理或者在背上有缝合的缝线但是不拭抹细菌。两个对照组在第 1 天死亡。在 Taconic Anmed (马里兰州 Rockville(洛城))进行组织切片和组织病理学。由病理学家对样品的 achantosis、皮下组织炎症或者纤维化进行评价，并且对变化的严重程度按照从 0(在正常限之内)到 4(严重)的等级打分。

局部乳膏：整个配制过程在室温下进行，并且用搅拌棒简单地手动混合。将 3g SEPIGEL 305、8 g SOFTISAN 378 和 2 g SOFTIGEN 767 加入到 250mL 玻璃烧杯中，并且混合直到形成均匀的化合物，时间大约 1 分钟。其它的样品分别用 5 g IMWITOR 308 和 5 g IMWITOR742 配制。然后一次性加入 77mL sterile 并慢慢混合直到开始变稠，时间大约 1 到 2 分钟。然后将所得乳膏剧烈混合 30 秒以保证一致性和均匀性。然后向乳膏中加入最后的含有合适量药物的 10mL 水，并且混合 1 到 2 分钟。

局部乳膏的体外功效：检验配制在局部乳膏中的溶葡萄球菌素(马里兰州盖士堡的 Biosynexus 股份有限公司)和乳酸链球菌肽(Nutrition 21)的抗感染功效对于金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌(PA)的抗感染活性。通过向在 PBS(650nm 下%透光率＝40；Spectonic 200+，Spectonic 仪器)中的 SA5 或者 PA 悬浮液中加入溶葡萄球菌素(0 至 10μg/mL)或者乳酸链球菌肽(0 至 6μg/mL)来测定活 SA5 和 PA 细菌的溶解。或者将 5mM EDTA 加入到用乳酸链球菌肽处理过的样品中以测定其存在是否增强了肽的活性，尤其是对革兰氏阴性菌。该样品在 37℃培养 30 分钟，然后在血琼脂板上划线以测定治疗后的成活力。在 37℃整夜培养后，对菌落进行计数并和未处理的样品进行比较。

局部乳膏对受感染皮肤的治疗：根除小鼠模型的金黄色葡萄球菌感染的治疗在感染后接着拆除缝线(第 1 天)后的早晨开始。用无菌的棉签涂抹器将含有可变量溶葡萄球菌素(0 至 0.5% w/w)和乳酸链球菌肽(0

至 2% w/w)的局部乳膏拭抹在受感染区域上，第 1 天和第 2 天一天三次。第 3 天的早上用 CO_2 使小鼠窒息死亡并且切下感染周围 0.5 cm^2 的皮肤切片。将该皮肤样品对分并放入装有 1mL PBS 的试管中。通过超声处理从皮肤样品上驱除细菌：在带有微探头(Virtis)的 VIRSONIC600 中，用 2.5W 5 秒和 0W 5 秒对每块样品交替处理 2 分钟。在漩涡混合后，用 50μL 的每个样品在血琼脂板上划线，在 37℃整夜培养，并且对菌落数进行计数并且与未处理的对照进行比较。

结果

检验配制在局部乳膏中的溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的体内功效。单独的乳酸链球菌肽已经显示对革兰氏阴性菌没有活性。但是如果其与螯合剂或表面活性剂一起配制，其杀菌活性跨越了(cross over)很多革兰氏阴性菌株。因此，乳酸链球菌肽与或不与 5mM EDTA 一起配制到局部乳膏中。溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽乳膏都对金黄色葡萄球菌有效，而含有 EDTA 的乳酸链球菌肽对铜绿假单胞菌有杀菌活性(图 1A 和 1B)。如所预期的，单独的乳酸链球菌肽对革兰氏阴性菌株铜绿假单胞菌没有活性，但是在制剂中加入 5mM EDTA 使得该细菌像金黄色葡萄球菌一样对乳酸链球菌肽同样敏感。向乳酸链球菌肽乳膏制剂中加入 EDTA 也增强了该肽对金黄色葡萄球菌的功效，特别是在较高的药物浓度下。

实施例 1-溶葡萄球菌素局部乳膏的体内功效

将溶葡萄球菌素配制成局部乳膏以检验其在小鼠皮肤感染模型中对金黄色葡萄球菌的功效(图 2)。两天内施用六次剂量 0.5%w/w 的溶葡萄球菌素乳膏使四个小鼠的三个根除了感染，其余的小鼠仅有少许菌落。0.25%w/w 的溶葡萄球菌素乳膏也显示了相当大的活性，清除了三个小鼠中一个的感染并使其中两个的感染滴度降低了 3 logs 以上，但是其功效比 0.5%w/w 的溶葡萄球菌素乳膏低了十倍多，表明这种疗法的指数剂量响应。令人惊讶的是，安慰剂乳膏也有相当大的葡萄球菌杀死活性，使皮肤中细菌滴度降低了大约 100 倍。溶葡萄球菌素乳膏的活性明显地是溶葡萄球菌素和基础乳膏二者的组合或协同杀死作

用。

0.5%w/w 溶葡萄球菌素的功效可以与可商业获得的 2%莫匹罗星膏、百多邦(BACTROBAN)乳膏(葛兰素史克公司)相比。基于摩尔基础，0.5%w/w 的乳膏中的溶葡萄球菌素比 2%的乳膏中莫匹罗星少 100 倍。然而，在每天敷用三次经过两天后，0.5%w/w 的溶葡萄球菌素乳膏在治疗小鼠皮肤感染中远比 2%莫匹罗星膏有效得多(图 3)。百多邦乳膏的局部敷用是每天敷用 3 次敷用 10 天，在 3 至 5 天的预期临床结果中，不是完全没有预料到用莫匹罗星治疗的感染在刚刚治疗两天后仍然显示极大的细菌滴度。相反，在治疗两天后，溶葡萄球菌素乳膏能够根除三个动物中一个的感染并将其它两个动物的滴度降低到低于 100CFUs 的水平，尽管与莫匹罗星相比使用了 1/100 的药量。这些结果证实溶葡萄球菌素不仅在皮肤感染模型中比莫匹罗星更有效，而且其也更快速地开始攻击，将出现可能使金黄色葡萄球菌的耐溶葡萄球菌素菌株出现概率降低的因素。

实施例 2-乳酸链球菌肽局部乳膏的体内功效

将乳酸链球菌肽配制成局部乳膏以检验其在小鼠皮肤感染模型中对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的功效(图 4 和 5)，这有助于预防耐溶葡萄球菌素有机体的出现。与 EDTA 联用，乳酸链球菌肽的杀菌活性拓展到也是传染性皮肤病重要诱因的革兰氏阴性菌。虽然乳酸链球菌肽乳膏不像溶葡萄球菌素乳膏一样有效(图 2 和 4)，但是在两天的治疗后乳酸链球菌肽仍然对金黄色葡萄球菌有相当大的活性。0.5%w/w 的乳酸链球菌肽乳膏在任何动物中都没有根除感染，但是确实使细菌滴度降低了大约 3.5 logs。更重要地，当在单一乳膏制剂中联用小剂量(每种 0.1%w/w)的溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽时，所有进行检验的动物的皮肤感染都完全根除了。单独的 0.1%w/w 溶葡萄球菌素或者乳酸链球菌肽的每一种均不足以根除感染，并且仅仅使细菌滴度降低到大约 10^4CFUs，与未处理的对照组 10^6CFUs 相当。

乳酸链球菌肽与 5mM EDTA 一起配制成局部乳膏以治疗小鼠模型的铜绿假单胞菌皮肤感染(图 5)。用铜绿假单胞菌达到的感染滴度不像用金黄色葡萄球菌达到的感染滴度一样高，但是感染的临床观察更明

显：整个受感染区域发炎反应更强并且更红。依据受感染皮肤的剖析，也是明显地发现感染穿透到皮肤的真皮层，其中金黄色葡萄球菌感染主要包含在皮下表层。乳酸链球菌肽与 EDTA 联用对铜绿假单胞菌感染非常有效，根除了 6 个小鼠中 5 个的感染并使剩余小鼠的细菌滴度明显降低。

实施例 3-不含抗感染剂的局部乳膏的体内功效

在皮肤移殖模型中证实了乳膏制剂的体内功效。通过在皮肤表面(无伤口或缝合)拭抹细菌使金黄色葡萄球菌移殖到无毛小鼠的皮肤。用实施例 1 制备的局部乳膏基物或者实施例 1 制备的局部乳膏加上 1% w/w DMSO 对移殖的皮肤进行两天治疗，一天 3 次。局部乳膏中的溶葡萄球菌素仅仅使皮肤移殖降低了大约一半，而向不含溶葡萄球菌素或者任何其它抗感染剂的乳膏中加入吸收增强剂 DMSO 导致已移殖细菌实际上被完全清除(图 6)。

实施例 4-没有抗感染剂的局部乳膏的体内功效

除了 DMSO 局部乳膏用两种局部乳膏样品取代之外，重复实施例 3，一种是用 IMWITOR 308 代替其中的 DMSO，一种是用 IMWITOR 742 代替其中的 DMSO。局部乳膏中的溶葡萄球菌素使皮肤移殖降低了大约十倍，而向乳膏中加入 IMWITOR 吸收增强剂导致已移殖细菌实际上被完全清除(图 7)。

实施例 5-乳酸链球菌肽局部乳膏对于皮肤去移殖的体内功效

用 5%w/w 的 IMWITOR 742 配制实施例 2 的乳酸链球菌肽局部乳膏。无毛小鼠的皮肤如在实施例 3 和 4 中一样用金黄色葡萄球菌进行移殖。对已移殖的皮肤一天治疗三次，治疗 2 天。这种乳膏中的乳酸链球菌肽以剂量依赖性的方式使皮肤移殖降低，并且在乳酸链球菌肽剂量为 1%w/w 时达到接近完全的清除(图 8)。

实施例 6-乳酸链球菌肽乳膏的体外功效

通过将蜡和油加热到大约 70℃配制局部乳膏(100g)。在乳膏冷却

到室温后加入水溶液中的乳酸链球菌肽。在250mL玻璃烧杯中将以下成分混合，直到形成均匀的化合物：

成分	w/w
MIGLIOL[1]	37.9%
SOFTISAN[1]	25.5%
矿脂[2]	28.9%
石蜡，白色，块状[3]	3.6%
蜂蜡[4]	3.6%
硬脂酸铝[2]	0.5%

[1] Condea Vista
[2] Fluka
[3] Riedet de Haan
[4] Aldrich

为了检验乳酸链球菌肽基乳膏的抗感染活性，并且将此活性与PBS中相同浓度的乳酸链球菌肽的活性进行比较，将20μL 9×10^8 CFU/mL金黄色葡萄球菌悬浮液加入到乳酸链球菌肽浓度如表1所示的1g乳膏和1mL PBS中。将该样品进行漩涡混合并在37℃培养60分钟。向乳膏中加入1 mL矿物油以便帮助移液，然后进行连续稀释以在板上计数活细胞。表1中的数据显示了各种乳酸链球菌肽浓度下的活细胞。

表1

乳酸链球菌肽(μg/ml)	PBS(cfu/ml)	乳膏(cfu/ml)
0	70,000	50,000
0.5	TNTC	1082
2.5	TNTC	140
12.5	482	12

实施例1说明在乳膏制剂中溶葡萄球菌素的剂量响应曲线是指数的。该实施例也显示该乳膏基乳液具有独立杀菌性。该实施例还证实在皮肤感染模型中溶葡萄球菌素比莫匹罗星更有效，并且也更快速地开始攻击。实施例2证实当溶葡萄球菌素和乳酸链球菌肽联用时两种

化合物之间的协同作用。实施例 2 还说明乳酸链球菌肽与 EDTA 联用对铜绿假单胞菌具有有效性。实施例 3 说明局部乳膏基物的独立杀菌活性和与 DMSO 联用对该活性的增强。实施例 4 说明通过其它吸收增强剂对局部乳膏基物杀菌活性的增强。实施例 5 说明局部乳膏中吸收增强剂对乳酸链球菌肽活性的增强。实施例 5 说明不同乳膏基中乳酸链球菌肽活性的增强。实施例 6 说明在凝胶基中与表面活性剂联用对乳酸链球菌肽活性的增强。

因此，前述实施例说明了乳酸链球菌肽和溶葡萄球菌素的局部形式在控制例如金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的皮肤病原体种群中是高度有效的，而均为低浓度显示了活性的协同水平。该实施例还说明本发明的基础乳液具有独立杀菌性，因而增强了抗感染活性剂的活性。

从这里公开的发明的说明书和实施考虑，本发明的其它实施例对于本领域的技术人员是显而易见的。这意味着说明书和实施例仅仅是作为示范，本发明真正的范围和精神通过下面的权利要求指出。

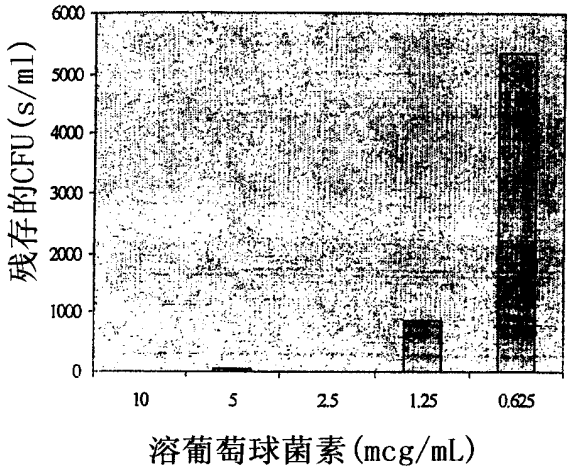

残存的CFU(s/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
5
2.5
1.25
0.625
溶葡萄球菌素(mcg/mL)

图1A

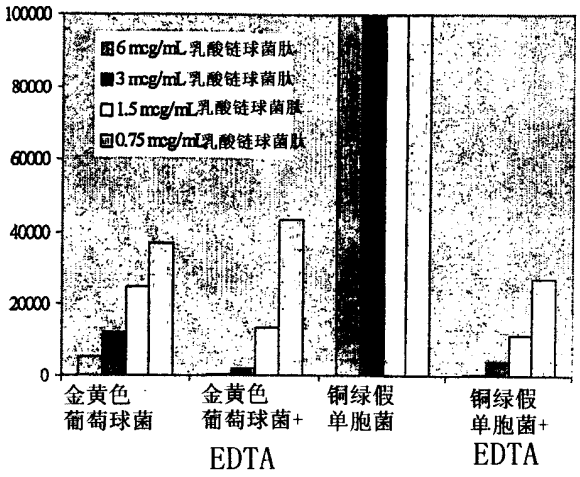

100000
80000
60000
40000
20000
0
6 mcg/mL乳酸链球菌肽
3 mcg/mL乳酸链球菌肽
1.5 mcg/mL乳酸链球菌肽
0.75 mcg/mL乳酸链球菌肽
金黄色葡萄球菌
金黄色葡萄球菌+EDTA
铜绿假单胞菌
铜绿假单胞菌+EDTA

图1B

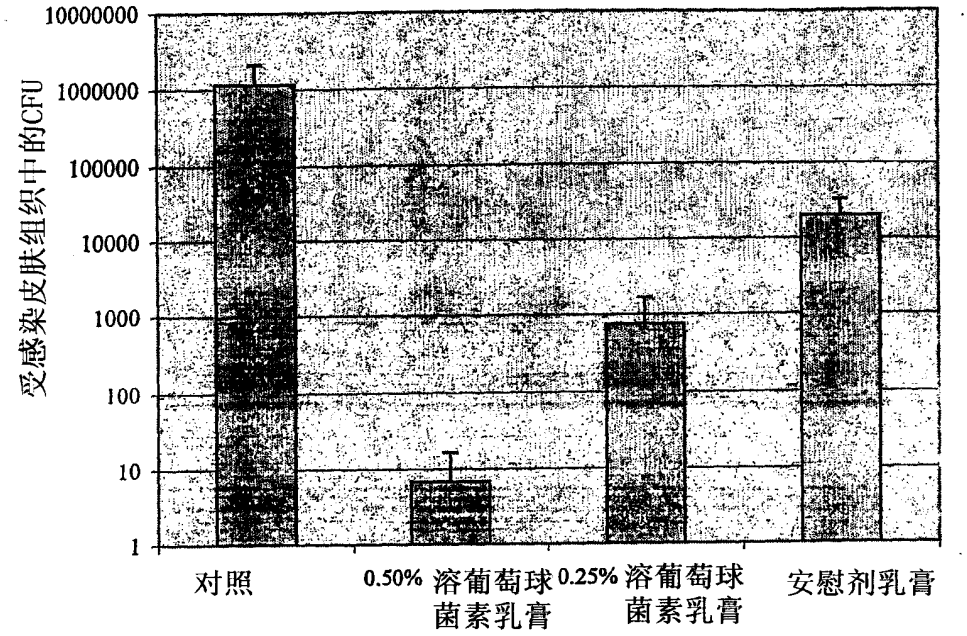

受感染皮肤组织中的CFU
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
对照
0.50% 溶葡萄球菌素乳膏
0.25% 溶葡萄球菌素乳膏
安慰剂乳膏

图2

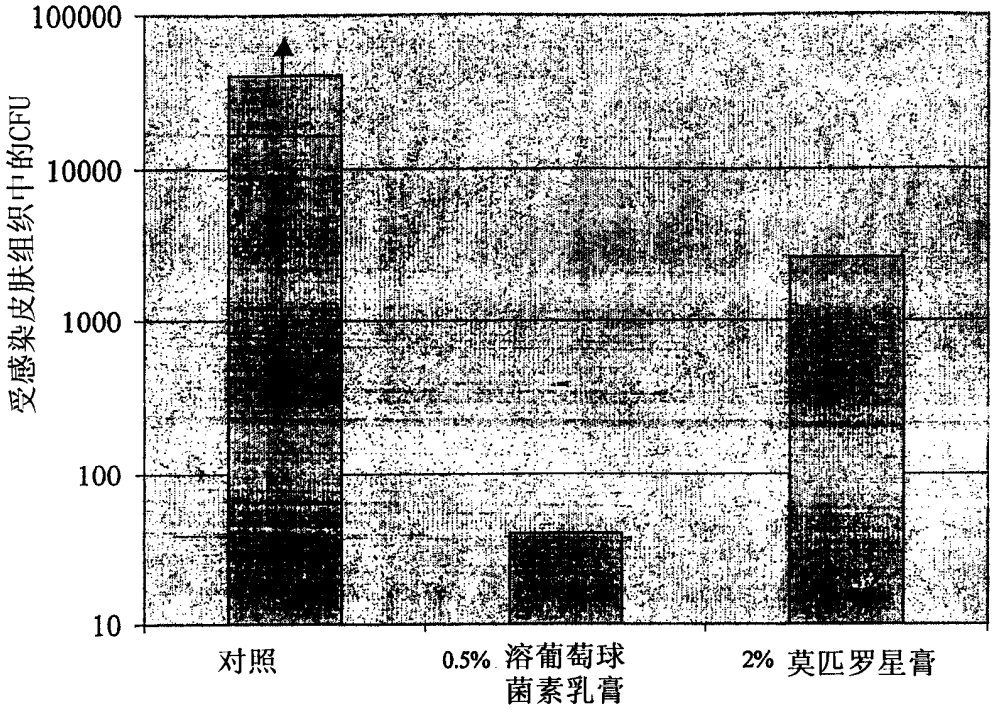

100000
10000
1000
100
10
受感染皮肤组织中的CFU
对照
0.5% 溶葡萄球菌素乳膏
2% 莫匹罗星膏

图3

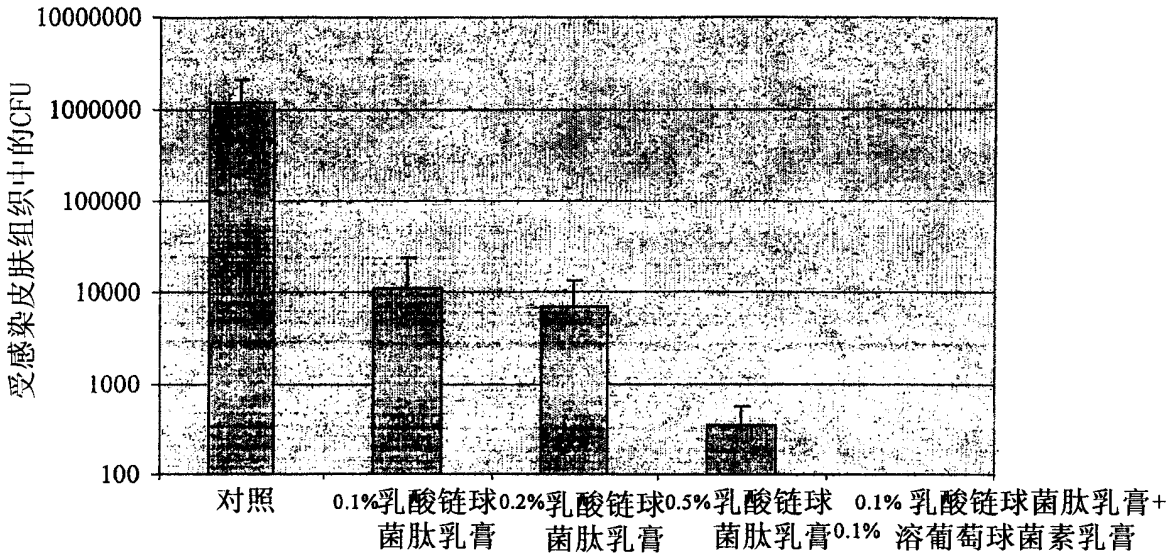

受感染皮肤组织中的CFU
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
对照
0.1%乳酸链球菌肽乳膏
0.2%乳酸链球菌肽乳膏
0.5%乳酸链球菌肽乳膏
0.1%乳酸链球菌肽乳膏+0.1%溶葡萄球菌素乳膏

图4

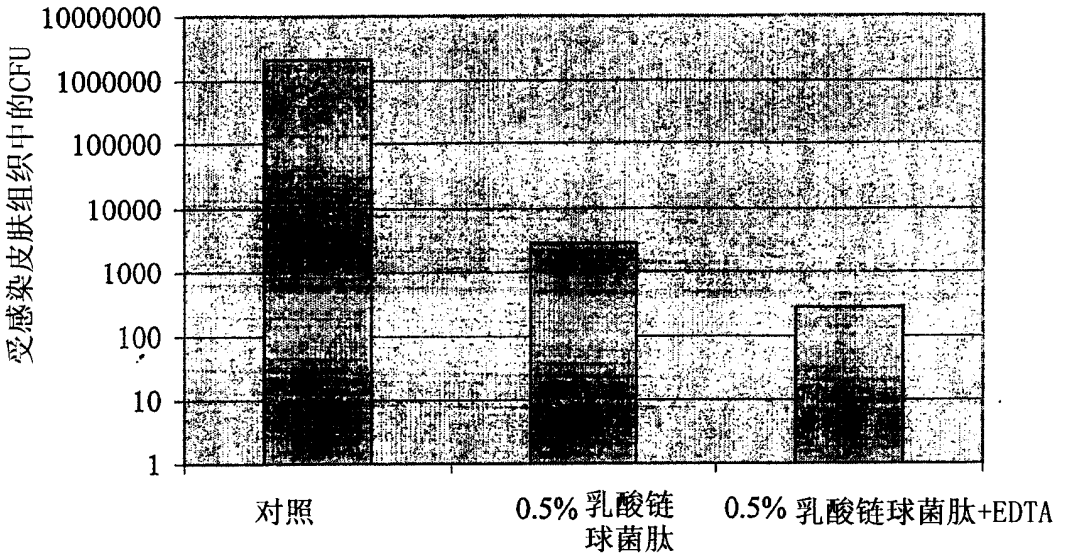

受感染皮肤组织中的CFU
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
对照
0.5% 乳酸链球菌肽
0.5% 乳酸链球菌肽+EDTA

图5

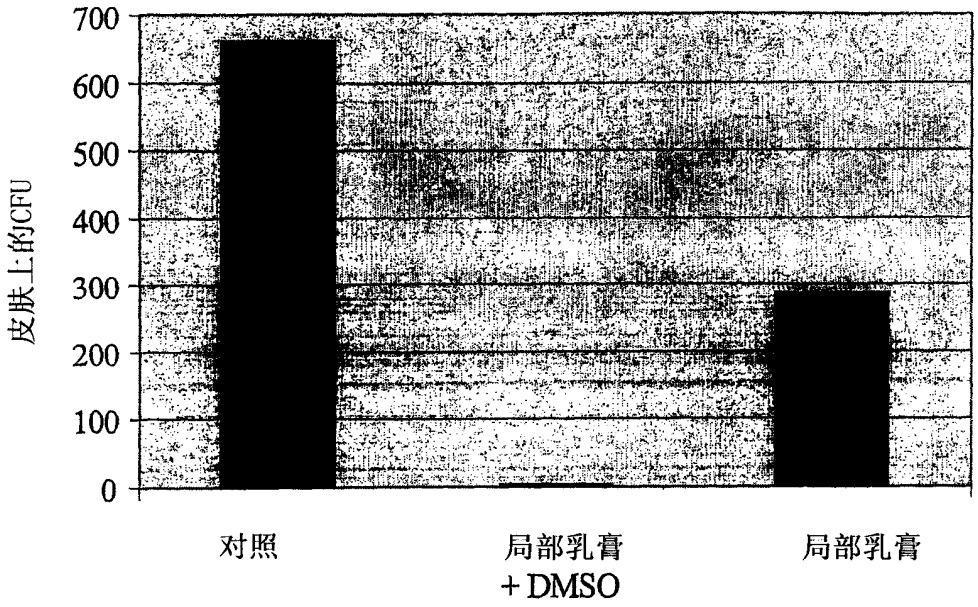


图6

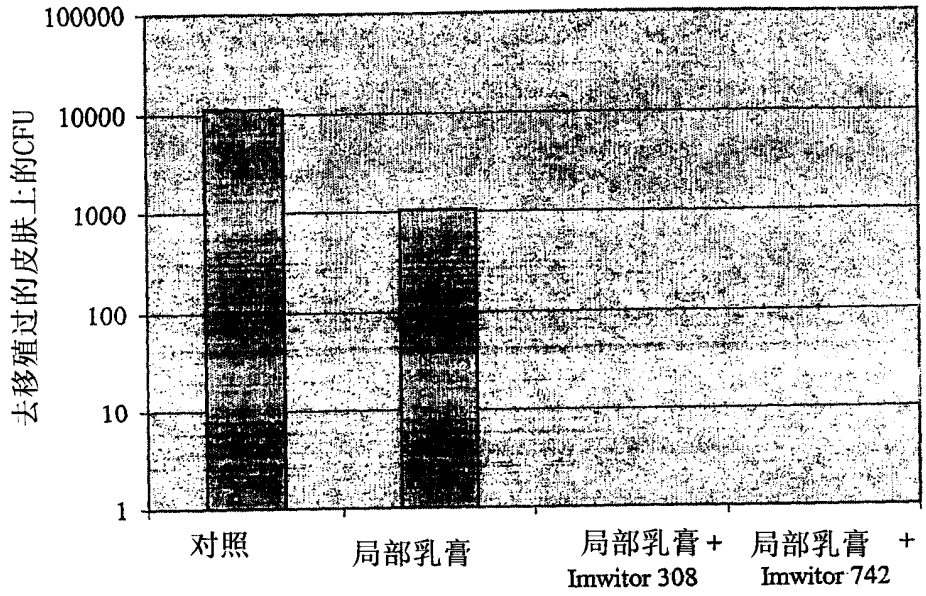

100000
10000
1000
100
10
1
去移殖过的皮肤上的CFU
对照
局部乳膏
局部乳膏+
Imwitor 308
局部乳膏 +
Imwitor 742

图7

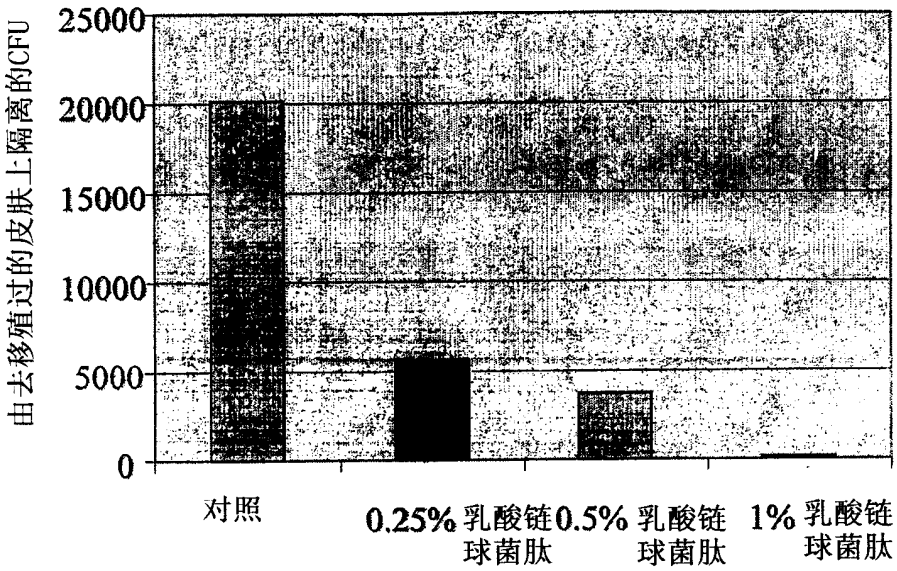

由去移殖过的皮肤上隔离的CFU
25000
20000
15000
10000
5000
0
对照
0.25% 乳酸链球菌肽
0.5% 乳酸链球菌肽
1% 乳酸链球菌肽

图8