



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104274490 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 14

(21) 申请号 201410433436. X

A61P 31/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 11

A61K 31/045 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/151, 539 2009. 02. 11 US

(62) 分案原申请数据

201080016122. X 2010. 02. 11

(71) 申请人 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司

地址 以色列特拉维夫

(72) 发明人 诺阿·哈达尔 阿米海·弗里曼

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 刘书芝

(51) Int. Cl.

A61K 33/38 (2006. 01)

A61K 31/28 (2006. 01)

A61K 31/79 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页 附图4页

(54) 发明名称

包括银离子源和薄荷醇的抗菌组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包括银离子源和薄荷醇的抗菌组合物及其用途。本发明涉及一种抗菌组合物, 包含作为活性成分的薄荷醇和银离子源, 以及药学可接受的载体, 其中银离子源在组合物中产生浓度范围 0. 05mM 至 6mM 的银离子。本文公开了包含银离子源和薄荷醇的抗菌组合物和试剂盒, 其中银离子和薄荷醇具有协同作用从而显著降低了组合物中银离子的浓度。还公开了该抗菌组合物用作消毒剂和 在伤口处理中的用途。

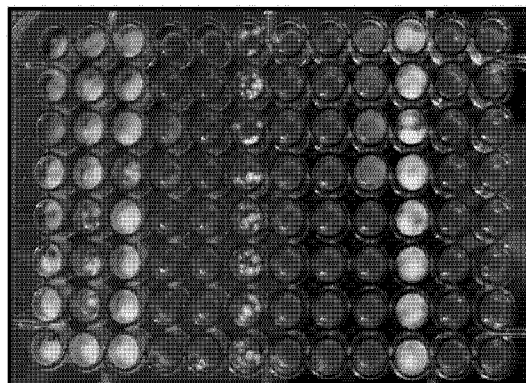


图 1

1. 一种抗菌组合物,包含:作为活性成分的薄荷醇和银离子源,以及药学可接受的载体,所述银离子源在所述组合物中产生浓度范围 0.05mM 至 6mM 的银离子。
2. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述薄荷醇和所述银离子具有协同作用。
3. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述薄荷醇的浓度为 0.3mM 至 32mM 的范围。
4. 权利要求 3 所述的抗菌组合物,其中所述薄荷醇的浓度为 0.6mM 至 6.4mM 的范围。
5. 权利要求 1-4 中任一项所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.25mM 至 0.6mM 的范围。
6. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.25mM 至 0.6mM 的范围并且所述薄荷醇的浓度为 0.6mM 至 6.4mM 的范围。
7. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.29mM,并且所述薄荷醇的浓度为 6.4mM。
8. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.29mM,并且所述薄荷醇的浓度为 3.2mM。
9. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.29mM,并且所述薄荷醇的浓度为 0.64mM。
10. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.44mM,并且所述薄荷醇的浓度为 3.2mM。
11. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.6mM,并且所述薄荷醇的浓度为 3.2mM。
12. 权利要求 1 所述的抗菌组合物,其中所述银离子的浓度为 0.6mM,并且所述薄荷醇的浓度为 0.64mM。
13. 权利要求 1-12 中任一项所述的抗菌组合物,其中所述银离子源选自硝酸银、磺胺嘧啶银、氨基醇-银离子络合物、氨基酸-银离子络合物和聚合物-银离子络合物组成的组。
14. 权利要求 13 所述的抗菌组合物,其中所述聚合物-银离子络合物为聚乙烯吡咯烷酮-银离子络合物。
15. 权利要求 1-14 中任一项所述的抗菌组合物,进一步包含高渗剂。
16. 权利要求 15 所述的抗菌组合物,其中所述高渗剂选自甘油、聚乙二醇、氯化钠、多糖、甘露醇、氯化铵、硫酸镁以及它们的组合组成的组。
17. 权利要求 15 所述的抗菌组合物,其中所述高渗剂是甘油。
18. 权利要求 17 所述的抗菌组合物,其中基于所述抗菌组合物的总体积,所述甘油的浓度为 3% v/v 至 15% v/v 的范围。
19. 权利要求 17 所述的抗菌组合物,其中基于所述抗菌组合物的总体积,所述甘油的浓度为 10% v/v。
20. 权利要求 15 所述的抗菌组合物,其中所述高渗剂是聚乙二醇。
21. 权利要求 20 所述的抗菌组合物,其中基于所述抗菌组合物的总体积,所述聚乙二醇的浓度为 8% v/v 至 16% v/v 的范围。
22. 权利要求 1-21 中任一项所述的抗菌组合物,进一步包含增溶剂。
23. 权利要求 22 所述的抗菌组合物,其中所述增溶剂是 TWEEN 20。

24. 权利要求 1-23 中任一项所述的抗菌组合物,其中所述药学可接受的载体是水溶液。

25. 权利要求 1-24 中任一项所述的抗菌组合物,其被配制成局部剂型。

26. 权利要求 25 所述的抗菌组合物,其中所述局部剂型选自霜剂、喷雾剂、纱布、擦剂、海绵、无纺布、棉布、泡沫剂、溶液、洗剂、软膏剂、糊剂和凝胶剂组成的组。

27. 一种抗菌试剂盒,包括包装材料和包装在所述包装材料中的权利要求 1-26 中任一项所述的抗菌组合物。

28. 权利要求 27 所述的抗菌试剂盒,在所述包装材料中或所述包装材料上以印刷方式指明用于表面消毒。

29. 权利要求 28 所述的抗菌试剂盒,其中所述表面为身体表面。

30. 权利要求 27 所述的抗菌试剂盒,在所述包装材料中或所述包装材料上以印刷方式指明用于伤口处理。

31. 权利要求 30 所述的抗菌试剂盒,其中所述伤口选自急性伤口、慢性伤口、烧伤和手术伤口组成的组。

32. 权利要求 31 所述的抗菌试剂盒,其中所述慢性伤口选自糖尿病溃疡、静脉性溃疡和压疮组成的组。

33. 一种对基体的表面进行消毒的方法,所述方法包括将有效量的权利要求 1-26 中任一项所述的抗菌组合物施用至所述表面,由此消毒所述基体的表面。

34. 权利要求 1-26 中任一项所述的抗菌组合物在制备用于消毒身体表面的药物中的用途。

35. 权利要求 34 所述的用途,其中所述药物是用于处理所述身体表面的感染。

36. 权利要求 35 所述的用途,其中所述感染是由选自细菌、真菌和酵母组成的组中的致病微生物引起的。

37. 权利要求 1-26 中任一项所述的抗菌组合物在制备用于处理伤口的药物中的用途。

38. 权利要求 37 所述的用途,其中所述伤口选自急性伤口、慢性伤口、烧伤和手术伤口组成的组。

39. 一种制备权利要求 1-26 中任一项所述的抗菌组合物的方法,所述方法包括将所述银离子源、所述薄荷醇和所述药学可接受的载体混合,由此获得所述抗菌组合物。

40. 权利要求 39 所述的方法,进一步包括将高渗剂与所述组合物混合。

41. 权利要求 39 所述的方法,进一步包括将增溶剂与所述组合物混合。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中在将所述薄荷醇与所述银离子源和所述载体混合前,将所述增溶剂与所述薄荷醇混合。

43. 权利要求 41 所述的方法,其中所述增溶剂是 TWEEN20。

44. 一种降低包含银离子的抗菌组合物中的银离子浓度的方法,所述方法包括将银离子源与协同有效量的薄荷醇混合,由此降低所述抗菌组合物中所述银离子的浓度。

45. 权利要求 44 所述的方法,其中所述银离子的浓度被降低至少 2 倍。

46. 权利要求 44 所述的方法,其中所述银离子的浓度被降低至少 10 倍。

47. 一种增大包含浓度低于 6mM 的银离子源的抗菌组合物的抗菌活性的方法,所述方法包括将所述抗菌组合物与协同有效量的薄荷醇混合。

## 包括银离子源和薄荷醇的抗菌组合物及其用途

[0001] 本发明是申请日 2010 年 2 月 11 日、发明名称为“包括银离子源和薄荷醇的抗菌组合物及其用途”、申请号为 201080016122. X 的申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明在其一些实施方案中涉及抗菌组合物及其用途，并且更具体而言但是不限于，涉及可有效用于对表面例如身体表面进行消毒并且因此可有效用于治疗例如与感染相关的诸如急性和慢性伤口、烧伤和手术伤口的医学病症的抗菌组合物。

### 背景技术

[0003] 慢性伤口的特征为愈合过程受损、炎症阶段延长、缺乏再上皮化以及细胞外基质重塑存在缺陷。积累在这些伤口中的细胞是衰老细胞并且它们对外源生长因子的响应降低。慢性伤口愈合过程受损的最终结果为组织破坏、局部坏死和感染。

[0004] 对伤口床的处理是实现最终伤口闭合必需的多阶段过程。清创术、控制感染和伤口闭合是慢性伤口愈合中的重要阶段。

[0005] 2005 年，医院获得性感染已被列为美国的第四大死因。据报导每年约一千万具有外伤性伤口的患者在美国的急诊部接受治疗。慢性伤口累及 1-3% 的总人口并且主要包括下肢静脉性溃疡、糖尿病足溃疡和压疮。由慢性静脉功能不全引起的静脉性溃疡在难愈慢性伤口中最常见（~ 70%）。

[0006] 慢性伤口感染导致危及生命的并发症的急诊病例的数量随着被抗生素抗性微生物感染的慢性伤口数量的增加而不断增加。细菌定植的存在是大多数慢性伤口发病机制中的最主要因素之一，引起伤口组织中高细菌计数和宿主炎症反应。

[0007] 在被感染的慢性伤口中，当被大量细菌感染时创伤愈合会延迟甚至停止。减少细菌载量非常关键并且应该在愈合过程之前进行。为了优化伤口愈合过程，通常有必要与减少细菌载量一起对潜在的影响因素例如营养不良和缺血进行治疗。

[0008] 慢性伤口感染延迟愈合并且经常引起慢性伤口床的情况恶化，这也会引起伤口的完全破坏。除了对伤口的有害作用，感染还能够引起在一些条件下是致命的全身作用。

[0009] 细菌污染通过数种不同的机制延迟伤口愈合，例如持续产生炎症介质，其导致炎症反应延长从而促使宿主损伤并且延迟愈合过程。另外，细菌与宿主细胞竞争伤口愈合过程必需的养分和氧。伤口感染还会导致组织缺氧、阻碍肉芽组织生长、减少成纤维细胞的数量和胶原产生并且破坏再上皮化。因此解决感染伤口清洗的问题是伤口护理的主要目标并且对伤口处理具有重要作用。

[0010] 一大部分足溃疡是由糖尿病并发症引起的。这些损伤经常被感染并且经常伴有骨髓炎。这些损伤中的大多数感染为轻度至中度并且可以通过适当的伤口护理和口服抗生素疗法进行治疗。但是一些感染扩散至筋膜、肌肉、关节和骨。在这些情况下，患者需要住院治疗、肠胃外抗生素治疗以及手术。在一些病例中，糖尿病患者的足感染难以治疗并且治疗失败常常导致下肢截肢。另外，由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）引起的糖尿病足感

染与延迟愈合相关并且在许多病例中与截肢相关。

[0011] 抗菌剂通常被用于预防和治疗伤口感染。与选择性作用于特异微生物的抗生素不同,抗菌剂具有多个靶点和较宽的活性范围。大多数现有抗菌剂未显示明显地阻碍愈合。

[0012] 在可商购的抗菌剂中,临床最常使用的为碘、氯己定、乙醇、醋酸、过氧化氢、溴酸、硝酸银、磺胺嘧啶银和次氯酸钠。但是鉴于近期报导的与被污染的抗菌剂相关的疾病爆发,它们的功效似乎具有局限性 [Weber 等人,2007, *Antimicrob Agent Chemother*51:4217-4224]。

[0013] 银化合物被广泛用作伤口抗菌剂以对抗慢性伤口和包括烧伤在内的急性伤口的细菌感染 [Burrell2003, *Ostomy Wound Manag*49:19-24 ;Ovington2004, *Ostomy Wound Manag*50:1S-15]。已知银可以阻断革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的生长。银离子可以杀灭微生物但是它对于增殖的肉芽组织无细胞毒性。银制剂表现出可增加微生物杀灭的速率和程度,减少渗出液形成并且据近期报导可作用于细菌被膜。

[0014] 最常使用的银化合物是磺胺嘧啶银 (SSD) 和硝酸银 ( $\text{AgNO}_3$ )。其他通常使用的局部用含银药剂是银纳米晶颗粒。磺胺嘧啶银 (SSD) 通常被用作预防烧伤患者感染的治疗 [Klasen2000, *Burns*26:131-138]。已研发了银纳米晶释放系统例如 **Acticoat®** [Tredget 等人,1998, *J. Burn Care Rehabil.* 19:531-537] 以延长其功效。对具有被感染的慢性压疮的患者进行 SSD 治疗并且在所有溃疡中观察到细菌载量有效减少。SSD1%霜剂可显著减少静脉性溃疡、对伤口清洗和肉芽组织形成具有正向作用。

[0015] 硝酸银最早被用于慢性伤口和溃疡的治疗 [Klasen2000, *Burns*26:131-138]。已发现其对宽范围的菌群特别是对革兰氏阴性菌有效。后来将银纳米晶以缓释制剂掺入伤口敷料中用于治疗包括烧伤在内的急性和慢性伤口 [Voight 等人,2001, *Wounds*13:B11-B21 ; Sondi 和 Salopek-Sondi2004, *J Colloid Interf Sci*275:177-182 ;Parsons 等人,2005, *Wounds*, 17:222-232]。

[0016] 用于局部伤口治疗的含银制剂大多是基于含银的伤口敷料。将银离子通过此类敷料递送并扩散至感染伤口常常受限于导致非活性氯化银沉淀的例如与氯离子的化学反应,减少了到达靶感染区域的抗菌银离子的有效量。其他缺点包括由银引起的着色和局部刺激。

[0017] 在普遍并且过多地使用基于银的局部治疗用于处理伤口的同时还注意到关于细菌银耐药性的报导的数量增加 [Silver2003, *FEMS Microbiology Reviews*27:341-353 ; Chopra2007, *J Antimicrobial Chemotherapy*59:587-590]。

[0018] 薄荷醇是植物来源的天然单萜,其常常作为止痒、防腐、镇痛和 / 或清凉制剂的一部分用于皮肤病。最近报导了构成薄荷醇对这些活性特别是对抗菌活性的作用基础的分子机制 [Patel,2007, *J Am Acad Dermatol*57:873-878 ;Evrard2001, *Pharma Resear*18:943-949 ;Trombetta 等人,2005, *Antimicrob Agent Chemother*49:2474-2478 ; Schelz 等人,2006, *Fiterapia*77:279-285 ;Cristani 等人 2007, *J Agri Food Chem*55:6300-6308]。

[0019] 预期高渗溶液通过减少微生物载量、加强渗出液的清除和对体液循环的影响而增加对伤口床处理的益处。已证明高渗盐溶液是神经外科实践中非常有用的工具。

[0020] 相关技术包括第 5,643,589 和 5,562,643 号美国专利。

[0021] 这些技术中将薄荷醇记载为还可用于皮肤病应用的止痒剂、抗菌剂、镇痛剂和清凉剂。还记载了包含银离子和薄荷醇的组合物。

[0022] 例如默克手册在“皮肤病局部治疗原则”一章中建议将薄荷醇和银组合用于皮肤病组合物 ([www.merck.com/mmpe/print/sec10/ch110/ch110a.html](http://www.merck.com/mmpe/print/sec10/ch110/ch110a.html))。其中将银定义为抗菌剂并且将薄荷醇定义为止痒剂(抗痒剂)。

[0023] 另外的相关技术包括第 PCT/IL2007/000015 号国际专利申请、第 6,551,608 号美国专利、第 11/783,668 号美国专利申请(公开号 20070255193)和第 10/535,961 号美国专利申请(公开号 20060105000)。

[0024] 包含银离子的抗菌组合物还记载于第 5,607,683 号美国专利和第 6,093,414 号美国专利。

[0025] 治疗液连续冲流(CST)是由本发明人和其他人员一起研发的新的慢性伤口处理方式,并且涉及新鲜剂量的治疗液连续冲流入受控的创伤环境中。在慢性伤口上冲流(stream,流动)使得能够实现对伤口的抗菌抑制(aseptic confinement)、负压治疗(不需使用泵)、润湿伤口、对伤口床的连续清洗和整体处理。此类连续冲流疗法记载于例如本发明一些发明人的第 7,364,565 号美国专利中。

## 发明内容

[0026] 在研究性能改善的抗菌组合物时,本发明人出乎意料地发现银离子和薄荷醇的组合物表现出协同作用。

[0027] 已进一步发现该活性在高渗剂存在下得以保留。

[0028] 因此,本文公开当在等渗或高渗介质中与低浓度薄荷醇组合时基于银离子的抗菌组合物表现出协同作用,其中所述银离子以低于通常用于抗菌(防腐)目的的浓度存在。此类组合物能够对广谱的病原微生物发挥抗微生物活性同时能够实现缓解疼痛、清凉和伤口愈合,而与现有含银离子溶液经常观察到的不良副作用例如着色和刺激无关。

[0029] 已进一步证明包含与浓度为 0.05% w/v 至 0.5% w/v 的薄荷醇和高渗剂例如甘油组合的浓度为 0.005% w/v 至 0.5% w/v 的银离子或其络合物的抗菌组合物为无沉淀的澄清溶液。

[0030] 因此,可以使用本文所述的抗菌组合物有效治疗急性和慢性伤口例如糖尿病溃疡。此外,当将本文所述的防腐组合物以连续流施用至伤口上并通过伤口从而将与伤口接触的抗微生物药剂和高渗剂的浓度保持恒定时,可达到较高的伤口愈合率。

[0031] 已进一步证明此类抗菌组合物可通过预防或减少非无菌条件下的细菌生长充当防腐剂(preservative)。

[0032] 已进一步证明此类抗菌组合物表现出优于商购抗真菌产品的有效的杀真菌活性。已进一步证明本文所述的抗菌组合物和基于聚己缩胍(polyhexadine)的商购抗菌产品的组合、连续治疗对抑制各种真菌菌株的生长非常有效,尤其是当首先使用银抗菌组合物时。

[0033] 根据本发明的一些实施方案的一个方面提供了包含作为活性成分的薄荷醇和银离子源以及药学可接受的载体的抗菌组合物,其中银离子在该组合物中的浓度低于 6mM。

[0034] 在一些实施方案中,所述薄荷醇和银离子具有协同作用。

[0035] 在一些实施方案中,薄荷醇的浓度为 0.3mM 至 32mM。

- [0036] 在一些实施方案中,薄荷醇的浓度为 0.6mM 至 6.4mM。
- [0037] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.05mM 至 6mM。
- [0038] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.25mM 至 0.6mM。
- [0039] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.25mM 至 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.6mM 至 6.4mM。
- [0040] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 6.4mM。
- [0041] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。
- [0042] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.64mM。
- [0043] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.44mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。
- [0044] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。
- [0045] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.64mM。
- [0046] 在一些实施方案中,所述银离子源选自硝酸银、磺胺嘧啶银 (silver sulfadiazine)、氨基醇-银离子络合物、氨基酸-银离子络合物以及聚合物-银离子络合物。
- [0047] 在一些实施方案中,所述聚合物-银离子络合物为聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)-银离子络合物。
- [0048] 在一些实施方案中,所述抗菌组合物还包含高渗剂。
- [0049] 在一些实施方案中,所述高渗剂选自甘油、聚乙二醇、多糖、甘露醇以及它们的组合。
- [0050] 在一些实施方案中,所述高渗剂是甘油。
- [0051] 在一些实施方案中,基于抗菌组合物的总体积,甘油的浓度为 3% v/v 至 15% v/v。
- [0052] 在一些实施方案中,基于抗菌组合物的总体积,甘油的浓度为 10% v/v。
- [0053] 在一些实施方案中,所述高渗剂是聚乙二醇 (PEG)。
- [0054] 在一些实施方案中,基于抗菌组合物的总体积,PEG 的浓度为 8% v/v 至 16% v/v。
- [0055] 在一些实施方案中,所述抗菌组合物还包含增溶剂。
- [0056] 在一些实施方案中,所述增溶剂是 TWEEN20 (吐温 20)。
- [0057] 在一些实施方案中,所述药学可接受的载体是水溶液。
- [0058] 在一些实施方案中,将所述抗菌组合物配制成局部剂型。
- [0059] 在一些实施方案中,所述局部剂型选自霜剂、喷雾剂、纱布、擦剂、海绵体、无纺布、棉布、泡沫剂、溶液剂、洗剂、软膏剂、糊剂和凝胶剂。
- [0060] 根据本发明实施方案的一个方面提供包括包装材料和包装于该包装材料内的如本文所述的抗菌组合物的抗菌试剂盒。
- [0061] 在一些实施方案中,在包装材料之内或之上以印刷方式指明所述试剂盒抗菌试剂盒用于表面消毒。
- [0062] 在一些实施方案中,所述表面为身体表面。
- [0063] 在一些实施方案中,在包装材料之内或之上以印刷方式指明所述试剂盒抗菌试剂盒用于处理伤口。
- [0064] 在一些实施方案中,所述伤口选自急性伤口、慢性伤口、烧伤和手术伤口。
- [0065] 在一些实施方案中,所述慢性伤口选自糖尿病溃疡、静脉性溃疡和压疮。

[0066] 在一些实施方案中,将银离子源、薄荷醇和药学可接受的载体中至少之一单独包装于所述包装材料中。

[0067] 在一些实施方案中,将银离子源、薄荷醇和药学可接受的载体各自单独包装于所述包装材料中。

[0068] 在一些实施方案中,将银离子源、薄荷醇和药学可接受的载体一起包装于所述包装材料中。

[0069] 根据本发明实施方案的一个方面提供用于对表面进行消毒的方法,所述方法包括将有效量的本文所述的抗菌组合物施用至表面,由此对该表面进行消毒。

[0070] 在一些实施方案中,所述表面是身体表面,所述方法是用于消毒有此需要的患者的身体表面。

[0071] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述抗菌组合物局部施用至身体表面。

[0072] 在一些实施方案中,所述身体表面为皮肤组织。

[0073] 在一些实施方案中,所述方法是用于处理(treat,治疗)所述身体表面内的感染。

[0074] 在一些实施方案中,所述感染是由选自细菌、酵母和真菌的致病微生物引起的。

[0075] 根据本发明实施方案的一方面提供在有此需要的患者中治疗如本文所述的伤口的的方法,所述方法包括将有效量的本文所述的抗菌组合物施用至伤口区域,由此对该伤口进行处理。

[0076] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述抗菌组合物局部施用至伤口区域。

[0077] 在一些实施方案中,通过使抗菌组合物液流(fluid)在伤口区域上流动并流过伤口区域而进行抗菌组合物的施用。

[0078] 在一些实施方案中,该液流(流)是由来自至少一个包含所述抗菌组合物的贮器的重力引起的。

[0079] 在一些实施方案中,该液流(流)是由与至少一个包含所述抗菌组合物的贮器成液体流通的泵引起的。

[0080] 本发明一些实施方案的一方面提供了本文所述抗菌组合物在制备用于表面消毒的产品中的用途。

[0081] 在一些实施方案中,所述产品为用于消毒身体表面的药物。

[0082] 在一些实施方案中,所述药物是用于治疗所述身体表面内的感染。

[0083] 在一些实施方案中,所述感染是由选自细菌、酵母和真菌的致病微生物引起的。

[0084] 本发明一些实施方案的一方面提供了本文所述抗菌组合物在制备用于处理本文所述伤口的药物中的用途。

[0085] 本发明一些实施方案的一方面提供了制备本文所述抗菌组合物的方法,所述方法包括将银离子源、薄荷醇和药学可接受的载体混合,由此获得抗菌组合物。

[0086] 在一些实施方案中,所述方法还包括将高渗剂与所述组合物混合。

[0087] 在一些实施方案中,所述方法还包括将增溶剂与所述组合物混合。

[0088] 在一些实施方案中,在将薄荷醇与银离子源和载体混合前将增溶剂与薄荷醇混合。

[0089] 在一些实施方案中,所述增溶剂是 TWEEN20(吐温 20)。

[0090] 根据本发明一些实施方案的一方面提供了降低包含银离子的抗菌组合物中银离



子浓度的方法,所述方法包括将银离子源与协同有效量的薄荷醇混合,由此降低抗菌组合  
物中银离子的浓度。

[0091] 在一些实施方案中,银离子的浓度被降低至少 2 倍。

[0092] 在一些实施方案中,银离子的浓度被降低至少 10 倍。

[0093] 本发明一些实施方案的一方面提供了增加包含浓度低于 6mM 的银离子的抗菌组  
合物的抗菌活性的方法,所述方法包括将该组合物与协同有效量的薄荷醇混合。

[0094] 除非另外定义,本文使用的所有技术和 / 或科学术语具有本发明所属领域的普通  
技术人员通常理解的含义。尽管可使用与本文所述那些相似或相等的方法和材料实施  
或检测本发明的实施方案,但是仍在下文描述了示例性方法和 / 或材料。如有冲突,以包  
括定义在内的专利说明书为准。另外,所述材料、方法和实施例为示例性的并且不意图一  
定具有限制作用。

### 附图说明

[0095] 通过结合附图仅以举例说明的方式在本文中描述本发明的一些实施方案。虽然现  
在具体详细地结合了附图,应强调所显示的细节仅为示例性的并且用于说明性讨论本发  
明的实施方案。就此而言,描述与附图一起使得如何实施本发明的实施方案对本领域技术  
人员是显而易见的。

[0096] 所述附图中:

[0097] 图 1 示出的图总体图解了在暴露于供试溶液 30 分钟并且随后洗涤之后培养 24 天  
后的真菌培养物的外观,表现出无生长(杀真菌作用,表示为“F”)、最小不良生长(抑制作  
用,表示为“IN”)或者完全生长(无作用,表示为“NE”)。

[0098] 图 2 至图 4 示出的图图解了在暴露于每一种供试溶液 30 分钟并且随后清洗之后  
培养 3、8、11 和 16 天后的已暴露真菌培养物的外观。供试溶液包括:如上文实施例 5 所  
述的包含银离子和薄荷醇的组合物(表示为“S”)、PRONTOSAN®(表示为“P”)、交替  
相继暴露于包含银离子和薄荷醇的组合物和 PRONTOSAN®(表示为“S+P”和“P+S”)、  
MICROCYN®(表示为“M”)和 ANACEPT®(表示为“A”)以及它们的稀释液(1:2;  
1:4;1:8)。供试真菌菌株为红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)的临床菌株(图 2)、红色  
毛癣菌的 NCPF118 商购菌株(图 3)和犬小孢子菌(*Microsporum canis*)的临床菌株(图  
4)。

### 具体实施方式

[0099] 本发明在其一些实施方案中涉及抗菌组合物及其用途,并且更具体而言但是不限  
于,涉及可有效用于消毒表面例如身体表面并且因此可有效用于例如治疗与感染相关的诸  
如急性和慢性伤口、烧伤和手术伤口的医学病症和 / 或用作防腐剂的抗菌组合物。

[0100] 本文所述抗菌组合物包含银离子源和薄荷醇,其中银离子和薄荷醇具有协同作  
用,因此使能够使用各自相对低的浓度。因此可容易地将本文所述的抗菌组合物制备成溶  
液(举例而言),其不含活性成分的沉淀并且不具有与现有的基于银离子的抗菌剂相关的  
不良副作用同时表现出高且宽范围的治疗功效。

[0101] 在详细阐述至少一个本发明的实施方案之前,应理解本发明的应用不一定受限于下文说明中所列或实施例中所举例说明的细节。本发明还有其他实施方案或者能够以各种方式实践或实施。

[0102] 本发明人已认识到对银的微生物抗性形成的潜在解决方法之一为使用银离子源和另一种与银离子一起表现出抗细菌(或抗微生物)协同作用的抗菌剂的组合。这样的组合使能够大大减少银使用量并且因此消除了由银离子引起的诸如伤口着色和刺激的副作用。但是这样的组合需基于所有成份与银离子的相容性从而避免银的潜在沉淀。如果所提出的组合物是相容的,可容易地获得用于协同抗微生物作用的可行性验证的检测(参见,例如 Mackay 等人,2000 Int J Antimicrob Agents 15:125-129;和 Peter 等人,2006, J Antimic Chemother 57:573-576)。

[0103] 尽管已知许多抗细菌、抗微生物和/或抗菌(防腐)剂,但是难以预测当这些药剂组合时是否具有协同作用。

[0104] 本文使用的术语“抗菌的(antiseptic)”描述一种药剂或组合物通过局部施用该药剂或组合物实现微生物载量减少和/或实现预防微生物载量增长的能力。因此抗菌组合物或药剂能够预防或阻止微生物(例如细菌、酵母和真菌)的生长或作用,其方式为抑制它们的活性和/或生长或者为破坏(杀灭)微生物。

[0105] 术语“抗菌剂”在本领域中通常用于描述用于局部施用至如下文详述的感染的活组织或任何其他感染的表面或具有被感染风险的表面的制剂。

[0106] 抗菌组合物和药剂在本文中还被称作抗微生物组合物或药剂。本文使用的术语“抗微生物剂”描述能够通过抑制微生物的活性、抑制微生物的生长或杀灭微生物来预防或阻止微生物的生长和/或作用的组合物或药剂。

[0107] 本文使用的术语“协同”、“协同效应”及其任何语法转换形式描述在两种或更多种生物活性化合物的组合中出现的协同作用,其中当两种化合物被同时使用时表现出的组合作用超过每一种化合物单独使用时作用的累加。因此通常当表示两种活性药剂的组合作用的数值大于每一种这些药剂单独作用时获得的同类数值的总和时可以确定存在“协同”。

[0108] 两种抗菌剂之间的协同可由本领域公知的方法来确定。

[0109] 如下文的实施例部分所示,出乎意料地发现银离子和薄荷醇具有协同作用。通过测量单独薄荷醇和单独银离子对各种细菌的抗菌活性并且与一起给药时它们的活性相比确定协同。如果一起给药时所观察到的两种药剂的抗菌活性超过将单独使用时所观察到的药剂的活性相加得到的预期累加抗菌活性,则认为这两种药剂具有协同作用。

[0110] 另外,当一起给予药剂时所表现出的抗菌活性的药剂代谢动力学参数优于将每一种药剂单独给药时所述药剂的抗菌活性的相同药剂代谢动力学参数,则可以证明并因此确定存在协同作用。示例性药剂代谢动力学参数为达到某一水平的抗菌作用所需要的时长。因此,如果当一起给药两种药剂时达到这一抗菌作用水平所需要的时长与每一种药剂单独给药时的这一时长相比有所减少,则认为这两种药剂具有协同作用。

[0111] 就这一点而言,应注意在药剂代谢动力学参数数值总和常常没有任何意义,因此相对于单独给药每一种化合物,将两种药剂合并给药后的药剂代谢动力学参数的任何改善均认为反应了协同作用。

[0112] 因此,已证明例如当对大肠杆菌 ATCC47076 菌株进行检测时分别观察包含浓度为

0.005% w/v + 0.1w/v、0.005% w/v+0.05% w/v、0.005% w/v+0.01% w/v、0.0075% w/v+0.05% w/v、0.01% w/v+0.05% w/v 以及 0.01% w/v+0.01% w/v 的银离子源 AgNO<sub>3</sub> 和薄荷醇的高渗溶液的协同抗菌活性（参见，下文表 1）。这些数值分别对应于 0.29mM+6.4mM、0.29mM+3.2mM、0.29mM+0.64mM、0.44mM+3.2mM、0.6mM+3.2mM 和 0.6mM+0.64mM 的银离子和薄荷醇摩尔浓度。具体而言，在这些浓度下，当单独给药时薄荷醇和银离子的累积抗菌活性低于将药剂一起给药时观察到的抗菌活性。

[0113] 还证明了银离子和薄荷醇对各种类型的细菌具有协同作用，包括克雷伯氏肺炎杆菌、金黄色葡萄球菌的耐甲氧西林临床菌株（MRSA）、表皮葡萄球菌的临床菌株、产超广谱 β 内酰胺酶的大肠杆菌的临床菌株、多重耐药性鲍氏不动杆菌的临床菌株以及多重耐药性绿脓假单胞菌的临床菌株（参见下文的表 2）。在这些研究中，通过与单独给药每一种药剂时观察到直至某一水平的抗菌活性的时长相比，观察到直至银离子和薄荷醇的相同水平的抗菌活性所测量到的更短的时长证明了银离子和薄荷醇的协同作用。

[0114] 还证明了包含银离子源和薄荷醇的溶液为无沉淀的澄清溶液。

[0115] 还证明了以 1:4 稀释所述组合物后获得这样的组合物的最小抑菌浓度，并且以 1:2 稀释所述组合物后获得这样的组合物的最小杀菌浓度（参见，下文实施例部分的表 3）。

[0116] 因此，当以至少 1:2 并且任选 1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.5、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4 甚至更高的稀释倍数稀释（例如 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 和 1:10）时，本文所述的抗菌组合物可有利地用于本文所述的任何方法中。

[0117] 还证明了 1:10 稀释后，包含银离子和薄荷醇的示例性组合物可防止非无菌样品中各种细菌和真菌菌株的生长（参见，下文实施例部分的实施例 5）。

[0118] 通过与商购产品 PRONTOSAN®、MICROCYN®、和 ANASEPT® 比较进一步证明了本文所述抗菌组合物的有益治疗作用（参见下文实施例部分的实施例 6 和图 2-4）。已证明本文所述抗菌组合物表现出对真菌菌株例如红色毛癣菌和犬小孢子菌的杀真菌活性，其超过了一些商购产品并且发现可与 PRONTOSAN® 有效组合。

[0119] 因此所观察到的银离子和薄荷醇组合物的协同作用能够提供具有浓度降低的银离子同时利用薄荷醇的其他有利性质例如其止痒作用、清凉剂作用等的抗菌组合物。

[0120] 这些发现证明包含银离子和薄荷醇的组合物可充当有效的抗菌组合物用于消毒表面例如身体表面并且因此可用于治疗或预防与感染相关的病症例如伤口，如下文详述。

[0121] 这些发现还证明包含银离子和薄荷醇的组合物可充当有效的抗菌组合物用于消毒例如医疗器械和保存容器的表面并且用于防止此类表面上微生物载量的增长。

[0122] 因此，根据本发明的一些实施方案的一方面提供了包含作为活性成分的薄荷醇和银离子源以及药学可接受的载体的抗菌组合物，其中银离子在该组合物中的浓度低于 6mM。

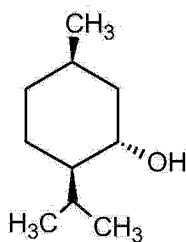
[0123] 根据一些实施方案中，薄荷醇和银离子具有如上文定义的协同作用。

[0124] 薄荷醇 (5-甲基-2-丙-2-基-环己-1-醇；CAS No. 89-78-1, MW = 156 克/mol) 是植物来源的天然单萜，常常作为止痒、抗菌、镇痛和或清凉制剂的一部分用于皮肤病。薄荷醇是一种蜡状晶体物质、透明或呈白色，其在室温下为固体并且在高于室温时略微融化。薄荷醇具有三个不对称中心并且以八种立体异构体存在：(+)-薄荷醇、(+)-异薄荷醇、(+)-新薄荷醇、(+)-新异薄荷醇、(-)-薄荷醇、(-)-异薄荷醇、(-)-新薄荷醇、(-)-新异

薄荷醇,均被本文使用的术语“薄荷醇”所涵盖。

[0125] 自然界中最常见的薄荷醇形式是(-)-薄荷醇立体异构体,其具有(1R, 2S, 5R)构型并且具有以下结构:

[0126]



(-)-薄荷醇

[0127] 本文使用的术语“银离子源”描述当存在于适当的介质中时生成银离子的化学部分。一旦化合物与本文所述的组合物载体混合即可生成银离子(例如水溶性银盐在水性载体中的情况)。或者,包含银离子的化学络合物降解后生成银离子,一旦将所述络合物置于组合物的载体中即发生所述降解。在此类化学络合物中,银离子通常以配位相互作用结合,而在银盐中,银离子以离子相互作用结合。

[0128] 在一些实施方案中,所述药学可接受的载体是水溶液。在这些实施方案中,所述银离子源优选是水溶性银盐例如硝酸银、醋酸银和部分水溶性磺胺嘧啶银。

[0129] 适合用于本发明背景中的银离子源的非限制性实例包括硝酸银、磺胺嘧啶银以及银离子络合物例如氨基醇-银离子络合物、氨基酸-银离子络合物和聚合物-银离子络合物。

[0130] 术语“氨基醇-银离子络合物”描述氨基醇(即包含胺官能团和醇官能团二者的分子)与银离子的络合物。此类络合物的非限制性实例包括氨基乙醇、氨基丙醇、2-氨基-2-(羟基甲基)-1,3-丙二醇和氨基丁醇。

[0131] 在一些实施方案中,氨基醇组分的浓度为约50mM。

[0132] 术语“氨基酸-银离子络合物”描述氨基酸(即包含胺官能团和羧酸官能团二者的分子)与银离子的络合物。在一些实施方案中,所述氨基酸选自天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物。此类络合物的非限制实例包括组氨酸-银(I)络合物、丝氨酸-银络合物和赖氨酸-银络合物。

[0133] 术语“聚合物-银离子络合物”描述聚合物与银离子的络合物。这样的络合物中的聚合物应具有一个或多个与银离子配位相互作用的官能团(例如羟基、氨基、氧代基(=O)、羧酸根、酰胺等)。所述聚合物可为合成的、天然的或半合成的聚合物并且优选为生物相容的。这样的聚合物-银离子络合物的非限制实例包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-银离子络合物、聚丙烯酰胺-银离子络合物和聚赖氨酸-银离子络合物。

[0134] 根据一些实施方案,所述聚合物-银离子络合物为聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-银离子络合物。

[0135] 聚乙烯吡咯烷酮是一种水溶性聚合物,其具有良好的安全性并且广泛应用于医学、药理学、化妆品和工业产品中。聚乙烯吡咯烷酮容易形成薄膜并且可用作许多药物片剂的粘合剂。

[0136] 在一些实施方案中,当银离子源是聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)-银离子络合物时,以抗菌组合物的总体积计,抗菌组合合物中聚合物的浓度为 0.2% w/v 至 10% w/v。

[0137] 如本文所使用,“% w/v”描述组分或药剂在组合物总体积中的重量百分数。因此,例如 1% w/v 描述 100ml 组合物含有 1mg 组分或药剂。

[0138] 尽管“% w/v”单位表示一定体积中存在的质量,其还可以表示为摩尔浓度,即摩尔每升 M)。

[0139] “% v/v”单位描述组分或药剂在组合物总体积中的体积百分数。

[0140] 如上文所述,薄荷醇和银离子具有协同作用这一出乎意料的发现使得能够使用与通常用于发挥抗菌活性的每一种药剂的浓度相比包含浓度降低的每一种药剂的抗菌组合物,同时获得期望的抗菌活性。

[0141] 例如,通常将 0.5% w/v 浓度的基于硝酸银的抗菌(防腐)溶液用于治疗严重烧伤 [Sweetman SC(ed)Martindale:The complete drug reference35, London:Pharmaceutical press, 2007]。

[0142] 如上文进一步讨论,该浓度相对较高并且会引起不良反应例如伤口着色和刺激。

[0143] 0.5% w/v 浓度的硝酸银对应于约 30mM。

[0144] 目前已知的用于局部给药的组合物中的薄荷醇的浓度为用于治疗高热和黏膜炎(厚重的粘膜渗出液)的施用至鼻粘膜的 0.25w/v%至用于治疗神经痛、坐骨神经痛和腰痛的 20% w/v。

[0145] 上述薄荷醇浓度范围对应于约 15mM 至约 1.3M。

[0146] 本文中应注意尽管薄荷醇的抗菌性质是已知的,但是在该领域中未发现薄荷醇在抗菌组合物中的建议浓度的指示。

[0147] 如下文实施例部分所示例说明的,除非与薄荷醇组合,低于目前抗菌组合物中可接受的浓度的硝酸银(即 0.005% w/v 至 0.01% w/v,对应于约 0.29mM 至约 0.6mM)具有有限的抗菌活性(参见表 1)。以对应于约 0.6mM 至约 6mM 的 0.01w/v%至 0.1w/v%的浓度加入薄荷醇引起抗菌活性大大增强。

[0148] 如下文实施例部分进一步示例说明的,上文所述较低浓度的硝酸银溶液的有限的抗菌活性还从表现出杀菌活性所需的时长得以证明(参见,表 2)。加入低浓度的薄荷醇引起该时长大大缩短。

[0149] 不愿受到任何具体理论的约束,假设除薄荷醇发挥的抗菌活性之外,将银离子与薄荷醇一起给药时所观察到的协同防腐活性还由薄荷醇充当渗透促进剂的能力所引起,其增加了渗透进入感染区域和/或微生物细胞的银离子的量和渗透速率。

[0150] 因此,根据本发明的一些实施方案,本文所述抗菌组合物中薄荷醇的浓度为约 0.3mM 至约 35mM。以抗菌组合物的总体积计,该浓度范围对应于在 0.005% w/v 至 0.5% w/v 范围的% w/v 薄荷醇浓度。

[0151] 在一些实施方案中,薄荷醇的浓度为约 0.6mM 至约 6.4mM。以抗菌组合物的总体积计,该摩尔浓度范围对应于 0.01% w/v 至 0.1% w/v 的% w/v 薄荷醇浓度。

[0152] 在一些实施方案中,选择银离子源的浓度从而提供组合物中约 0.05mM 至约 6mM 的银离子浓度。

[0153] 因此,在一些实施方案中,银离子源的浓度使得组合物中银离子的浓度为例

如 0.05mM、0.06、mM、0.07mM、0.08mM、0.09mM、0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM 或 6mM。还设想 0.05mM 和 6mM 之间的任何其他银离子浓度数值。

[0154] 在一些实施方案中,所述银离子源是  $\text{AgNO}_3$  并且以抗菌组合物的总体积计  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.001% w/v 至 0.5% w/v。在一些实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.005% w/v 至 0.01% w/v。在一些实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.001% w/v 至 0.5% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.005% w/v 至 0.5% w/v。在一些实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.001% w/v 至 0.5% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.005% w/v 至 0.5% w/v。

[0155] 基于银离子源在所选择载体中的溶解度和 / 或降解程度、其分子量以及从银离子源的每一个分子生成的银离子的数量可容易地确定提供这样的银离子浓度的银离子源的浓度。

[0156] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM 至 0.6mM。

[0157] 因此存在于本文所述的抗菌组合物中的银离子的浓度可为例如 0.06mM(0.001% w/v  $\text{AgNO}_3$ )、0.29mM(0.005% w/v  $\text{AgNO}_3$ )、0.6mM(0.01% w/v  $\text{AgNO}_3$ )、2.9mM(0.05% w/v  $\text{AgNO}_3$ ) 或 5.9mM(0.1% w/v  $\text{AgNO}_3$ ), 均大大低于现有抗菌组合物中通常使用的银离子浓度。

[0158] 在本发明的一些实施方案中,银离子的浓度为 0.05mM 至 6mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.29mM 至 32mM。

[0159] 在一些实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM 至 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.6mM 至 6.4mM。

[0160] 在一实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 6.4mM。

[0161] 在另一实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。

[0162] 在另一实施方案中,银离子的浓度为 0.29mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.64mM。

[0163] 在另一实施方案中,银离子的浓度为 0.4mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。

[0164] 在另一实施方案中,银离子的浓度为 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 3.2mM。

[0165] 在另一实施方案中,银离子的浓度为 0.6mM, 并且薄荷醇的浓度为 0.64mM。

[0166] 在另一实施方案中,当银离子源是  $\text{AgNO}_3$  时,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.01% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.05% w/v。

[0167] 在另一实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.01% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.01% w/v。

[0168] 在另一实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.0075% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.05% w/v。

[0169] 在另一实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.005% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.1% w/v。

[0170] 在另一实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.005% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.05% w/v。

[0171] 在另一实施方案中,以抗菌组合物的总体积计,  $\text{AgNO}_3$  的浓度为 0.005% w/v 并且薄荷醇的浓度为 0.01% w/v。

[0172] 在本发明的一些实施方案中,本文所述抗菌组合物还包含高渗剂。

[0173] 本文使用的术语“高渗剂”描述升高在其施用位点的渗透压的物质。高渗剂旨在增加微生物例如细菌周围的渗透压从而杀灭或抑制微生物的生长。包含高渗剂的组合物具有比等渗液体更高的渗透压。通常,这样的组合物具有高于生理压力的渗透压。

[0174] 适合用于本发明实施方案背景中的示例性高渗剂包括但不限于甘油、聚乙二醇(PEG)、多糖、甘露醇以及它们的任意组合。

[0175] 在一些实施方案中,所述高渗剂与银离子源和薄荷醇是相容的,使得当其存在于抗菌组合物中时不引起沉淀。

[0176] 因此,选择高渗剂的浓度使其与它们在抗菌组合物中使用的药学可接受的载体中的溶解度相容,从而提供渗透压高于等渗溶液渗透压的组合物。

[0177] 在一些实施方案中,所述高渗剂是生物相容的。

[0178] 如本文所使用,术语“生物相容的”描述当施用至活体器官、细胞或组织时无毒且无免疫原性的制剂或组合物。

[0179] 在一些实施方案中,所述高渗剂是丙三醇(甘油)。

[0180] 丙三醇是通常被称作甘油(glycerin)的化学化合物。其为无色、无臭的粘性液体并且具有低毒性,广泛用于药剂制剂中。

[0181] 以组合物的总体积计,甘油优选以3% v/v至15% v/v的浓度存在于抗菌组合物中。

[0182] 如本文所使用并且在本领域中,浓度单位“% v/v”描述制剂或组分在组合物总体积中的体积百分数。因此,例如1% v/v表示100ml组合物中含有1ml制剂或组合物。

[0183] 在一些实施方案中,甘油的浓度为10% v/v。

[0184] 在一些实施方案中,所述高渗剂是聚乙二醇(PEG)。

[0185] PEG是柔性的无毒(生物相容的)水溶性聚合物。可以商购300Da至10,000KDa的宽范围分子量的PEG。由于其特性,PEG可用于产生渗透压。

[0186] 适用于本实施方案背景中的示例性PEG包括但不限于可商购的低分子量PEG例如PEG200(Da)、PEG300(Da)和PEG400(Da)。以组合物的总体积计,PEG优选以8%至16% v/v的浓度存在于抗菌组合物中。

[0187] 如上文所述,已证明本文所述抗菌组合物形成不含沉淀的澄清溶液。这样的组合物是有利的因为当采用任何可用的局部施用技术时可容易地将它们施用至表面。

[0188] 在一些情况下,可将增溶剂或任何其他物质加入组合物中以辅助其组分的完全溶出。

[0189] 因此,根据本发明的一些实施方案,所述组合物还包含增溶剂。

[0190] 如本文所使用并且在本领域中,术语“增溶剂”描述能够辅助不溶性或溶解性差的组分在包含所述组分的溶液中溶解的化学物质。

[0191] 根据本发明的一些实施方案,增溶剂应与所使用的银离子源相容从而避免不溶性银盐沉淀。

[0192] 应注意大多数银盐是不溶性的或者在水溶液中具有有限的溶解度,因此应根据其对组合物中银溶解度的作用考虑加入本文所述抗菌组合物中的任何组分,从而维持组合物中可溶银离子的有效浓度。

[0193] 适用于本发明背景中的增溶剂的代表性实例包括但不限于形成络合物的增溶剂

例如环糊精、聚乙烯吡咯烷酮和形成胶束的增溶剂例如吐温和司盘 (span), 例如 TWEEN80 和 TWEEN20。适用于本发明实施例的背景中的其他增溶剂包括但不限于聚氧乙烯山梨糖脂脂肪酸酯、聚氧乙烯正烷基醚、正烷基胺正氧化物、泊洛沙姆、有机溶剂、磷脂和环糊精。

[0194] 增溶剂的选择是基于其与银离子相容而不导致银在所选载体中沉淀。

[0195] 如下文实施例部分所述, 将薄荷醇与适当的增溶剂例如 TWEEN20 等组合用于本文所述的组合物中。所述增溶剂有助于形成包含银离子源和薄荷醇的稳定且澄清的溶液。

[0196] 因此, 在一些实施方案中, 所述增溶剂是 TWEEN20。根据一些实施方案, 薄荷醇和 TWEEN20 的比为 1:10, 例如 0.05% w/v 薄荷醇和 0.5% w/v TWEEN20。

[0197] 不愿受到任何具体理论的约束, 已表明由于 TWEEN20 的渗透促进性质, 所以向本文所述组合物中加入 TWEEN20 还可提供组合物的增强的活性。因此表明银离子、薄荷醇和 TWEEN20 均具有协同作用, 因此进一步使得能够在抗菌组合物中使用低浓度的银离子同时表现出期望活性。

[0198] 本文所述抗菌组合物还可包含旨在改进或辅助其制备、施用和 / 或性能的另外的成分。此类另外的成分包括例如抗刺激剂、抗起泡剂、润湿剂、脱色剂、止汗剂、pH 调节剂、抗菌剂、乳化剂、封闭剂、软化剂、增稠剂、渗透促进剂、着色剂、抛射剂 (视组合物的最终形式而定) 和表面活性剂。

[0199] 适合用于本发明背景中的润湿剂的代表性实例包括但不限于胍、乙醇酸和乙醇酸盐 (例如铵盐和烷基季铵盐)、以多种形式中的任何一种形式的芦荟 (例如芦荟凝胶)、尿囊素、尿唑、多羟基醇例如山梨醇、甘油、己烷三醇、丙二醇、丁二醇、己二醇等、聚乙二醇、糖和淀粉、糖和淀粉衍生物 (例如烷氧基化葡萄糖)、透明质酸、乳酸胺单乙醇胺、乙酰胺单乙醇胺以及它们的任意组合。

[0200] 适合的 pH 调节剂包括例如三咪唑三甲胺缓冲剂和与其他组分相容而不引起任何一种组分沉淀的任何其他缓冲液。

[0201] 适用于本实施方案背景中的脱色剂的代表性实例包括但不限于 2, 4, 4'-三氯-2'-羟基二苯基醚和二氨基烷基酰胺例如 L-赖氨酸十六烷基酰胺。

[0202] 适合用于本实施方案背景中的适合的防腐剂 (preservative) 包括但不限于一种或多种烷醇、尼泊金例如尼泊金甲酯和尼泊金丙酯、丙二醇、山梨酸酯、尿素衍生物例如重氮烷基脲或它们的任意组合。

[0203] 适合用于本实施方案背景中的适合的乳化剂包括例如一种或多种山梨糖、烷氧基化脂肪醇、烷基多糖苷、肥皂、烷基硫酸盐或它们的任意组合。

[0204] 可用于本发明背景中的适合的封闭剂包括例如凡士林油、矿物油、蜂蜡、硅油、羊毛脂和油溶性羊毛脂衍生物、饱和和不饱和的脂肪醇例如二十二醇、烃例如角鲨烷以及各种动物和植物油例如杏仁油、花生油、小麦胚芽油、亚麻籽油、荷荷芭油、杏核油、胡桃油、棕榈坚果油、开心果油、芝麻籽油、油菜籽油、杜松油、玉米油、桃核油、罂粟子油、松油、蓖麻油、大豆油、鳄梨油、红花油、椰子油、榛子油、橄榄油、葡萄籽油以及向日葵籽油。

[0205] 可用于本实施方案背景中的适合的软化剂包括例如十二烷、角鲨烷、胆固醇、异十六烷、异壬酸异壬酯、PEG 醚、凡士林油、羊毛脂、红花油、蓖麻油、椰子油、大豆油、多元醇羧酸酯以及它们的衍生物和它们的混合物。

[0206] 可用于本实施方案背景中的适合的增稠剂包括例如非离子水溶性聚合物例



如羟乙基纤维素（以商品名 **Natrosol®** 250 或 350 购买）、阳离子水溶性聚合物例如 Polyquat37（以商品名 **Synthalen®** CN 购买）、脂肪醇以及它们的混合物。

[0207] 可用于本实施方案背景中的适合的渗透促进剂包括但不限于聚乙二醇单月桂酸酯 (PEGML)、丙二醇 (PG)、丙二醇单月桂酸酯 (PGML)、甘油单月桂酸酯 (GML)、卵磷脂、1-取代氮杂环庚-2-酮, 特别是 1-正十二烷基环氮杂环庚-2-酮（以商品名 **Azone®** 购自 Whitby Research Incorporated, Richmond, Va.）、醇类、薄荷醇、吐温例如 TWEEN20 等。渗透促进剂还可为植物油。此类油包括例如向日葵籽油、棉籽油和玉米油。

[0208] 可用于本实施方案背景中的适合的抗刺激剂包括例如甾体和非甾体抗炎药或其他物质例如薄荷醇、芦荟、甘菊、 $\alpha$ -红没药醇、可拉提取物、绿茶提取物、茶树油、甘草提取物、尿囊素、咖啡因或其他黄嘌呤、甘草酸及其衍生物。

[0209] 优选选择本文所述的任何另外的成分或物质使其与至少组合物中所使用的浓度范围内的银离子相容, 从而不产生沉淀并且不影响组合物中银离子的利用度。

[0210] 本文所述的任何另外成分被进一步优选选择成是生物相容的。

[0211] 应注意包含于所述组合物中的一些物质或成分可提供双重作用。例如, 使薄荷醇与银离子协同作用以增强抗菌活性, 但是其还可用作渗透促进剂和抗刺激剂。TEEN20 可用作增溶剂但是还已知其可充当渗透促进剂。

[0212] 在一些实施方案中, 所述抗菌组合物还包含另外的治疗活性药剂, 例如能够治疗如本文所述的病症的药剂或者如下文进一步详述的能够消毒表面（例如身体表面）的药剂。在一些实施方案中, 所述抗菌组合物还包含能够预防、减少或抑制一种消毒微生物例如细菌或真菌的生长的药剂或者能够减少一种消毒微生物载量的药剂。

[0213] 在一些实施方案中, 所述抗菌组合物还包含能够处理本文所述伤口的另外的药剂。示例性另外的治疗活性药剂包括但不限于甜菜碱和聚己缩脲。

[0214] 可将本文所述的抗菌组合物与药学可接受且适合的载体一起配制。

[0215] 本文使用的术语“药学可接受的载体”描述用于辅助组合物给药并且不会对有机体引起明显的刺激并且不会破坏所给药的活性化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。载体的实例包括但不限于水、缓冲的水性溶液、丙二醇、有机溶剂和水的乳液和混合物以及固体（例如粉末）和气体载体。

[0216] 药剂的制剂和给药技术可参见最新版的“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, PA, 其通过援引纳入本文。

[0217] 因此可使用一种或多种可辅助将所述化合物加工成可以作为药剂使用的制剂的药学可接受的载体、赋形剂和 / 或辅剂以常规方式配制根据本实施方案使用的抗菌组合物。所述剂量可随所使用的剂型和所采用的给药途径而变化。

[0218] 每一位医生可视患者的病情选择准确的制剂、给药途径和剂量（参见, 例如 Fingl 等人, 1975, “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 第一章第一页）。

[0219] 药学可接受的载体可以是有机载体或者水性载体。在一些实施方案中, 所述载体是银离子源在其中可溶的水性载体。在一些实施方案中, 所述水性载体是缓冲液。

[0220] 水性载体优选包括注射用水, 即 USP 级“注射用水”。但是, 其他形式的纯化水也可能是适合的, 例如蒸馏水和去离子水。

[0221] 水性制剂是优选的,因为这些制剂对皮肤和粘膜组织是温和的并且适合用于开放的伤口。但是也设想非水性制剂。例如,在抗菌组合物为糊剂或乳剂形式的情况下,只要可以在载体中生成银离子,可使用非水性载体或水性和有机载体的混合载体。

[0222] 可将抗菌组合物配置成用于一种或多种途径给药,视待治疗的区域而定。

[0223] 根据一些实施方案,将所述抗菌组合物配制成为用于局部施用,例如局部剂型。

[0224] 本文使用的短语“局部剂型”描述适合用于局部给药至治疗区域的剂型。

[0225] 通过选择适合的载体和任选可包含于所述组合物中的其他成分,可将本文所述抗菌组合物配制成为任何正常用于局部施用的形式。因此,本文所述组合物可为例如以下形式:霜剂、软膏剂、糊剂、凝胶剂、洗剂、乳剂、溶液剂、气雾剂、喷雾剂、泡沫剂、纱布、擦剂、海绵纱布、无纺布、棉布、脱脂棉、贴剂和衬垫。

[0226] 示例性局部剂型包括但不限于霜剂、喷雾剂、纱布、擦剂、海绵纱布、无纺布、棉布、泡沫剂、溶液剂、洗剂、糊剂和凝胶剂。

[0227] 此类局部剂型还任选包含用于辅助将组合物长时间施用至治疗区域的粘合剂。

[0228] 在一些实施方案中,将所述抗菌组合物配制成为滴剂、喷雾剂、气雾剂、液体剂、泡沫剂等施用的液体药库。在这些情况中可使用适合的载体和其他成分。例如,对于以气雾剂或泡沫施用可使用抛射剂。

[0229] 在一些实施方案中,将所述抗菌组合物配制成为霜剂。示例性霜剂可通过将本文所述抗菌组合物与包含纤维素衍生物例如醋酸纤维素、羟乙基纤维素和/或聚乙二醇的载体混合而获得。

[0230] 待给药的组合物的量当然取决于被治疗的个体、疾病的严重度、给药方式、处方医师的判断等。

[0231] 可视需要将本发明组合物呈现于包装或分配器中,例如FDA(美国食品药品监督管理局)批准的试剂盒,其可包括一个或多个包含活性成分的单位剂量形式。所述包装可包含例如玻璃或塑料箔。所述包装或分配器可附有给药说明。所述包装或分配器还可附有由管理药剂的生产、使用或销售的政府机构规定形式的与所述容器相关的通告,该通告可反映该机构批准所述组合物形式用于人或兽给药。此类通告例如为由美国食品药品监督管理局批准的用于处方药的标签或者经批准的产品说明书。还可制备配制于相容的药学载体中的本发明组合物,将其置于适合的容器内并且标注用于消毒或处理伤口,如本文详述。

[0232] 可以任何便利的方式包装或呈现本文所述组合物。例如,可使用本领域技术人员公知的和参考文献例如 Remington's Pharmaceutical Science 第 15 版列出的技术将它们包装于管、瓶、分配器、可压缩容器或加压容器中。优选以这样一种方式进行包装以将未使用的组合物与环境的接触降至最低,从而在打开容器之前和之后将组合物的污染降至最低。

[0233] 优选以预期使用的浓度提供本文所述组合物,但是还可以制备成在使用前进行稀释的浓缩物。例如设想需要载体(例如水)与浓缩物为 2:1 至 10:1 的稀释比例的浓缩物。浓缩物的上限受限于较高浓度时各种组分的溶解度和相容性。

[0234] 在一些实施方案中,将本文所述抗菌组合物包装于包装材料内并且如本文所述在包装材料内或包装材料上以印刷方式指明用于消毒表面。

[0235] 在一些实施方案中,将本文所述抗菌组合物包装于包装材料内并且在包装材料内

或包装材料上以印刷方式指明用于消毒身体表面,如下文进一步详述。

[0236] 在一些实施方案中,将本文所述抗菌组合物包装于包装材料内并且在包装材料内或包装材料上以印刷方式指明用于处理伤口。

[0237] 在一些实施方案中,将本文所述抗菌组合物包装于包装材料内并且在包装材料内或包装材料上以印刷方式指明用于治疗感染,如下文进一步详述。

[0238] 本文所述组合物作为消毒剂和在处理伤口中的功效在下文实施例部分得到很好的证明。

[0239] 因此,根据本发明实施方案的另一面提供试剂盒,其包含包装于所述包装材料内的本文所述的抗菌组合物。

[0240] 如本文所述,例如通过在包装材料内或包装材料上以印刷方式标注所述试剂盒用于消毒和/或处理伤口。

[0241] 可将抗菌组合物的多种组分一起包装于包装材料内作为单一组合物,或者单独包装至少一种组分。当单独包装一种或多种组分时,还为所述试剂盒提供指明制备可立即使用的抗菌组合物的方法的说明书。此类说明书可与例如下文详细描述的准备抗菌组合物的方法一致。

[0242] 根据本发明的一些实施方案的另一面,提供消毒基体(substrate)的方法,其通过将有效量的本文所述抗菌组合物施用至所述基体上而实现,由此消毒所述基体。

[0243] 如本文通篇使用,术语“消毒”指减少基体内或基体上的微生物载量,降低基体内或基体上的微生物生长速率、抑制或防止基体内或基体上的微生物的生长和/或消除基体内或基体上的微生物。

[0244] 本文使用的术语“基体”指可不利地荷载、容纳或促进其表面上的微生物生长的任何结构、产品或材料。非限制性实例包括医疗设备、医疗仪器、医学和药学产品的容器、包装材料、用于药学、医学、农业、营养制品和食品工业的工业仪器和机器、墙壁、建筑、仓库、舱室、容器或运输工具、染料或油漆和任何其他材料以及需要保护它们的表面不被微生物侵袭的材料和工业化合物例如建筑材料。

[0245] 根据一些实施方案,通过例如用组合物洗涤基体、将组合物分散至基体表面、将组合物喷洒至基体表面或者将基体浸渍在组合物中实现将抗菌组合物施用至基体上。施用途径至少部分取决于组合物的形式。

[0246] 根据一些实施方案,所述基体为有此需要的个体的身体表面。

[0247] 本文使用的术语“个体”指任何动物例如哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物、哺乳动物、啮齿动物以及接受具体治疗的任何其他动物。通常,提及人类个体时,术语“个体”和“患者”在本文中可互换使用。

[0248] 根据一些实施方案,通过将抗菌组合物局部施用至身体表面上实现所述方法。根据一些实施方案,所述身体表面为可从局部施用受益的皮肤、皮肤组织、粘膜组合或者任何其他被感染的或可能被感染的身体区域。

[0249] 因此,本文所述抗菌组合物可用于消毒被感染的区域(例如急性或慢性伤口,如下文详述)或者用于预防存在被感染风险的区域的感染。后者包括例如手术伤口、急性伤口、溃疡等,它们非常容易被各种微生物感染。

[0250] 如上文所述,本文所述抗菌组合物表现出对各种细菌菌株的有效的杀菌活性以及

对各种真菌菌株的有效的杀真菌活性。因此,本文所述抗菌组合物可用于处理伤口,其中在伤口中减少微生物载量具有治疗益处。

[0251] 因此,根据本发明的一些实施方案的一方面提供在有此需要的个体中处理伤口的方法,所述方法包括将有效量的本文所述抗菌组合物施用至伤口区域,由此处理该伤口。

[0252] 根据一些实施方案,通过将抗菌组合物局部施用至伤口区域上实现所述方法。

[0253] 本文使用的术语“伤口”应根据其最宽泛的含义理解为用以描述受损的或被破坏的皮肤或粘膜区域,不论是否包含失活的或者焦痂组织,并且包括任何类型的伤口,包括但不限于急性伤口、慢性伤口、手术伤口、烧伤等。本文使用的术语“皮肤损伤”描述受损的皮肤并且在整个本申请中可与术语“伤口”互换使用。

[0254] 术语“伤口区域”描述与伤口相邻的区域。该区域通常从紧邻伤口延伸约 30cm。应理解伤口周围区域的内界可与伤口的形状一致或平行。

[0255] 术语“急性伤口”描述由外伤性磨损、撕裂或经表面损伤引起的并且最终通过伤口愈合的正常阶段(例如止血、炎症、增殖和重塑)自动愈合而无并发症的伤口。但是急性伤口如果与导致局部感染的致病微生物接触会出现并发症。

[0256] 在本文中可互换使用的短语“手术伤口”和“手术性伤口”描述由于手术而形成的伤口。手术伤口感染是常见感染,占有所有医院获得性感染的 12%。感染率视所进行手术的类型而变化。特别高的感染率与被污染的手术例如结直肠手术或者对外伤性伤口的延期手术相关。手术伤口感染通常是由患者的正常菌群或者来自环境或医务人员皮肤上的细菌引起的。导致手术伤口感染的最常见的微生物是金黄色葡萄球菌。其他常见的成因微生物包括其他革兰氏阴性好氧菌、链球菌属和厌氧菌。

[0257] 术语“烧伤”描述由热、冷、电、化学物质、光、辐射或摩擦引起的伤口。烧伤就受影响的组织、严重度以及所引起的并发症而言是高度变化的。肌肉、骨、血管和上皮组织均可受到损伤并且由于对神经末梢的长期损伤继而产生疼痛。根据受影响的位置和严重度,烧伤患者可能会经历多种可能致命的并发症,包括休克、感染、电解质失衡和呼吸性窘迫。感染是烧伤最常见的并发症并且是烧伤患者的主要死因。每年有超过一万的美国人死于烧伤的感染性并发症。通常感染烧伤伤口的致病微生物包括例如革兰氏阳性细菌例如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和革兰氏阴性细菌例如鲍氏不动杆菌-乙酸钙复合物、绿脓假单胞菌和克雷伯氏菌属。

[0258] 术语“慢性伤口”描述正常出现在以一些方式受影响的患者中并且难以愈合的无血块形成的伤口。慢性伤口的实例为慢性皮肤溃疡例如糖尿病溃疡、褥疮溃疡(压疮)和静脉性溃疡。

[0259] 术语“糖尿病溃疡”描述由与糖尿病相关的因素的组合引起的伤口,所述因素是例如循环减少、感觉丧失、结构性足畸形和皮肤完整性受损。糖尿病溃疡可为不会及时且有序愈合的皮肤简单破裂或者延伸至深层结构和骨的伤口。糖尿病溃疡经常是细菌和真菌微生物侵袭人体的进入点并且引起危及四肢和生命的感染,在本领域中通常被称作糖尿病性感染。糖尿病性感染通常是由多种好氧和厌氧微生物引起的涉及多种微生物的感染。金黄色葡萄球菌、 $\beta$ -溶血性链球菌、肠杆菌科、脆弱拟杆菌、消化球菌和消化链球菌是从糖尿病溃疡培养获得的示例性菌株。

[0260] 短语“褥疮溃疡”,也称作“压疮”,描述由诸如压力、摩擦、潮湿、剪切力、温度、年

龄、自控和药剂的各种因素对身体任何部分特别是骨和软骨区例如荐骨、肘、膝盖、踝等上面的部分引起的皮肤损伤。尽管如果在早期发现容易预防并且完全可以治愈,但是褥疮溃疡通常是致命的并且是发达国家所报导的主要医源性死因之一。褥疮溃疡可由血液供给不足和当血液重新进入组织时引起的再灌注不足引起。从压疮分离的最常见的微生物为奇异变形杆菌、D 族链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄菌属、假单胞菌属和棒状杆菌属微生物。

[0261] 术语“静脉性溃疡”描述被认为是由于通常是腿的静脉瓣功能障碍引起静脉压力增加而出现的伤口。它们是慢性伤口的主要诱因,出现在约 30-40%的慢性伤口病例中。大多数静脉性溃疡被细菌例如金黄色球菌、大肠杆菌、变形菌和假单胞菌严重感染。

[0262] 如上文所述,通过本文所述抗菌组合物减少急性伤口和慢性伤口例如糖尿病溃疡、褥疮溃疡(压疮)、静脉性溃疡以及烧伤的细菌细胞载量具有治疗益处。

[0263] 如上文进一步描述,已发现本文所述抗菌组合物可有效抑制各种细菌菌株的生长。例如,已证明根据本发明的一些实施方案的一种组合物即 0.01%银离子和 0.05%薄荷醇的溶液在接触后可有效杀灭细菌菌株大肠杆菌 ATCC47076、克雷伯氏肺炎杆菌、金黄色葡萄球菌的耐甲氧西林临床菌株(MRSA)、表皮葡萄球菌的临床菌株、产超广谱内酰胺酶的大肠杆菌的临床菌株、多重耐药性鲍氏不动杆菌的临床菌株以及多重耐药性绿脓假单胞菌的临床菌株并且阻止它们的生长(参见,表 3 和 4)。还证明了根据本发明的一些实施方案的一种组合物即 0.01%银离子和 0.05%薄荷醇的溶液表现出对红色毛癣菌临床菌株和犬小孢子菌临床菌株的杀真菌活性(参见,下文实施例 6 和图 2-4)。因此,由于本文所述抗菌组合物对包括已知从伤口区域分离的菌株在内的各种细菌和真菌菌株的抗菌活性,它们可有效用于伤口处理。

[0264] 如本文进一步论述和下文实施例部分所例证,已表明本文所述抗菌组合物可有效抑制微生物生长并且有效阻止各种微生物在非无菌(未消毒的)样品中的生长。

[0265] 因此,本文所述抗菌组合物可用于治疗或预防感染的方法中。所述感染可为细菌感染、真菌感染以及由酵母引起的感染,或它们的组合。

[0266] 本文所述包含银离子和薄荷醇的组合物的抗真菌活性在慢性糖尿病足溃疡的情况下以及在甲癣(真菌指甲感染,主要由皮癣菌红色毛癣菌引起)、皮肤癣菌病例如脚癣(脚气,也是由红色毛癣菌引起)和体癣(皮癣菌侵入皮肤)以及主要由犬小孢子菌引起的头癣(头皮癣和皮癣菌侵入头发)的抗真菌治疗中具有很大的治疗潜力。

[0267] 糖尿病和真菌足感染发病率之间存在显著相关性:在非糖尿病老年群体中该发病率为 60%,在糖尿病个体中该发病率增加至 80%。糖尿病对脚癣和甲癣二者的发病率具有显著的不利作用,导致 x 1.48 的增加比率。通常与脚癣相关的甲癣大大增加了其他感染和损伤的风险,最终导致溃疡和截肢。糖尿病患者中脚癣的发病率为 32%,相比而言对照群体中为 7% [Gupta AK, Humke S(2000) Eur J Dermatol 10:379-384 ;Saunte 等人, (2006) Acta Derm Venereol 86:425-428]。

[0268] 因此本文中通篇使用的术语“消毒”包括治疗如本文所述的感染。

[0269] 另外,本文所述的抗菌组合物还可用作防腐剂,用于预防或减少非无菌条件下和/或怀疑不利地为非无菌条件下的微生物载量的形成。

[0270] 因此可将本文所述抗菌组合物加入例如贮存容器中特别是用于保存和/或运输医用产品例如医疗设备、药用活性物质和药剂的容器中。

[0271] 根据本发明实施方案的另一些方面,提供了本文所述抗菌组合物在制备用于消毒本文所述基体的产品中的用途。

[0272] 根据本发明实施方案的另一些方面,提供了本文所述抗菌组合物在制备如本文所述的用于消毒身体区域表面和 / 或处理伤口的药剂中的用途。

[0273] 在本文所述的任何方法和用途中,可使用任何适合的方式将抗菌组合物施用至治疗区域。

[0274] 通常,将一些类型的吸收剂例如纱布、泡沫海绵、无纺布、棉布、棉拭子或棉球等浸渍于组合物中并且施用至伤口上。

[0275] 或者,所述组合物可为喷雾剂或气雾剂的形式,其还可包含例如成膜剂。因此可通过喷雾将所述组合物施用至治疗区域。

[0276] 又或者,所述组合物为霜剂、糊剂或凝胶剂的形式并且通过涂抹或者通过敷用包含所述组合物的粘性贴剂施用至伤口上。

[0277] 又或者且优选地,通过将所述抗菌组合物以连续液流施用至伤口上和通过伤口从而将与伤口接触的抗菌剂物和高渗剂的浓度保持恒定,可达到较高的伤口愈合率。

[0278] 因此,在本发明的一些实施方案中,通过使抗菌组合物液流在伤口区域上流动并流过伤口区域进行本文所述抗菌组合物的局部施用。

[0279] 将本文所述组合物液流在伤口上并通过伤口递送预定的一段时间。根据一些实施方案,将连续递送组合物液流进行至少 5 分钟,在一些实施方案中为至少 15 分钟,在一些实施方案中为至少 30 分钟,在一些实施方案中为至少 1 小时。对伤口进行监测以评价减少微生物载量和伤口愈合的进展。通过停止组合物液流并且除去任何阻碍患者自由移动的导管可实现短时间暂停治疗。可将与导管重新连接的封闭敷料留在伤口上。

[0280] 可使用如公开号为 2004/0186421 或 W02005/070480 的美国专利申请所记载的装置进行治疗,所述申请通过援引并入本文视同其全文在本文中陈述。

[0281] 根据示例性实施方案,此类装置包括具有在其中形成的至少一个孔隙和用于将该装置固定在皮肤损伤周围的皮肤上的装置的壳体,其中所述壳体包括 (i) 至少一个具有第一纵轴的入口管,并且被构造成可沿着其经过孔隙的纵轴调节;和 (ii) 至少一个具有第二纵轴的出口管。

[0282] 所述装置还包括适用于装载抗菌组合物的贮器,所述贮器与一个或多个入口成液体流通。出口可包括用于控制贮器和治疗区之间的流量的阀门。优选地,所述出口还可包括能够将壳体与贮器断开和重新连接的装置,由此能够暂停治疗。

[0283] 将患者与液流装置断开和再连接的简单性使能够将抗菌组合物施用更长的时间。抗菌组合物液流可持续至少一小时或者持续数小时,视个体需要而定。

[0284] 根据一些实施方案,所述液流是由来自至少一个包含所述抗菌组合物的贮器的重力引起的。

[0285] 根据一些实施方案,所述液流是由与至少一个包含所述抗菌组合物的贮器成液体流通的泵引起的。

[0286] 在一些实施方案中,所述液流是由不与流动液直接接触的蠕动泵引起的。

[0287] 根据本发明实施方案的另一方面提供了制备如本文所述的抗菌组合物的方法,所述方法包括将银离子源、薄荷醇和药学可接受的载体混合,从而获得抗菌组合物。

[0288] 根据一些实施方案中,所述方法还包括将高渗剂与所述组合物混合。

[0289] 组合物组分(即银离子源、薄荷醇、药学可接受的载体以及任选高渗剂)的加入顺序可随例如对溶解度的考虑而变化。

[0290] 因此,例如可通过制备银离子源和载体的溶液并且向其中加入薄荷醇来实施所述方法。或者,可通过制备薄荷醇和载体的溶液并且向其中加入银离子源来实施所述方法。

[0291] 如果存在高渗剂,可在加入银离子或薄荷醇中的任何一种之前或之后加入。相似地,可在任何阶段向组合物中加入如上文所述的任何其他成分。

[0292] 根据一些实施方案,所述方法还包括将所述薄荷醇与本文所述的增溶剂例如 TWEEN20 混合,由此获得薄荷醇和增溶剂的溶液;并且将所述薄荷醇溶液与所述组合物混合。

[0293] 在一些实施方案中,所述增溶剂是 TWEEN20。在一些实施方案,薄荷醇和 TWEEN20 的重量比为 1:10。在一些实施方案中,以薄荷醇和 TWEEN20 溶液的总积计,以 0.5% w/v 的浓度使用 TWEEN20。

[0294] 在一些实施方案中,银离子源和薄荷醇的量使得混合后银离子的终浓度为 0.05mM 至 30mM 并且薄荷醇的终浓度为 0.3mM 至 32mM w。在一些实施方案中,银离子源的终浓度为 0.3mM 至 0.6mM, 并且薄荷醇的终浓度为 0.6mM 至 6.4mM。

[0295] 考虑到将薄荷醇和银离子源组合所表现出的协同作用使的能够与现有抗菌产品相比使用浓度大大降低的银离子,根据本发明实施方案的另一面提供降低包含银离子(作为活性成分)的抗菌组合物中银离子浓度的方法。根据这些实施方案,通过将协同有效量的薄荷醇与银离子源混合实现所述方法。

[0296] 在一些实施方案中,与不含协同有效量的薄荷醇的抗菌组合物相比银离子浓度被降低至少 2 倍、至少 3 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍甚至以级数降低并且甚至是其两倍,或者被降低 30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍和 100 倍。

[0297] 在一些实施方案中,与不含协同有效量的薄荷醇的抗菌组合物相比,银离子浓度被降低 50 倍。

[0298] 短语“抗菌有效量”描述表现出如本文定义的抗菌活性的物质(在文中为银离子源)的量。

[0299] 术语“协同有效量”描述与抗菌组合物中的银离子源混合后的薄荷醇的浓度,其引起如本文定义的银离子与薄荷醇组合的协同作用。

[0300] 又根据本发明的实施方案提供了增加包含浓度低于 6 mM 的银离子源的抗菌组合物的抗菌活性的方法,所述方法包括将该抗菌组合物与协同有效量的薄荷醇混合。

[0301] 可根据本所述的抗菌组合物的制备方法实现将薄荷醇与抗菌组合物混合。因此,还可将另外的成分例如高渗剂和增溶剂与银离子混合。

[0302] 应理解,为了清楚起见描述于不同实施方案背景中的本发明的某些特征还可组合提供于一个实施方案中。相反的,为了简略起见描述于一个实施方案中的本发明的各种特征还可单独地或以任何适合的亚组合或适合地在本发明的任何其他所述实施方案中提供。不应认为各种实施方案背景中描述的某些特征是那些实施方案的必要特征,除非在不存在这些元素的情况下无法实施该实施方案。

[0303] 如上文所述以及如下文权利要求部分所要求的本发明的各种实施方案和方面可

在以下实施例中得到试验支持。

[0304] 实施例

[0305] 现参考以下实施例,其与上文说明一起以非限制性方式举例说明本发明的一些实施方案。

[0306] 材料和试验方法

[0307] 材料:

[0308] 通过磁力搅拌并且略微加热将 10 克 Tryptone (Cat. No. 161200, Pronadisa, Conda)、5 克酵母提取物 (Cat. No. 212750, DIFCO)、10 克 NaCl (Cat. No. 1.06404.1000, Merck) 和 2 克葡萄糖 (Cat. No. 1.08337.1000, Merck) 溶解于终体积为 1 升的高纯化水中制备 LB 培养基。通过向 LB 培养基中加入 15 克 Bacto 琼脂 (Cat. No. 214010, BD) 制备 LB-琼脂培养基。

[0309] BHI 生长培养基获自 Laboratory of Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance (分子流行病学和抗微生物抗性实验室), Tel Aviv Sourasky Medical Center。

[0310]  $\text{NaNO}_3$  获自 Riedel-deHa  $\text{N}$  (Cat. No. 31440)。

[0311] TWEEN20 (Cat. No. 8.17072.1000)、 $\text{AgNO}_3$  (Cat. No. 1.01510.0050)、薄荷醇 (Cat. No. 1.05995.1000)、甘油 (Cat. No. 1.04093.1000)、Tris (Cat. No. 1.08386.1000) 和冰醋酸 (Cat. No. 1.00056.2500) 获自默克。

[0312] 组合物

[0313] 通过向 50mM Tris-缓冲液中加入终浓度为 10% 的甘油 (高渗剂)、薄荷醇 (0.5% TWEEN-20) 和硝酸银制备硝酸银和薄荷醇的溶液。用冰醋酸将终组合物调节至 pH7.45, 然后滤过 0.22  $\mu\text{m}$  PES 膜滤器。如此获得的无菌溶液是澄清且不含沉淀的。

[0314] 通用方案:

[0315] E. 大肠杆菌生长方案:

[0316] 使大肠杆菌 ATCC47076 的冷冻原种在摇床培养箱 (37°C, 200rpm) 中过夜生长 (9ml LB 培养基中 1ml) 直至培养基的 OD600 达到 1.6-1.8。然后将一毫升培养基等分试样转移至 50ml 新鲜无菌 LB 培养基中并置于摇床培养箱中 (37°C, 200rpm) 培养两小时直至培养基的 OD600nm 达到 0.6-0.8 ( $2 \times 10^8$  菌落形成单位 /ml (CFU/ml))。通过用无菌培养基稀释将细菌悬浮液调节至  $10^8$  CFU/ml。然后用 0.9%  $\text{NaNO}_3$  将细菌细胞洗涤三遍。按照以下步骤进行  $\text{NaNO}_3$  洗涤循环:将 5ml 细菌悬浮液转移至 15ml 试管中并且于 4°C 将悬浮液 4000rpm 离心 4 分钟,然后除去上清并且将细菌细胞团块 (pellet) 重悬于 5ml 0.9%  $\text{NaNO}_3$  中。

[0317] 通过向如上文所述制备的细菌细胞团块中加入 5ml 供试组合物并且通过涡旋将细胞团块重悬来评价银离子 (来自  $\text{AgNO}_3$ ) 和薄荷醇 (加入 0.5% TWEEN20 增溶) 的各种浓度的组合物的杀菌活性。仅包含 0.9%  $\text{NaNO}_3$  的试管充当对照。

[0318] 将如此获得的细菌悬浮液转移至无菌玻璃试管以减少细胞与管壁的潜在吸附并且在整个检测阶段于 37°C 保持覆盖。静止温育 5 分钟后,移除 100  $\mu\text{l}$  被处理的细菌悬浮液,并且将该悬浮液在 0.9%  $\text{NaNO}_3$  中的 1 比 10 十倍稀释物 10  $\mu\text{l}$  滴到 LB 琼脂板上。通过对生长在培养板上的菌落数量进行计数并且计算 37°C 培养 18 小时后的 CFU/ml 和  $\log_{10}$  CFU/ml 评价细菌增殖水平。对与特定组合温育的细菌悬浮液计算得到的较高的  $\log_{10}$  CFU/ml 表



明该组合较低的杀菌活性水平。

[0319] 其他细菌细胞系的生长方案：

[0320] 从Laboratory of Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance(分子流行病学和抗微生物抗性实验室), Tel Aviv Sourasky Medical Center 的临床菌株收集中心获得各种细菌细胞系。因此检测供试抗菌组合对克雷伯氏肺炎杆菌、金黄色葡萄球菌的耐甲氧西林临床菌株 (MRSA)、表皮葡萄球菌的临床菌株、产超广谱内酰胺酶的大肠杆菌的临床菌株、多重耐药性鲍氏不动杆菌的临床菌株以及多重耐药性绿脓假单胞菌的临床菌株的杀菌活性。

[0321] 细菌生长方案基本如上文所述, 只是细菌细胞系在 BHI 生长培养基中生长 (并且在细菌于培养基中生长之后, 通过用无菌培养基稀释将细菌悬浮液调节至  $10^7$ CFU/ml)。另外, 在这些试验中, 每一种细菌悬浮液与银离子 + 薄荷醇组合的静止温育时间为 0、30 和 60 分钟。

[0322] 协同作用：

[0323] 为了评价薄荷醇和银离子是否具有协同作用, 将一起给药薄荷醇和银离子时观察到的杀菌活性与单独给药每一种这些化合物观察到的杀菌活性进行比较 (根据以下方法测定: Lehmann, 2000. Ynergism in Disinfectant Formulation, in Disinfection, Sterilization, and Preservation, 第 5 版, S. S. Block 编辑, Lippincott Williams and Wilkins. 第 459-472 页)。

[0324] 在以下情况中认为组合具有协同作用：

[0325] 薄荷醇和银离子的杀菌活性大于当以特定的浓度单独检测每一种化合物时观察到的杀菌活性的累加值; 或者

[0326] 检测到薄荷醇和银离子的某一水平的杀菌活性的时间短于以特定的浓度单独检测每一种物质时测定的时间。

[0327] 实施例 1

[0328] 10% (v/v) 甘油高渗溶液中的薄荷醇和银离子对大肠杆菌 ATCC47076 的杀菌活性的协同作用

[0329] 为了评价薄荷醇和银离子之间杀菌活性的协同作用, 使用银离子和薄荷醇的各种浓度的组合, 如表 1 所示。

[0330] 结果总结于表 1 并且显示出分别观察到 0.005% (w/v)+0.1% (w/v)、0.005% +0.05%、0.0075% +0.05%、0.01% +0.05% 和 0.01% +0.01% w/v (对应于表 1 中的阴影区域) 的银离子 (来自  $\text{AgNO}_3$ ) 和薄荷醇组合的协同作用。这些浓度对应于以下组合的银离子和薄荷醇组合: 0.29mM+6.4mM、0.29mM+3.2mM、0.44mM+3.2mM、0.6mM+3.2mM 和 0.6mM+0.64mM。

[0331] 表 1 的左边部分表示所观察到的每一种组合杀灭的细菌细胞百分数而表 1 的右边部分表示将薄荷醇和银离子的杀菌活性自然累加而非协同作用下的预期杀灭细菌细胞百分数。

[0332] 表 1

[0333]

|      |      | % AgNO <sub>3</sub> |        |       |    |                    |        |       |    |
|------|------|---------------------|--------|-------|----|--------------------|--------|-------|----|
|      |      | 测量值 <sup>a</sup>    |        |       |    | 计算累加值 <sup>b</sup> |        |       |    |
|      |      | 0.01                | 0.0075 | 0.005 | 0  | 0.01               | 0.0075 | 0.005 | 0  |
| %薄荷醇 | 0.1  | 100                 | 100    | 100   | 51 | 112                | 115    | 66    | 51 |
|      | 0.05 | 100                 | 100    | 100   | 20 | 81                 | 84     | 35    | 20 |
|      | 0.01 | 100                 | 56     | 48    | 0  | 61                 | 64     | 15    | 0  |
|      | 0    | 61                  | 64     | 15    | 0  | 61                 | 64     | 15    | 0  |

[0334] <sup>a</sup> 通过暴露于指定的薄荷醇和 AgNO<sub>3</sub> 组合而被杀灭的大肠杆菌细胞百分数

[0335] <sup>b</sup> 当假设薄荷醇和银离子之间为累加活性而非协同活性时指定组合杀灭的预期大肠杆菌百分数。

[0336] 选择 0.01% 银离子和 0.05% 薄荷醇的协同组合用于进一步研究。

[0337] 实施例 2

[0338] 含 10% (v/v) 甘油的高渗溶液中 0.01% (w/v) 银离子和 0.05% (w/v) 薄荷醇组合对各种类型细菌的杀菌活性

[0339] 评价 0.01% (w/v) 银离子和 0.05% (w/v) 薄荷醇 (用 0.5% (v/v) TWEEN20 增溶) 组合对各种类型细菌的生长和生存力的作用。

[0340] 将仅与 NaNO<sub>3</sub> 0.9% (w/v) 溶液温育而不加入任何抗菌物质的细胞用作对照。

[0341] 将杀菌活性定义为与对照相比菌落计数减少  $5 - \log_{10}$  或更低 (根据 Cremieux, Methods of testing Disinfectants, in Disinfection, Sterilization, and Preservation 第 5 版, S. S. Block 编辑, 2000, Lippincott Williams and Wilkins, 第 1305-1328 页)。

[0342] 表 2 示出了未与抗菌剂 (对照) 温育、单独与 0.01% 银离子 (0.01% AgNO<sub>3</sub>) 温育、单独与 0.05% 薄荷醇温育或与 0.01% 银离子和 0.05% 薄荷醇组合温育 0、30 和 60 分钟的不同类型的细菌细胞悬浮液的计算所得  $\log_{10}$  CFU/ml。将基线水平定义为当向细菌悬浮液中加入非抗菌剂时于时间 0 观察到的细菌生长。

[0343] 结果清楚地证明了细菌悬浮液与 0.01% 银离子和 0.05% 薄荷醇组合温育后细菌生存力被完全消除。除了金黄色葡萄球菌的耐甲氧西林临床菌株中在杀灭所有细菌后 30 分钟观察到生存力即刻降低 50% 之外, 所有作用均立刻显现 (于时间点 0)。

[0344] 表 2

[0345]

| 细菌                    | 基线  | 对照 <sup>a</sup> |     |     | 0.01 % AgNO <sub>3</sub> <sup>a</sup> |    |    | 0.05 % 薄荷醇 <sup>a</sup> |     |     | 0.01 % AgNO <sub>3</sub> 和 0.05 % 薄荷醇 <sup>a</sup> |    |    |
|-----------------------|-----|-----------------|-----|-----|---------------------------------------|----|----|-------------------------|-----|-----|--|----|----|
|                       |     | 0               | 30  | 60  | 0                                     | 30 | 60 | 0                       | 30  | 60  | 0  | 30 | 60 |
| 大肠杆菌<br>ATCC 47076    | 7.3 | 7.3             | 7.3 | 7.3 | 6.4                                   | 0  | 0  | 5.3                     | 0   | 0   | 0  | 0  | 0  |
| 克雷伯氏肺炎<br>杆菌          | 6.8 | 6.8             | 6.7 | 6.5 | 0                                     | 0  | 0  | 6.2                     | 4.9 | 3.8 | 0  | 0  | 0  |
| 金黄色葡萄球<br>菌           | 6.1 | 6.1             | 6.1 | 6.1 | 5.4                                   | 0  | 0  | 6.3                     | 6.3 | 6.2 | 3.4  | 0  | 0  |
| 表皮葡萄球菌                | 5.4 | 5.4             | 5.3 | 5.2 | 0                                     | 0  | 0  | 5.4                     | 5.4 | 5.3 | 0  | 0  | 0  |
| 产内酰胺酶大<br>肠杆菌大肠杆<br>菌 | 5.9 | 5.9             | 5.8 | 5.6 | 4.8                                   | 0  | 0  | 4.9                     | 4.9 | 4.9 | 0  | 0  | 0  |
| 鲍氏不动杆菌                | 6.4 | 6.4             | 6.4 | 6.4 | 6.3                                   | 0  | 0  | 6.4                     | 6.3 | 6.2 | 0  | 0  | 0  |
| 绿脓假单胞菌                | 6.5 | 6.5             | 6.5 | 7.1 | 5.1                                   | 0  | 0  | 5.8                     | 3.5 | 2.5 | 0  | 0  | 0  |

[0346] <sup>a</sup> 当用指定处理将细菌悬浮液处理 0、30 和 60 分钟后细菌的 log<sub>10</sub>CFU/ml。

[0347] 这些结果指出将银离子和薄荷醇组合所表现出的协同杀菌活性。

[0348] 实施例 3

[0349] 测定 0.01% (w/v) 银离子和 0.05% (w/v) 薄荷醇组合的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)

[0350] 通法：

[0351] 使用试管稀释法进行试验用于测定供试银离子 - 薄荷醇组合对供试微生物的有效使用稀释度。在细菌生长培养基中对供试样品进行系列稀释。将供试微生物加入产品稀释物中并且温育使其生长。将表现出无供试微生物的可见生长的供试样品稀释物接种以验证该产品的致死率。该操作为用于抗菌药剂的标准敏感性测定法并且并入了美国微生物学会 (ASM) 的目的 (intent)。于 ≥ 70% 验证中和作用。

[0352] 供试样品：

[0353] 所使用的供试样品取自包含 0.1mg 硝酸银每 1ml 缓冲液的 250ml 原种溶液。每一份供试样品包含以下组分：

[0354] 甘油：10% v/v

[0355] 薄荷醇：0.05% w/v

[0356] TWEEN20：0.5% v/v

[0357] AgNO<sub>3</sub>：0.01% w/v

[0358] Tris：50mM

[0359] 供试微生物：

[0360] 在该试验中使用以下微生物菌株：

[0361] E. 大肠杆菌 ATCC No. 8739 ;表皮葡萄球菌 ATCC No. 12228 ;克雷伯氏肺炎杆菌 ATCC No. 4352 和金黄色葡萄球菌 ATCC No. 6538。

[0362] 试验方案：

[0363] 可接受标准：所有阳性对照均表现出目标微生物的生长。所有培养基和阴性对照不应表现出目标微生物生长。

[0364] 培养物制备：用细菌的原种培养物接种含大豆酪蛋白消化肉汤 (SCDB) 的试管内并且于 37℃ 培养 18-48 小时。必要时,根据目测浊度通过在 0.9% 硝酸钠 ( $\text{NaNO}_3$ ) 中稀释将培养物浓度调节至约  $10^8$  菌落形成单位 (CFU)/ml。检测当日,通过在 0.9%  $\text{NaNO}_3$  中稀释并且一式三份接种至含中和剂的琼脂板上以测定起始滴度对悬浮液进行标准平板计数。

[0365] MIC 测定操作：将上文所述供试样品在无菌纯化水 (PURW) 中两倍系列稀释。然后,将 5ml 的每一种稀释物加入 5ml 2X 培养基中。最终供试稀释物为 1:2 至 1:4096。

[0366] 通过将 5ml PURW 与 5ml 2X 培养基混合和为每一种微生物制备两个阳性对照管。将 5ml 最低样品稀释物与 5ml 2X 培养基混合为每一种样品制备两个阴性对照管。通过将 5ml PURW 与 5ml 2X 培养基混合制备两个培养基对照管。不向阴性对照管或培养基对照管中加入供试培养物。

[0367] 用 0.05ml 供试微生物接种所有供试样品稀释物与阳性对照管。将所有试管于  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  培养 16-20 小时。基于微生物的生长,将所有试管稀释物评为阳性 (+) 或阴性 (0)。

[0368] MBC 测定操作：检测不表现出生长的稀释物的 MBC。从不表现出生长的各管取 0.1ml。将各稀释物一式三份接种于 NUAG 上。对于阴性对照,将无菌 2X 培养基接种到 NUAG 上。通过将  $\leq 100\text{CFU}$  供试微生物接种到 NUAG 上制备阳性对照。将供试板于  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  培养 2-4 天

[0369] 中和验证：

[0370] 测定经检测可抑制供试微生物生长的供试样品的最低稀释物 (MIC) 在 2X 培养基中供试微生物的中和回收。将 0.1ml 供试样品稀释物一式三份接种到 NUAG 上。为每一种微生物制备另外三个平板作为滴度对照。向平板中加入  $\leq 100\text{CFU}$  的供试微生物。将平板于  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  培养 2-4 天。将获自滴度对照的计数和供试样品的那些进行比较。

[0371] 结果：

[0372] MIC 和 MBC 的结果显示于表 3

[0373] 表 4 示出了中和结果。

[0374] 测定符合上文所述的可接受标准。

[0375] 表 3

[0376]

| 供试微生物                     | MIC | 滴度                       | MBC |
|---------------------------|-----|--------------------------|-----|
| 大肠杆菌<br>ATCC No. 8739     | 1:8 | $1.7 \times 10^8$ CFU/ml | 1:4 |
| 表皮葡萄球菌<br>ATCC No. 12228  | 1:8 | $5.7 \times 10^7$ CFU/ml | ND  |
| 克雷伯氏肺炎杆菌<br>ATCC No. 4352 | 1:8 | $1.3 \times 10^8$ CFU/ml | 1:4 |
| 金黄色葡萄球菌<br>ATCC No. 6538  | 1:4 | $1.4 \times 10^8$ CFU/ml | ND  |

[0377] 表 4

[0378]

| 样品稀释度 | 微生物鉴定                     | 中和回收百分数 |
|-------|---------------------------|---------|
| 1:2   | 大肠杆菌<br>ATCC No. 8739     | 83      |
| 1:2   | 表皮葡萄球菌 ATCC<br>No. 12228  | 117     |
| 1:2   | 克雷伯氏肺炎杆菌<br>ATCC No. 4352 | 117     |
| 1:2   | 金黄色葡萄球菌 ATCC<br>No. 6538  | 100     |

[0379] 这些结果为本文所述组合物的多种功效的抗菌活性提供了进一步的证据。

[0380] 实施例 4

[0381] 测定 USP 微生物限量

[0382] 进行试验以测定非无菌样品中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓假单胞菌和沙门氏菌属或其他不可接受的或者被认为是致病性的相关微生物的存在。这些微生物的存在指明使相似的致病细菌能够生长的环境。

[0383] 试验方案：

[0384] 可接受标准：原始平板计数结果应在 30-300 菌落形成单位 (CFU) 每平板之内或者报告为估算值。黑曲霉和其他相似的微生物仅可准确读出 8-80CFU 每板。如果未发现菌落，可将结果报告为低于样品稀释度。当阴性监测物在现有操作建立的参数之内时可认为平板计数是可靠的。用于定性的阳性对照应表现出特征性生长。用于选择性筛选的阴性测定监测物不应表现出指示微生物的生长。

[0385] 样品制备：通过将如上文实施例 3 所述的 10ml 样品原种溶液与 90ml 50mM Tris- 缓冲液 pH7.45 组合制备供试样品。然后将 10ml 该溶液置于 90ml 的液体酪蛋白消化 - 大豆卵磷脂 - 聚山梨醇酯 20 培养基 (FCDM) 和 acumedia 乳糖肉汤 (ALBR) 中。

[0386] 平板计数：使用倾倒平板技术，将 1ml 样品一式三份接种于大豆酪蛋白消化琼脂 (SCDA) 中用于细菌计数。一式三份使用土豆右旋糖琼脂 (PDXA) 进行相同的操作用于真菌计数。将 SCDA 平板于 30-35°C 培养 48-72 小时而将 PDXA 平板于 20-25°C 培养 5-7 天。

[0387] 样品富集：将样品稀释于 FCDM 用于金黄色葡萄球菌和绿脓假单胞菌筛选，并且稀释于 ALBR 用于沙门氏菌和大肠杆菌筛选。

- [0388] 将富集肉汤于 30-35℃培养 24-48 小时。
- [0389] 微生物筛选：富集培养之后，将培养基转移至或划线至适当的培养基进行如下培养：
- [0390] 沙门氏菌：亚硒酸盐-胱氨酸肉汤和四硫磺酸盐肉汤 - 在 30-35℃, 12-24 小时；亮绿、亚硫酸铋和 XLD 琼脂 - 在 30-35℃, 24-48 小时。
- [0391] 绿脓假单胞菌：溴化十六烷基三甲铵琼脂 - 在 30-35℃, 24-48 小时；
- [0392] 金黄色葡萄球菌：甘露醇盐琼脂 - 在 30-35℃, 24-48 小时
- [0393] 大肠杆菌：MacConkey 琼脂 - 在 30-35℃, 24-48 小时
- [0394] 使用生物化学测定验证任何可疑菌落。
- [0395] 定性：
- [0396] 在该样品类型的第一次检测中如下进行定性测定：
- [0397] 使四种供试微生物的二十四小时肉汤培养物于 30-35℃生长并且以 1:1000 稀释。用于接种的微生物当量为 ≤ 1% 的样品制备物。在将样品稀释于肉汤的一小时内加入接种物。进行筛选操作。必须回收所有四种供试微生物以证明样品中和。
- [0398] 结果：
- [0399] 供试溶液以 1:10 稀释通过定性。所观察到的总好氧微生物计数以及霉菌和酵母组合计数的数值均低于 10, 表明“未检出”。
- [0400] 因此可以 1:10 的样品稀释进行常规分析。
- [0401] 在致病性筛选中, 结果显示所有供试微生物均不存在于总好氧和真菌计数中。未对平板计数结果进行细菌或真菌回收的定性。
- [0402] 测定符合可接受标准。
- [0403] 实施例 5
- [0404] 抗微生物敏感性测定
- [0405] 进行试验用于筛选包含银离子和薄荷醇的供试样品的抗微生物活性。测试微生物为金黄色葡萄球菌 ATCC No. 6538 和大肠杆菌 ATCC No. 8739。测定操为经修改的用于抗生素敏感性检测的纸片扩散 (Kirby-Bauer) 法。
- [0406] 试验方案：
- [0407] 培养物制备：用来自原种培养物的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌接种 Mueller-Hinton 培养基并且于 30-35℃培养 18-24 小时。用生理盐水将供试微生物标准化以达到与 0.5 McFarland 标准相等的细胞密度。在标准化后 15 分钟内使用接种物。
- [0408] 供试样品：
- [0409] 所使用的供试样品取自包含 0.1mg 硝酸银每 1ml 缓冲液的 250ml 原种溶液。每一份供试样品包含以下组分：
- [0410] 甘油：10% v/v
- [0411] 薄荷醇：0.05% w/v
- [0412] TWEEN20：0.5% v/v
- [0413] AgNO<sub>3</sub>：0.01% w/v
- [0414] Tris：50mM
- [0415] 测定实施：将无菌棉签蘸入标准化的接种物中, 旋转数周, 并且紧紧按压在高于液

面的管内壁上以从棉签除去过量的接种物。用棉签在 Mueller-Hinton 琼脂板的整个表面上划线三次,每次将平板旋转 60°,然后沿琼脂边缘最后涂抹一周。盖子搁置在琼脂上不超过 15 分钟以使过量的表面水分被吸收。用一对无菌镊子将无菌纸片置于琼脂板上。将每一个纸片置于各平板的中央,用力按压从而使样品保持于原位并且与琼脂表面均匀接触。用约 0.1ml 供试样品接种各纸片。对于阴性对照,用无菌纯化水接种各纸片。

[0416] 将平板于 30-35°C 培养约 24 小时。之后将样品转移至新鲜制备的平板上并且培养约 24 小时。重复该操作直至平板不显示出抑菌圈。使用精确度为 0.01mm 的经校准的卡尺测量抑菌圈(如果存在)的直径。测量包括样品直径在内的完整抑菌圈(zone of inhibition)。

[0417] 结果:

[0418] 结果显示于表 5 并且证明了细菌对供试样品的敏感性。

[0419] 表 5

[0420]

| 供试微生物                    |   | 包括样品在内的抑菌圈直径 (mm)<br>24 小时 | 包括样品在内的抑菌圈直径(mm)<br>48 小时 |
|--------------------------|---|----------------------------|---------------------------|
| 金黄色葡萄球菌<br>ATCC No. 6538 | 1 | 16.24                      | 无抑菌圈                      |
|                          | 2 | 16.34                      | 无抑菌圈                      |
|                          | 3 | 15.33                      | 无抑菌圈                      |
| 大肠杆菌<br>ATCC No. 8739    | 1 | 14.14                      | 无抑菌圈                      |
|                          | 2 | 16.28                      | 无抑菌圈                      |
|                          | 3 | 12.53                      | 无抑菌圈                      |

[0421] 实施例 6

[0422] 包含银离子和薄荷醇的溶液与商购的 B. Braun's PRONTOSAN 的杀真菌/抑真菌活性的比较试验

[0423] 测定本文所述组合物(上文实施例 5 中所述的供试样品)的抗真菌活性并且与商购产品 PRONTOSAN®(由 B. Braun 提供)、MICROCYN®(由 Occulus 提供)和 ANASEPT®(由 Anacapa 提供)比较。

[0424] 杀真菌活性的体外筛选和比较测定:

[0425] 用供试菌株接种 ELISA 板孔中的 SDB 琼脂(100ml)并且于 30°C 培养 24 小时使其初步生长。

[0426] 将 100ml 供试物水溶液(或者为包含如本文所述的银离子和薄荷醇的溶液或者为 PRONTOSAN®、MICROCYN®或 ANASEPT®的溶液),或者为 0.9% 盐溶液(作为对照))涂抹一次,将板子于 30°C 培养 30 分钟,弃去溶液,然后加入 100ml SDB 生长培养基,将板子于 30°C 培养 30 分钟,然后弃去培养基。然后将板子于 30°C 培养 24 天,并且每天进行检测和照相。

[0427] 图 1 示出的图总体图解了在暴露于供试溶液 30 分钟并且随后洗涤后培养 24 天之后的真菌培养物的外观,表现出无生长(杀真菌作用,表示为“F”)、最小不良生长(抑制作用,表示为“IN”)或者完全生长(无作用,表示为“NE”)。

[0428] 图 2-4 示出的图图解了在暴露于每一种供试溶液 30 分钟并且随后洗涤后培养 3、8、11 和 16 天之后的已暴露真菌培养物的外观。供试溶液包括：如上文实施例 5 所述的包含银离子和薄荷醇的组合物（表示为“S”）、PRONTOSAN®（表示为“P”）、交替相继暴露于包含银离子和薄荷醇的组合物和 PRONTOSAN®（表示为“S+P”和“P+S”）、MICROCYN®（表示为“M”）以及 ANACEPT®（表示为“A”）以及它们的稀释液（1:2 ; 1:4 ; 1:8）。供试真菌菌株为红色毛癣菌的临床菌株（图 2）；红色毛癣菌 NCPF 118 商购菌株（图 3）和犬小孢子菌（图 4）。

[0429] 图 2-4 示出的数据清楚地证明了用根据本发明一实施方案的包含银离子和薄荷醇的组合物一次处理后的杀真菌作用。银离子 - 薄荷醇组合物表现出与 PRONTOSAN® 相似的活性；以 1:2 - 1:4 稀释仍有效；并且优于包含次氯酸盐的药剂 MICROCYN® 和 ANACEPT®。此外，已清楚地证明了用银离子 - 薄荷醇组合物和 PRONTOSAN® 相继处理提供显著提高的抗真菌活性，首先使用银离子 - 薄荷醇组合物并且接着使用 PRONTOSAN 这一顺序具有明显优势，该组合甚至在 1:8 稀释时对红色毛癣菌临床菌株表现出显著的高抗真菌功效（参见，图 2）。

[0430] 尽管已结合具体的实施方案对本发明进行了描述，但是许多选择、修改和更改对于本领域技术人员是显而易见的。因此，预期包括属于附加权利要求的精神的宽范围内的所有此类选择、修改和更改。

[0431] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以其全文通过援引纳入本说明书，视同具体并且单独指明每一个出版物、专利或专利申请通过援引纳入本文。此外，本说明书中对任何参考文献的引用或确认不应理解为承认此类参考文献可作为本发明的现有技术获得。对于所使用的章节标题，不应理解它们一定具有限制性。



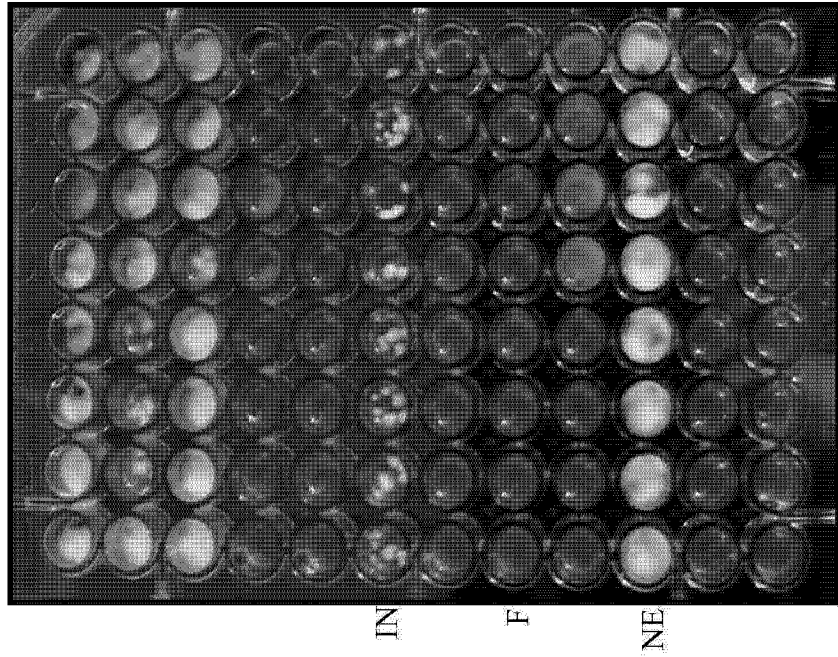


图 1

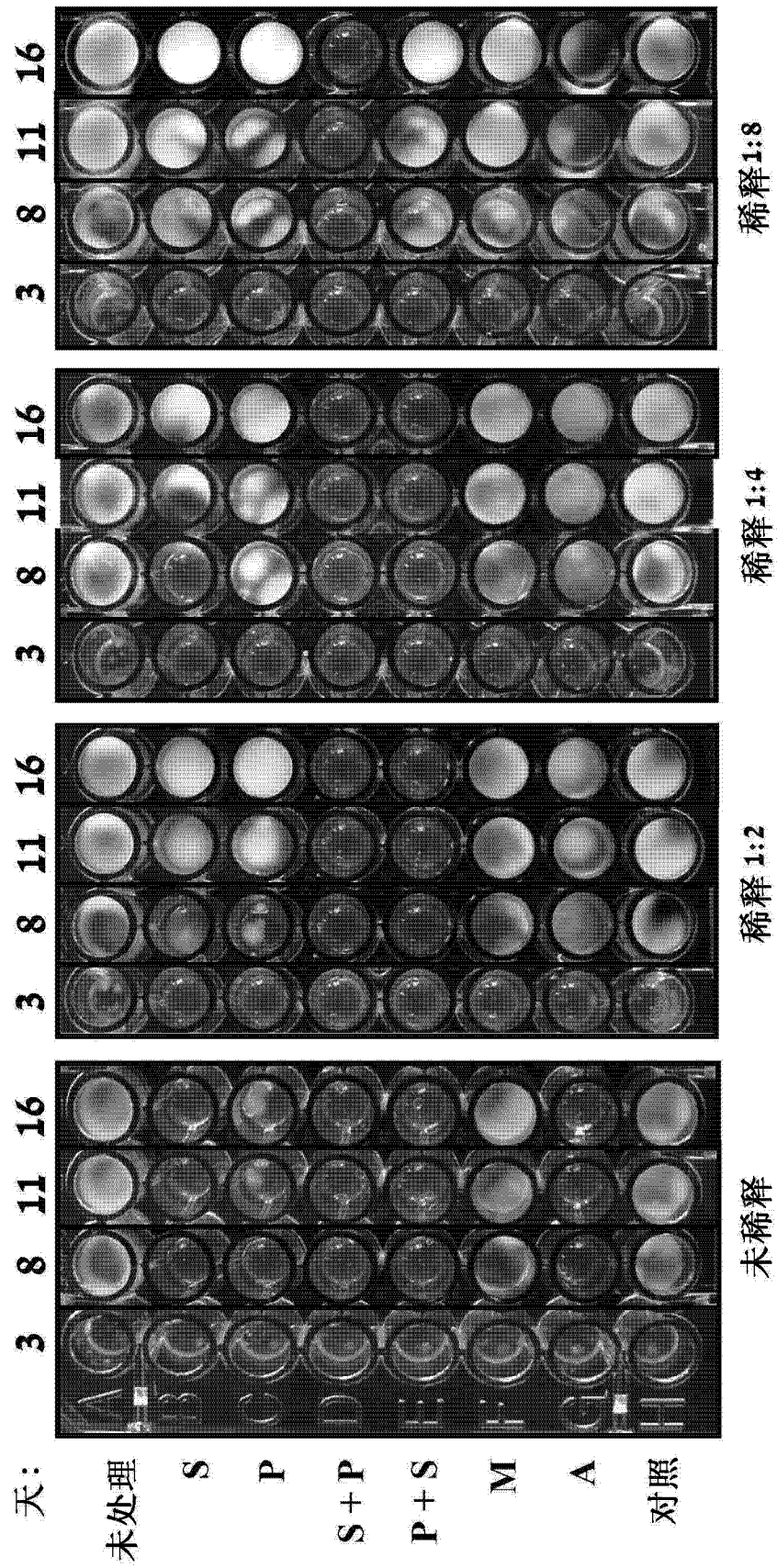


图 2

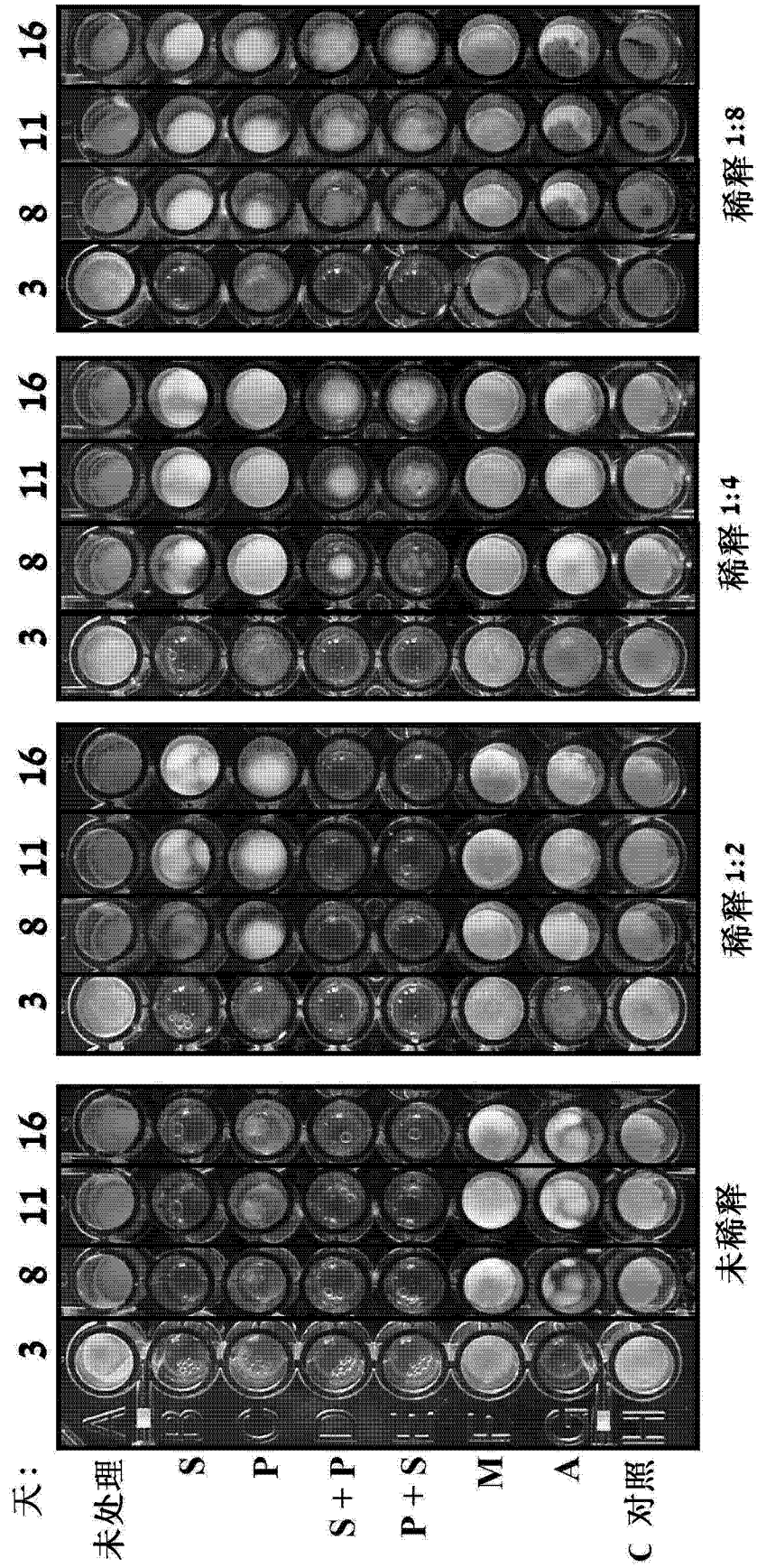


图 3

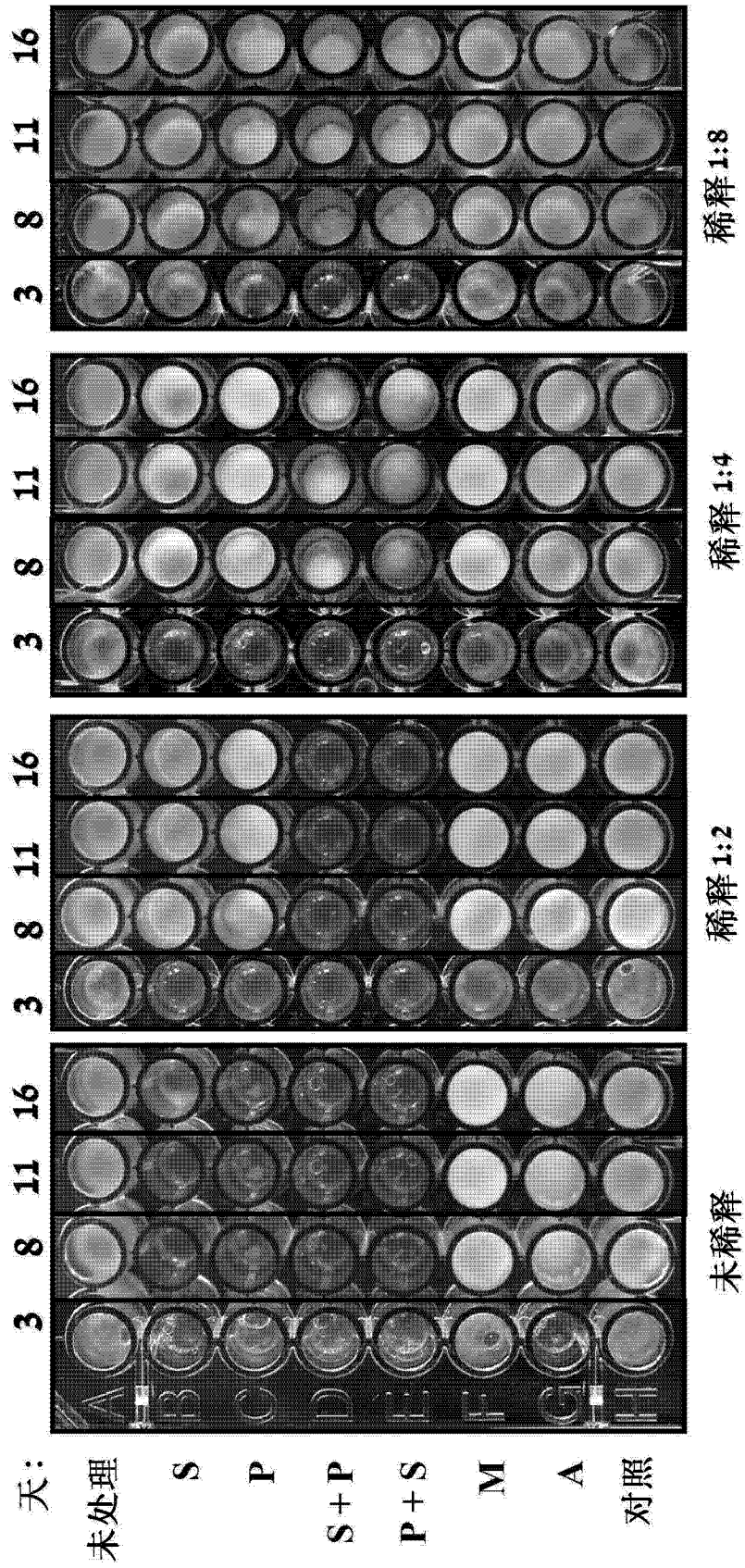


图 4