



(10) 授权公告号 CN 114126629 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 30

(21) 申请号 202080052446.2

(22) 申请日 2020.06.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114126629 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(30) 优先权数据
1907971.4 2019.06.04 GB
1915277.6 2019.10.22 GB
2005979.6 2020.04.23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/051329 2020.06.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/245574 EN 2020.12.10

(73) 专利权人 三十呼吸有限公司
地址 英国伦敦

(72) 发明人 H·S·芒罗 C·B·伍德

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 徐婕超

(51) Int.Cl.
A61K 33/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5648101 A, 1997.07.15

US 2013/0089629 A1, 2013.04.11

US 2014/0335207 A1, 2014.11.13 (续)

审查员 孙妍妍

权利要求书2页 说明书78页 附图31页

(54) 发明名称

用于生成一氧化氮的方法和组合物及其用于经由呼吸道输送一氧化氮的用途

(57) 摘要

本发明公开了一种组合、试剂盒或组合物,包括:(i)一种或多种亚硝酸盐;(ii)质子源,其包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸;以及(iii)一种或多种有机多元醇。当一种或多种亚硝酸盐与质子源在一种或多种

有机多元醇的存在下反应时,所述组合、试剂盒或组合物提供反应产物,所述反应产物包括一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体,并且所述反应产物可用于通过将所述组合或组合物或一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体经由呼吸道输送给受试者来治疗各种疾病。

CN 114126629 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Sara Åkerström et.al. Dual effect of nitric oxide on SARS-CoV replication: Viral RNA production and palmitoylation of the S protein are affected.《Virology》

.2009,第395卷(第1期),第1-9页.

G.F Rimmelzwaan et.al. Inhibition of Influenza Virus Replication by Nitric Oxide.《International Congress Series》.2001,第1219卷第551-555页.

1. 一种物质在制备用于治疗微生物感染的药物中的用途,所述物质为:

一种组合物,用于在鼻、口、呼吸道和肺的粘膜和组织的治疗中通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应生成一氧化氮,所述组合物包括:

(i) 一种或多种亚硝酸盐;

(ii) 质子源,其包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸;以及

(iii) 一种或多种有机多元醇;

其特征为:

(a) 所述一种或多种有机多元醇以提高反应产物的量存在,其中所述反应的产物的提高是与在相同条件下进行但不含所述一种或多种有机多元醇的反应进行比较的;

其中所述治疗微生物感染包括经由受试者的鼻、口、呼吸道或肺向所述受试者施用所述组合物;

其中,所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:柠檬酸、其盐及它们的组合;

其中,所述质子源的一种或多种有机非羧酸还原性酸选自:抗坏血酸;抗坏血酸棕榈酸酯;3-0-乙基抗坏血酸、6-0-辛酰基抗坏血酸、6-0-十二烷酰基抗坏血酸、6-0-十四烷酰基抗坏血酸、6-0-十八烷酰基抗坏血酸和6-0-十二烷二酰基抗坏血酸;它们的盐;及它们的组合;

其中,所述质子源的pH被缓冲至pH为3至6;

其中,所述一种或多种有机多元醇选自阿拉伯糖醇、木糖醇、甘露醇、山梨糖醇、或它们的任意组合;

其中,所述一种或多种有机多元醇或含有所述一种或多种有机多元醇的NO_x生成反应体系的任何组分存在于水性载体的溶液中,并且其中所述溶液中的所述一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度为0.001M至5M;以及

其中,所述微生物感染包括细菌感染、病毒感染或它们的组合;其中所述细菌感染由病原菌物种引起,并且所述病毒感染由致病病毒引起;其中所述病原菌物种包括分枝杆菌、假单胞菌或它们的任何组合,并且所述致病病毒包括流感病毒、冠状病毒、或其任何结合。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述一种或多种亚硝酸盐选自LiNO₂、NaNO₂、KNO₂、RbNO₂、CsNO₂、FrNO₂、AgNO₂、Be(NO₂)₂、Mg(NO₂)₂、Ca(NO₂)₂、Sr(NO₂)₂、Mn(NO₂)₂、Ba(NO₂)₂、Ra(NO₂)₂及它们的任意混合物。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述一种或多种亚硝酸盐是NaNO₂、KNO₂或它们的混合物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的NO_x生成反应体系的任何组分以干燥形式存在。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的NO_x生成反应体系的任何组分存在于水性载体的溶液中。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度在0.001M至5M的范围内。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的所述NO_x生成反应体系的任何组分的pH被缓冲。

8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述质子源包括选自柠檬酸、其盐及它们的组合的

一种或多种羧酸。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中质子源包括选自抗坏血酸、其盐及它们的组合的一种或多种有机非羧酸还原性酸。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中所述质子源或其组分部分,或含有所述质子源的所述 NO_x 生成反应体系的任何组分以干燥形式存在。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述质子源或其组成部分,或含有所述质子源的所述 NO_x 生成反应体系的任何组成部分存在于水性载体的溶液中。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述溶液中质子源的摩尔浓度在0.001M至5M的范围内。

13. 根据权利要求1所述的用途,其中:

(a) 在所述 NO_x 生成反应开始时或开始之前,所述多元醇组分中或反应溶液中的任意一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是所述亚硝酸根组分或所述反应溶液中亚硝酸根离子总摩尔浓度的0.05至3倍;或

(b) 在所述 NO_x 生成反应开始时或开始之前,所述多元醇组分中或反应溶液中的任意一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是所述质子源组分或所述反应溶液中质子源总摩尔浓度的0.05至3倍。

14. 根据权利要求1所述的用途,其中用于通过将一种或多种亚硝酸盐与质子源反应而生成一氧化氮的所述组合物还包括一种或多种附加组分,所述附加组分选自稀释剂、载体、甜味剂、掩味剂、增稠剂、增粘剂、润湿剂、润滑剂、粘合剂、成膜剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、香料、包衣剂、抗氧化剂、药学活性剂和防腐剂及它们的任意组合。

15. 根据权利要求1所述的用途,其中所述一种或多种有机多元醇不包括还原剂。

16. 根据权利要求1所述的用途,其中所述微生物感染由受试者中SARS-CoV、SARS-CoV-2、结核分枝杆菌或流感的感染引起。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述微生物感染由受试者中SARS-CoV (SARS) 的感染引起。

18. 根据权利要求16所述的用途,其中所述微生物感染由受试者中SARS-COV-2 (COVID-19) 的感染引起。

19. 根据权利要求16所述的用途,其中所述微生物感染由受试者中结核分枝杆菌的感染引起。

20. 根据权利要求16所述的用途,其中所述微生物感染由受试者中流感的感染引起。

21. 根据权利要求16所述的用途,其中所述受试者是人。

用于生成一氧化氮的方法和组合物及其用于经由呼吸道输送 一氧化氮的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的方法和组合物,及其用于经由呼吸道向人和动物受试者输送一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的用途,例如用于治疗对一氧化氮有反应的病症。

背景技术

[0002] 一氧化氮(NO)和一氧化氮前体作为潜在的药物制剂已经被广泛研究。一氧化氮是一种有效的血管舒张剂,由血管内皮细胞合成和释放,尤其在调节血管局部阻力和血流方面发挥重要作用。在哺乳动物细胞中,一氧化氮主要通过L-精氨酸的酶氧化与L-瓜氨酸一起产生。一氧化氮也通过似乎与NO合酶无关的机制从皮肤中释放出来。一氧化氮也参与血小板和白细胞聚集和粘附的抑制、细胞增殖的抑制、超氧自由基的清除和内皮层渗透性的调节。在Biochemistry(Moscow),63(7),802-809(1998)中讨论了一氧化氮在癌症治疗中的作用,其公开内容在此引入作为参考。如F C Fang在J.Clin.Invest.99(12),2818-2825(1997)中所评论的,并且例如W0 95/22335和W0 02/20026(阿伯丁(Aberdeen)大学)中所述,一氧化氮已经显示出具有抗微生物性能,其公开内容在此引入作为参考。在下面的本发明的描述中给出用于生成一氧化氮、其他氮氧化物及其前体的系统的其他已知用途和应用。

[0003] 在有效生成一氧化氮、其他氮氧化物及其前体并将其输送到生物体和细胞以进行治疗方面,仍然存在实质性的问题。广泛采用的用于生成一氧化氮的系统依赖于使用无机酸酸化亚硝酸盐以最初产生与起始亚硝酸盐相比等摩尔量的亚硝酸(HNO_2),然后亚硝酸很容易地分解成一氧化氮和硝酸盐以及氢离子和水。分解可由以下平衡方程式(1)表示:



[0005] 通常在低于约4的pH下进行亚硝酸盐的酸化,在该pH下通常有利于亚硝酸的形成,以试图使NO产率最大化。然而,使用 $\text{pH} < 4$ 不适合于酸与动物组织接触的体内使用。较高的pH对细胞和生命系统更有利,但是在大于4的pH下,现有系统的NO产率无法令人满意。为了试图使在高于4的pH生成的NO的量增加,需要大量的亚硝酸盐,这在治疗应用中是不实际的并且也不经济。此外,由于亚硝酸的半衰期短,方程式(1)所示的转化不易控制,因此难以控制用于治疗用途的一氧化氮的释放。在一种或多种亚硝酸盐和质子源之间生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的反应在本文中被称作“NO_x生成反应”或“用于生成NO_x的反应”或类似的词语,并且“NO_x”用于指亚硝酸盐单独地酸化以及以任意组合共同酸化的产物,特别是一氧化氮、其他氮氧化物及其前体。应当理解,所生成的NO_x的每种组分可以作为气体释放,或者可以通入反应混合物中的溶液中,或者可以最初通入溶液中并随后作为气体释放,或者他们的任意组合。

[0006] W0 00/53193描述了用于治疗皮肤局部缺血和促进创伤愈合的乳膏或软膏,其中质子源是抗坏血酸,其公开内容在此引入作为参考。实施例1描述了基于KY Jelly™的凝胶,

并且在实施例7中,测试与皮肤直接接触的凝胶,以及在皮肤被薄膜保护的情况下测试凝胶。据称抗坏血酸的使用避免了明显的皮肤炎症(WO 00/53193,第2页)。然而,实际上,当凝胶直接与皮肤接触时,由于凝胶的低pH而引起的皮肤炎症的程度并不令人满意,并且当存在薄膜时,皮肤保护膜减弱了凝胶的作用。结果该凝胶还尚未投入市场。WO 00/53193的组合物不含多元醇。

[0007] WO 02/20026描述了一种用于治疗皮肤耐药感染的皮肤制剂,其中质子源是柠檬酸或水杨酸,其公开内容在此引入作为参考。从双桶分配器分配含亚硝酸盐的组合物和含酸的组合物,然后混合这些组合物以使酸在被涂敷到皮肤上之前与亚硝酸盐反应。该文献教导了丙二醇和聚乙二醇是任选的防腐剂,教导了甘油(丙三醇)是与亚硝酸盐组合物一起使用的任选的触变剂。丙二醇用于成对的分别为柠檬酸和亚硝酸盐的乳膏中,这两种乳膏在原位混合以引发酸和亚硝酸盐之间的反应(例如WO 02/20026,实施例3,制剂1)。丙三醇与鲸蜡硬脂醇一起用于成对的分别为柠檬酸和亚硝酸盐的乳液中,这两种乳液在原位混合以引发酸和亚硝酸盐之间的反应(例如WO 02/20026,实施例3,制剂3)。优选的反应混合物的pH为5或更低,特别是4或更低,这将预计引起不希望的皮肤炎症。该文献还教导了鼻喷雾剂,其可以使用还原性酸,诸如抗坏血酸盐或抗坏血酸棕榈酸盐,使得可以使用更高的pH来避免刺激敏感的鼻粘膜。然而,已知(WO 02/20026,第16页,第二段)较高的pH会减缓反应。

[0008] US 6103275(2000年8月15日公开)描述了还原剂(诸如抗坏血酸与pKa在1和4之间的有机酸(诸如马来酸))用于酸化亚硝酸盐的用途,其公开内容在此引入作为参考。粘性(凝胶)组合物用于减缓局部使用的反应产物的释放。酸和亚硝酸盐保持分离,直到氮氧化物的生成开始,还原剂被认为包括在第一凝胶和第二凝胶中的至少一种中。对于该方法应使用的pH范围,并没有规定。然而,缓冲组分被称作酸的事实可以表明这些化合物主要以质子化形式存在,因此组合物的pH应当实质上低于4。存在pKa在1和4之间的酸确保了制剂在该pH下的良好缓冲能力。尽管加入此类酸是确保pH保持在得以维持亚硝酸盐转化为一氧化氮的连续效率的水平的一种简便方法,但是预期低pH在与皮肤接触时会引起实质的不希望的皮肤刺激。US 6103275的组合物不含多元醇。

[0009] 在WO 2003/013489中,提出了3%聚乙烯醇(PA)作为分别用于柠檬酸和亚硝酸盐的凝胶基料,柠檬酸和亚硝酸盐将原位混合在一起(WO 2003/013489,实施例7),其公开内容引入本文作为参考。然而,试验数据(WO 2003/013489,表11和表12)显示,用PA不能形成稳定的凝胶,PA组合物从未混合或一起使用。除了上述方案之外,其并没有延续到最终的组合物,WO 2003/013489的组合物不含多元醇。

[0010] 美国专利申请号2005/0037093描述了基于亚硝酸盐-酸反应的一氧化氮生成组合物,并提到任选的赋形剂,包括聚乙烯醇、丙二醇和聚乙二醇,其公开内容在此引入作为参考。

[0011] 中国专利申请号CN 101028229描述了通过亚硝酸盐与酸的反应生成一氧化氮的化妆品,其公开内容在此引入作为参考。该文献教导了甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为附加成分的任选用途。在一个具体实施例中进一步提到三乙醇胺作为成分。

[0012] 中国专利申请号CN 101062050描述了通过亚硝酸盐与酸的反应生成一氧化氮的毛发生长促进产品,其公开内容在此引入作为参考。该文献教导了甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为附加成分的任选用途。在具体实施例中,提到D-泛醇和泛醇与肌醇的组合作为

成分。

[0013] WO 2008/110872描述了可发泡的一氧化氮供体组合物,其任选地含有极性溶剂,例如选自多元醇和聚乙二醇(第[0055]和[0056]段),其公开内容在此引入作为参考。特定的多元醇被描述为丙二醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、二甘醇、三甘醇、四甘醇、二丙二醇、二丁二醇、甘油、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇和己烷-1,2,6-三醇。在多种聚合物试剂的列表中提到,聚乙烯醇、聚乙二醇1000(PEG 1000)、PEG 4000、PEG 6000和PEG 8000作为任选的其他成分(第[0062]段)。在第[0190]和[0191]段中也提到,诸如丙三醇(甘油)、丙二醇、己二醇、二甘醇和丙二醇、以及乙二醇、己二醇、其他二元醇和聚乙二醇之类的多元醇作为任选的渗透增强剂。

[0014] WO 2009/019498描述了非硫醇还原剂作为亚硝酸盐和质子源的附加组分的用途,所述非硫醇还原剂的pKa不在1至4之间,其公开内容在此引入作为参考。非硫醇还原剂的实例被描述为碘化物阴离子、丁基化对苯二酚、生育酚、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯和 β 胡萝卜素。除了丁基化对苯二酚之外,WO 2009/019498的组合物不含多元醇。

[0015] WO 2014/188174和WO 2014/188175描述了用于皮肤损伤的敷料系统和经皮输送系统,其中质子源是水凝胶,该水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧基羧酸和磺酸盐基团,其公开内容在此引入作为参考。皮肤接触主层是聚丙烯网,亚硝酸盐被吸收到其上。当网放置在皮肤上时,水凝胶覆盖在网上作为顶层,发现酸和亚硝酸盐的反应产物很好地输送到皮肤上,而没有难以接受的皮肤刺激。在WO 2014/188175中,公开了另一种可替代的皮肤接触主层,他是例如由聚乙烯醇形成并含有亚硝酸盐的可溶解薄膜。在两篇参考文献中,都教导了水凝胶可以包括丙三醇,其目的并未说明。然而,众所周知,丙三醇作为增塑剂加入到这种类型的水凝胶中(例如,参见WO 00/06215,第14页,其公开内容在此引入作为参考)。这些参考文献公开了优选不存在某些含羟基的组分,特别是1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、抗坏血酸和丁基化对苯二酚。

[0016] 美国专利申请号2014/0335207描述了一种局部混合物,其在将“亚硝酸盐介质”与“酸化介质”混合时生成一氧化氮,其公开内容在此引入作为参考。在第[0050]至[0055]段中单独描述了“亚硝酸盐介质”的特定实施方案,其中亚硝酸盐与一种或多种多元醇组分一起存在。在第[0054]和[0055]段中描述的通用亚硝酸盐介质含有选自甘油、硬脂酸甘油酯、辛基二醇、乙基己基甘油和己二醇的多元醇,在其他段落中描述的特定实施方案含有一些上述物质和丁二醇。在第[0056]至[0062]段中,描述了这些多元醇也是“酸化介质”的实施方案的组分。

[0017] 美国专利申请号2015/0030702描述了一种基于亚硝酸盐-酸反应的皮肤敷料,其公开内容在此引入作为参考。该皮肤敷料包括非硫醇还原剂,诸如对苯二酚或丁基化对苯二酚。皮肤敷料可包括水凝胶,例如包括亲水性聚合物,诸如聚乙烯醇或聚乙二醇。

[0018] 美国专利申请号2017/0209485描述了一种用于在泡沫或浆液载体中局部施用一氧化氮的设备和方法,其公开内容在此引入作为参考。在第[0070]段中描述了丙三醇和(未指明的)“类似丙三醇的组分”作为增加表面张力和/或降低蒸汽压的任选添加剂的用途。

[0019] 美国专利申请号2019/0134080描述了一种组合物和方法,用于将一氧化氮生成系统局部施用到皮肤上,作为由多部分组合形成的泡沫,所述多部分组合包括第一溶液和第二溶液,该第一溶液包括至少一种亚硝酸盐反应物,第二溶液包括至少一种酸性反应物,其

公开内容在此引入作为参考。还描述了用于保持、充气和以泡沫形式分配组合物的组分的装置。提到了丙三醇作为增加表面张力和/或降低蒸汽压的任选添加剂的用途(第[0068]段)。

[0020] 本发明基于我们令人惊奇的发现:在一种或多种有机多元醇存在下,使用包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的质子源作为亚硝酸盐酸化剂,与迄今为止相比,可以更有效地生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体(统称为NO_x),并提高反应产量。此外,发现使用有机还原性酸作为亚硝酸盐酸化剂的此类反应体系的抗微生物有效的反应产物可以在生理上可耐受的pH下输送,例如pH在约5至约8之间,使用或不使用一种或多种有机多元醇,使得在此类pH下运行的反应体系可直接作为具有有益生理活性(诸如体内抗微生物活性)的组合物输送。已经发现,本发明的一氧化氮生成方法在很长一段时间内(例如超过约2小时、例如超过约5小时、例如超过约10小时)生成生理有效量的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体,任选地在NO_x气体生成的最初的强烈突发之后,产生在医学和其他应用中潜在的重要用途。如果不需要初始的强烈突发,可以在NO_x生成反应开始一段时间后,例如在NO_x生成反应开始后约10分钟、30分钟或1小时或更长一段时间后,向受试者施用反应混合物。

发明内容

[0021] 本发明限定在所附权利要求书中并由所附权利要求书限定,并且是在下面的描述中公开的本发明的更一般的创造性进步的特定实施方案。如所附权利要求书中限定并由所附权利要求书限定的本发明涉及该一般的创造性进步的应用,该一般的创造性进步涉及将进行NO生成反应的组合和组合物、以及该反应的气体产物经由人或动物的鼻、口、呼吸道或肺输送至人或动物受试者。本文关于本发明所描述的所有方面、实施例、实施方案和优选项可同样地且彼此独立地应用于在所附权利要求中限定并由所附权利要求限定的本发明。

[0022] 本发明提供了用于生成一氧化氮和任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的系统、方法、组合、试剂盒和组合物。所述系统、方法、组合、试剂盒和组合物包括一种或多种亚硝酸盐和质子源作为反应物,所述质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸。所述系统、方法、组合、试剂盒和组合物还包括一种或多种有机多元醇。使用还原性酸(即:羧酸还原性酸和非羧酸还原性酸)允许在pH稍微高于4(例如在5至8的范围内)生成一氧化氮和任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体。本发明还提供了用于抗微生物用途的系统、方法、组合、试剂盒和组合物,其中一种或多种有机多元醇是任选的,并且在质子源的初始pH为5至8的范围内进行反应。

[0023] 根据第一方面,本发明提供一种用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的方法,包括:在适于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的反应条件下,使一种或多种亚硝酸盐与质子源反应,所述质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸,其中在一种或多种有机多元醇的存在下进行反应;

[0024] 其特征为以下一个或多个:

[0025] (a) 一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量存在;

[0026] (b) 质子源不只是水凝胶,所述水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧挂羧酸基团;

- [0027] (c) 一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0028] (d) 当使用一种或多种增粘剂时，一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0029] (e) 当使用一种或多种增塑剂时，一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0030] (f) 一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；
- [0031] (g) 当使用一种或多种增粘剂时，一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；
- [0032] (h) 上述 (b) 至 (g) 中的任何一个或多个，其中词语“不只是”替换为“不包括”；
- [0033] (i) 一种或多种有机多元醇不只是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合，或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合；
- [0034] (j) 一种或多种有机多元醇不包括丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合，或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合。
- [0035] 通过根据本发明的第一方面的方法制备的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体构成本发明的第二方面。
- [0036] 根据第三方面，本发明提供了一种用于提高一种或多种亚硝酸盐与质子源反应生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的产出的方法，包括：使用质子源，所述质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸；以及在一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量存在的情况下进行反应。与条件相同但不含一种或多种有机多元醇的情况下进行的反应相比，反应的产出提高了。
- [0037] 根据第四方面，本发明提供了一种或多种有机多元醇在反应混合物中的用途，以提高一种或多种亚硝酸盐与质子源在该反应混合物中反应生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的产出，其中质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸。与条件相同但不含一种或多种有机多元醇的情况下进行的反应相比，反应的产出提高了。
- [0038] 根据第五方面，本发明提供了一种组合、试剂盒或组合物，用于通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体，所述组合、试剂盒或组合物包括：
- [0039] (i) 一种或多种亚硝酸盐；
- [0040] (ii) 质子源，其包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸；以及
- [0041] (iii) 一种或多种有机多元醇；
- [0042] 其特征为以下一个或多个：
- [0043] (a) 一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量存在；
- [0044] (b) 质子源不只是水凝胶，所述水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧挂

羧酸基团；

[0045] (c) 一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；

[0046] (d) 当使用一种或多种增粘剂时，一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；

[0047] (e) 当使用一种或多种增塑剂时，一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；

[0048] (f) 一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；

[0049] (g) 当使用一种或多种增粘剂时，一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；

[0050] (h) 上述 (b) 至 (g) 中的任何一个或多个，其中词语“不只是”替换为“不包括”；

[0051] (i) 一种或多种有机多元醇不只是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合，或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合；

[0052] (j) 一种或多种有机多元醇不包括丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合，或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合。

[0053] 当质子源包括水凝胶(该水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧挂羧酸基团)并且组合或试剂盒包括两种或更多种分离的组合物时，优选地，在单独的组合物中不存在与水凝胶直接接触或混合的一种或多种多元醇。

[0054] 例如，本发明第五方面的组合、试剂盒或组合物的化学物质可以基本上由上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选地水和/或pH缓冲液组成。例如，如果上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选地水和/或pH缓冲液的作用没有受到不利影响，表达“基本上由……组成”可以允许存在少量的一种或多种附加组分。此类一种或多种附加组分的总量可以适当地小于组合、试剂盒的化学成分或组合物的重量或体积的约20%，例如小于重量或体积的约15%，例如小于重量或体积的约10%，例如小于重量或体积的约5%。

[0055] 例如，组合、试剂盒或组合物的化学物质可以由上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选地水和/或pH缓冲液和/或一种或多种附加组分组成，该附加组分的量小于组合、试剂盒的化学成分或组合物的重量或体积的约20%，例如小于重量或体积的约15%，例如小于重量或体积的约10%，例如小于重量或体积的约5%。

[0056] 根据第六方面，本发明提供了一种制备组合、试剂盒或组合物的方法，包括：

[0057] (i) 一种或多种亚硝酸盐；

[0058] (ii) 质子源，其包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸；以及

[0059] (iii) 一种或多种有机多元醇；

[0060] 其包括使组分(i)、(ii)和(iii)相互接近以形成组合或试剂盒，或使组分(i)、(ii)和(iii)混合以形成组合物；

[0061] 其特征为以下一个或多个：

- [0062] (a) 一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量存在；
- [0063] (b) 质子源不只是水凝胶,所述水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧挂羧酸基团；
- [0064] (c) 一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0065] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0066] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,一种或多种有机多元醇不只是丙三醇；
- [0067] (f) 一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；
- [0068] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇；
- [0069] (h) 上述(b)至(g)中的任何一个或多个,其中词语“不只是”替换为“不包括”；
- [0070] (i) 一种或多种有机多元醇不只是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合,或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合；
- [0071] (j) 一种或多种有机多元醇不包括丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合,或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合。
- [0072] 本文所用的表达“组合”是指分离的物质或组合物(称为“组分”),他们彼此接近并一起使用。可以在多个阶段中实现组分的接近,其中一些组分但并非所有组分最初一起形成子组合或部分组合,随后与一种或多种另外的组分或其他子组合或部分组合接近。“接近”可以包括紧密的混合物、溶液或悬浮液,或者可以表示紧密的物理接近,该紧密的物理接近不等于紧密的混合物、溶液或悬浮液,例如位于试剂盒中的分开的容器中,在试剂盒中一起提供这些组分以便以后使用。例如,亚硝酸盐组分和质子源组分分别包括一种或多种亚硝酸盐(或他们中的一些)以及一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸(或他们中的一些)的酸,可分开储存,或储存在试剂盒的分开的容器中,并通过混合在一起使用以引发NO_x生成反应。可以在亚硝酸盐组分和质子源组分中的一种或两种中提供一种或多种有机多元醇,或者可以将其分开单独提供在有机多元醇组分中,当引发NO_x生成反应时,有机多元醇组分也被混合。任意一种或多种组分本身可以存在于多个部分中和多个容器中。组合可以以立即引发NO_x生成反应的方式接近,例如因为亚硝酸盐和质子源处于同一溶液中,因此能够反应。可替代地,组合可以这样接近,使得不立即引发NO_x生成反应,而是需要在引发之前进行一个或多个另外的步骤或动作,例如,因为在NO_x生成反应开始之前,亚硝酸盐和质子源是干粉混合物或以需要水(例如,从该组合接触的粘膜)的胶囊化颗粒存在。
- [0073] 在实施方案中,本发明的第一至第六方面可以彼此独立地特征在于:仅上述特征(a),或仅特征(b),或仅特征(c),或仅特征(d),或仅特征(e),或仅特征(f),或仅特征(g),或仅指(b)的特征(h),或仅指(c)的特征(h),或仅指(d)的特征(h),或仅指(e)的特征(h),

或仅指(f)的特征(h),或仅指(g)的特征(h),或仅特征(a)和(b),或指特征(a)和(b)的特征(h),或仅特征(a)和(c),或指特征(a)和(c)的特征(h),或仅特征(a)和(d),或指特征(a)和(d)的特征(h),或仅特征(a)和(e),或指特征(a)和(e)的特征(h),或仅特征(a)和(f),或指特征(a)和(f)的特征(h),或仅特征(a)和(g),或指特征(a)和(g)的特征(h),或仅特征(b)和(c),或指特征(b)和(c)的特征(h),或仅特征(b)和(d),或指特征(b)和(d)的特征(h),或仅特征(b)和(e),或指特征(b)和(e)的特征(h),或仅特征(b)和(f),或指特征(b)和(f)的特征(h),或仅特征(a)、(b)、(c)和(f),或指特征(a)、(b)、(c)和(f)的特征(h),或全部特征(a)至(g),或特征(a)和(b)以及指全部特征(c)至(g)的特征(h)一起。

[0074] 在其他实施方案中,本发明的第一至第六方面可以相互独立地特征在于:仅上述特征(c)、(f)和(i),或仅特征(c)、(f)和(j),或特征(i)以及指特征(c)和(f)的特征(h),或特征(j)以及指特征(c)和(f)的特征(h),或仅特征(d)、(g)和(i),或仅特征(d)、(g)和(j),或特征(i)以及指特征(d)和(g)的特征(h),或特征(j)以及指特征(d)和(g)的特征(h),或仅特征(e)、(f)和(i),或仅特征(e)、(f)和(j),或特征(i)以及指特征(e)和(f)的特征(h),或特征(j)以及指特征(e)和(f)的特征(h)。

[0075] 优选地,本发明的第一至第六方面的特征在于:全部特征(a)至(g),或特征(a)和(b)以及指全部特征(c)至(g)的特征(h)一起,或仅特征(c)、(f)和(i),或仅特征(c)、(f)和(j),或特征(i)以及指特征(c)和(f)的特征(h),或特征(j)以及指特征(c)和(f)的特征(h),或仅特征(d)、(g)和(i),或仅特征(d)、(g)和(j),或特征(i)以及指特征(d)和(g)的特征(h),或特征(j)以及指特征(d)和(g)的特征(h),或仅特征(e)、(f)和(i),或仅特征(e)、(f)和(j),或特征(i)以及指特征(e)和(f)的特征(h),或特征(j)以及指特征(e)和(f)的特征(h)。应当注意,当特征(c)和(f)表征本发明时,特征(d)、(e)和(g)是多余的;在这种情况下,特征(d)、(e)和(g)(或指特征(d)、(e)和(g)的特征(h))可以从列表中省略,并被认为是表征的特征(c)和(f)(或指特征(c)和(f)的特征(h))的实例。

[0076] 本文所用的表达“一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量”是指一种或多种有机多元醇的量使得来自 NO_x 生成反应的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体中至少一种的量和/或产出时间段高于在条件相同但不含一种或多种有机多元醇的条件下进行反应的情况。表达“量”特别是指在起始反应体系中每克可用于反应的亚硝酸盐所释放的气态一氧化氮的总质量。本发明基础上的实验工作已经测定了释放的气态一氧化氮的量,任选地还测定了其他气体的量,并发现这些量得以提高。据信,本发明提高了所生成的 NO_x 的总质量,因此表达“量”还应理解为包括通入反应混合物中的溶液中的一氧化氮的总质量以及 NO_x 反应产物的总质量。表达“产出时间段”特别是指在反应完成之前,在反应中释放出至少一种气态一氧化氮、任选地还释放出其他气体的时间长度。出于与上面所讨论的短语“一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量”中所解释的相同的原因,相信短语“产出时间段”还包括一氧化氮通入反应混合物中的溶液中的时间长度以及生成 NO_x 反应产物的时间长度。众所周知,最终通过与质子源的反应排出亚硝酸盐,在 NO_x 生成反应过程中升高的pH达到其最大值,反应停止。优选地,本发明第一方面的方法提高了 NO_x 生成反应的产率,特别是但不限于产生的NO的量,例如产生的气态NO的量,提高至少约5%,例如至少约10%,例如至少约25%,例如高达约150%的提高程度,例如高达约125%的提高程度,例如高达约100%的提高程度,例如高达约75%的提高程度。优选地,本发明第一方面的方法使

得在反应完成之前,一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体中的至少一种(优选一氧化氮)在反应中释放的时间长度提高至少约5%,例如至少约10%。使用本发明,一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体中的至少一种(优选一氧化氮并且最优选气态一氧化氮)释放——特别是以有效量释放——的时间段可以提高到至少约2小时,例如至少约5小时,例如高达或大于约10小时。例如,这种一氧化氮释放时间提高的程度可以表示,在不使用多元醇组分的情况下,其提高程度可高达或大于释放相同量氮氧化物时间段的约150%,例如高达约125%的提高程度,例如高达约100%的提高程度,例如高达约75%的提高程度。

[0077] 一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地前体的生成可以用于任何目的。将在下面举例并讨论治疗和非治疗目的。

[0078] 根据第七方面,本发明提供了一种将一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到目标位置(例如任何细胞、器官、表面、结构、受试者或其中的内部空间)的治疗性或非治疗性方法,其包括:(a)向目标位置或其附近施用根据本发明的第五方面的组合或组合物;或者(b)使用根据本发明的第一或第三方面的方法,或根据本发明的第四方面进行使用,或使用根据本发明的第五方面的组合、试剂盒或组合物来生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到目标位置或其附近;或者(c)根据本发明的第二方面,将一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到目标位置或其附近。

[0079] 例如,本发明的第七方面的方法可以是治疗有需要的受试者的微生物感染的方法。所述受试者例如可以是人类受试者或其他哺乳动物受试者。例如,微生物感染可以是细菌、病毒、真菌、微寄生虫或其任意组合。

[0080] 例如,本发明的第七方面的方法可以是对受试者进行血管舒张的方法。所述受试者例如可以是人类受试者或其他哺乳动物受试者。

[0081] 例如,本发明的第七方面的方法可以是抗微生物方法。所述抗微生物方法可以是减少位点处的微生物(例如细菌、病毒、真菌细胞和/或微寄生生物)的数量,以防止其增殖,或限制其增殖速率。此类方法靶向的微生物可以是例如浮游生物细胞或颗粒,或者以生物膜或其他菌落的形式存在。本发明所靶向的任何微生物种群,无论是浮游生物,都可以由一种微生物种类或菌株组成,或者可以包括一种以上的种类或菌株。

[0082] 根据第八方面,本发明提供了用于治疗的根据本发明的第五方面的组合、试剂盒或组合物,或根据本发明的第二方面的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体。

[0083] 例如,根据本发明的第八方面的用于使用的组合、试剂盒或组合物或一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体可以用于将一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到受试者或其内部空间的治疗方法,其包括:(a)将根据本发明的第五方面的组合或组合物施用到受试者或内部空间,或其附近;或者(b)使用根据本发明的第一或第三方面的方法,或根据本发明的第四方面进行使用,或使用根据本发明第五方面的组合、试剂盒或组合物来生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到受试者或内部空间或其附近;或者(c)根据本发明的第二方面,将一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送

到受试者或内部空间或其附近。

[0084] 根据本发明,我们意外地发现,当质子源是初始pH为5-8的柠檬酸(一种有机羧酸)或抗坏血酸(一种有机非羧酸还原性酸)时,在生物抑制和生物杀伤作用方面具有良好的抗微生物活性,证据是3天后脓肿分枝杆菌(*M. abscessus*)的杀灭率和/或结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、H1N1流感病毒、SARS-CoV病毒和SARS-CoV-2病毒的杀灭率高达100%。本文的表达“初始pH”是指于存在反应混合物中的其他组分将会影响初始pH之前,最初形成的质子源水溶液(包括任何所需的pH缓冲液)的pH值。这种抗微生物作用不依赖于一种或多种有机多元醇的存在,虽然他似乎通过一种或多种有机多元醇(例如甘露醇或山梨糖醇)的存在而增强。从NO_x生成反应产物中发现了强的抗微生物作用,其中酸(例如柠檬酸或抗坏血酸)的初始pH值在5-8的范围内尤其令人惊奇,在治疗呼吸道和肺部感染,包括那些难以治疗和/或对抗生素有抗性的感染,包括结核病、多药抗性结核病和非结核分枝杆菌感染中,应用前景广阔。可以通过吸入含有反应混合物或其组分或前体的雾化含水组合物,在5-8范围内的pH下,进行此类感染的治疗。本发明还能够进行感染治疗,感染包括多种病原体、潜在地包括来自细菌、病毒、真菌和寄生虫中的多于一种的病原体,称作“广谱”治疗(包括治疗性和/或预防性治疗以及体外治疗有生命和无生命的表面和空间以防止病原体传播)。

[0085] 根据第九方面,本发明提供了根据第七方面的抗微生物方法的改进,其包括:(a)向待靶向的微生物或其附近,或向感染微生物的受试者或此类的受试者的内部空间施用根据本发明的第五方面的组合或组合物;或者(b)使用根据本发明的第一或第三方面的方法,或根据本发明的第四方面进行使用,或使用根据本发明的第五方面的组合、试剂盒或组合物来生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到待靶向的微生物或其附近,或感染微生物的受试者或此类受试者的内部空间;或者(c)根据本发明的第二方面,将一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体输送到待靶向的微生物或其附近,或感染微生物的受试者或此类受试者的内部空间;条件是在于存在NO_x生成反应混合物的其他组分将会影响pH之前,质子源水溶液(包括任何所需的缓冲液)的初始pH,或者在与一种或多种亚硝酸盐反应开始时反应混合物的pH在5-8的范围内,并且一种或多种多元醇是任选的并且可以省略。

[0086] 在实施根据本发明的第九方面的方法时,根据本发明的第五或第八方面的组合、试剂盒或组合物可用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体;条件是在于存在NO_x生成反应混合物的其他组分将会影响pH之前,质子源水溶液(包括任何所需的缓冲液)的初始pH,或者在与一种或多种亚硝酸盐反应开始时反应混合物或pH在5-8的范围内,并且一种或多种多元醇是任选的并且可以省略。

[0087] 例如,本发明的第九方面的方法可以是治疗有需要的受试者的微生物感染的方法。所述受试者例如可以是人类受试者或其他哺乳动物受试者。例如,微生物感染可以是细菌、病毒、真菌、微寄生虫感染或其任意组合。微生物感染可以在受试者的皮肤上,包括粘膜。微生物感染可以在受试者的内部空间中,例如根据本发明在受试者的鼻、口、呼吸道、肺或肺胸膜的内膜中。

[0088] 向人或动物体施用的在本发明的所有方面中使用的组分和混合物、以及向人或动物体施用的任何载体和赋形剂优选是生物相容的和/或药学上可接受的,以使施用时对组织的刺激和炎症最小。

[0089] 根据本发明的组合、试剂盒和组合物可以储存并与各种合适的设备和装置一起使用,这将在下面进行更详细的描述。可以适当地使用此类设备和装置来进行根据本发明的方法,这将在下面进行更详细的描述。

[0090] 关于本发明的任何一个或多个方面具体描述的所有实施方案、实施例和优选例将被理解为可应用于本发明的任何一个或多个其他方面。此外,如果需要的话,根据本发明的一个方面的任何方法或用途可以使用根据任何其他方面的组合、试剂盒或组合物来进行。

具体实施方式

[0091] 现在参考特定实施方案详细描述本发明的方面。下面描述的特定实施方案可以应用于本发明的任何方面,除非与这个方面明显不兼容。除非不兼容,否则特定实施方案也可与每个以及每一个其他特定实施方案组合。

[0092] 亚硝酸盐和亚硝酸盐组分

[0093] 本发明的方面涉及使用一种或多种亚硝酸盐。下面术语“亚硝酸盐组分”涵盖一种或多种亚硝酸盐本身以及含有一种或多种亚硝酸盐的用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的反应体系的任何组分。

[0094] 对亚硝酸盐的选择没有特别的限制。可用于本发明的组合物中的亚硝酸盐的具体实例包括碱金属亚硝酸盐或碱土金属亚硝酸盐。在一些实施方案中,一种或多种亚硝酸盐选自 LiNO_2 、 NaNO_2 、 KNO_2 、 RbNO_2 、 CsNO_2 、 FrNO_2 、 AgNO_2 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 及其任意混合物。

[0095] 在特定的实施方案中,亚硝酸盐是 NaNO_2 或 KNO_2 。在一个实施方案中,亚硝酸盐是 NaNO_2 。

[0096] 在一个实施方案中,可以以干燥形式、任选地以诸如粉末的颗粒形式,提供亚硝酸盐组分用于本发明中。如果需要,亚硝酸盐组分可以被包封或微包封,例如为了控制或延迟一种或多种亚硝酸盐与质子源之间的反应。干燥形式和/或包封可以有助于亚硝酸盐组分的储存,无论是单独的还是与根据本发明的生成一氧化氮的反应的其他组分混合。更进一步地,干燥形式和/或包封可以有助于将亚硝酸盐组分单独地或与根据本发明的用于生成一氧化氮的反应的其他组分混合地掺入到诸如医疗装置之类的小物体中。此类物体包括例如创伤敷料、绷带、血管和其他支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、矫形螺钉和销钉、以及其他薄的医疗和/或可植入制品和吸入剂(手持式和雾化器)。请参见下面标题为“任选的组分的包封(例如微包封)”的部分部分以了解更多详情。

[0097] 如果需要,任选地包封或微包封的亚硝酸盐组分可作为干粉或晶体存在,或者与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)联合,例如作为水性凝胶或其溶液存在。亚硝酸盐组分可以是干燥或粉末形式,在使用前可以通过加入水来方便地配制成溶液。在加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在酸化(例如,紧接之前),此类亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度可以在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在酸化之前(例如,紧接之前),亚硝酸盐溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在酸化之前(例如,紧接之前),亚硝酸盐溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.1M

至约2M的范围内。在更特定的实施方案中,在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在酸化之前(例如,紧接之前),亚硝酸盐溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在酸化之前(例如,紧接之前),亚硝酸盐溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度可以在约0.8M至约1.2M的范围内。例如,在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在与有机羧酸组分组合之前(例如,紧接之前),亚硝酸盐溶液中亚硝酸根离子的摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0098] 应当注意,如本领域技术人员所熟知的那样,组合NO_x生成反应混合物的两种或更多种前体溶液的动作将导致稀释每种溶质的浓度或每种溶液中溶质的组合。例如,将等体积的溶质A和B的两种1M溶液混合的动作使A的浓度变为0.5M,B的浓度变为0.5M。除非另有说明或暗示,本文所述的亚硝酸盐的浓度是其在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前)的初始溶液中的浓度,所述其他组分作为液体(例如溶液)加入。可以容易地导出NO_x生成反应混合物中的实际浓度,知道反应混合物的组分以及他是如何制备的。

[0099] 如果需要,亚硝酸盐组分(无论是以干燥形式还是以载液形式)可以包括一种或多种多元醇或一些此类多元醇。

[0100] 如果需要将亚硝酸盐组分储存在凝胶或其他载体体系(例如含水载体)中,例如作为含水凝胶或溶液,优选将含有亚硝酸盐的体系缓冲到合适的pH,以防止亚硝酸盐在储存期间降解。优选pH为约6-9,例如约7。

[0101] 优选亚硝酸盐组分不与质子源接触,直到需要生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体。为此,亚硝酸盐组分优选保持在试剂盒、设备或装置的贮存器或容器中。然而,可替代地,亚硝酸盐组分、质子源和一种或多种多元醇的干燥组分也可以作为干燥组合物保持,例如颗粒混合物,并且通过简单地加入水或另一种合适的溶剂或液体载体来引发反应。

[0102] 亚硝酸盐可以是药学上可接受等级的亚硝酸盐。在一些实施方案中,亚硝酸盐是药典级的。换言之,亚硝酸盐可以遵守一个或多个亚硝酸盐的活性药典专论。例如,亚硝酸盐可以遵守美国药典(USP)、欧洲药典或日本药典中的一个或多个的亚硝酸盐的专论。

[0103] 在特定的实施方案中,所用的亚硝酸盐在其特性上具有以下限制中的一个或多个:

[0104] (i) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.02%、约0.01%或约0.001%的碳酸钠;

[0105] (ii) 亚硝酸盐含有不超过约10ppm(按重量计0.001%)的抗结块剂,诸如烷基萘磺酸钠;

[0106] (iii) 亚硝酸盐是白色至灰白色固体;

[0107] (iv) 亚硝酸盐对根据相关USP中的相关方法测定的阳离子具有阳性鉴定;

[0108] (v) 亚硝酸盐对根据相关USP中的相关方法测定的亚硝酸根具有阳性鉴定检测;

[0109] (vi) 亚硝酸盐含有不少于按重量计约97%或不少于按重量计98%的亚硝酸盐和/或不超过按重量计102%或不超过按重量计101%的亚硝酸盐,任选地,通过相关USP量热测定法测定,例如通过离子色谱法测定,诸如与抑制电导检测联用的离子色谱法;

- [0110] (vii) 25°C下在10%溶液中测定时,亚硝酸盐的pH值在约7和约9之间,或约8和约9之间,任选地根据相关USP和/或使用pH计来测定;
- [0111] (viii) 亚硝酸盐的干燥损失不超过按重量计约0.25%或约0.01%;
- [0112] (ix) 亚硝酸盐的含水量不超过按重量计约0.5%,任选地通过Karl Fischer方法测定;
- [0113] (x) 亚硝酸盐中的重金属含量不超过约10ppm的重金属,任选地亚硝酸盐中的重金属含量不超过约10ppm;
- [0114] (xi) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.4%的硝酸盐,任选地,当亚硝酸钠盐是亚硝酸钠时,硝酸钠不超过按重量计约0.4%,当亚硝酸钾盐是亚硝酸钾时,硝酸钾不超过按重量计约0.4%;
- [0115] (xii) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%或约0.001%的不溶物;
- [0116] (xiii) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%的氯化物;
- [0117] (xiv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.01%的硫酸盐;
- [0118] (xv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.001%的铁;
- [0119] (xvi) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.01%的钙;
- [0120] (xvii) 当亚硝酸盐不是亚硝酸钾时,亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%或约0.001%的钾,或者当亚硝酸盐不是亚硝酸钠时,亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%或约0.001%的钠;
- [0121] (xviii) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.1%、不超过约5000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的有机挥发性化合物;
- [0122] (xix) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.1%、不超过约5000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的乙醇;
- [0123] (xx) 亚硝酸盐含有不超过约3000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的甲醇;
- [0124] (xxi) 亚硝酸盐含有不超过约50ppm、不超过约25ppm、不超过约20ppm、不超过约10ppm、不超过约7.9ppm、不超过约8ppm、不超过约6ppm、不超过约5.6ppm,或不超过约2.5ppm的非挥发性有机碳;
- [0125] (xxii) 亚硝酸盐含有不超过约0.05ppm的汞;
- [0126] (xxiii) 亚硝酸盐含有不超过约2ppm或0.2ppm的铝;
- [0127] (xxiv) 亚硝酸盐含有不超过约3ppm或1ppm的砷;
- [0128] (xxv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.003%或0.001%的硒;
- [0129] (xxvi) 亚硝酸盐中微生物负荷的总需氧计数不超过约100CFU/g;
- [0130] (xxvii) 硝酸盐中酵母和霉菌总计数不超过约20CFU/g;
- [0131] (xxviii) 亚硝酸盐含有不超过约0.25EU/mg或0.018EU/mg的细菌内毒素;以及
- [0132] (xxix) 亚硝酸盐含有少于约0.1ppm的磷酸盐,诸如磷酸钠、磷酸氢二钠或磷酸三钠,并且优选地亚硝酸盐不含有可检测量的磷酸盐。
- [0133] 在某些实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)中的两个或更多个特性。在另一个实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)中的五个或更多个特性。在又一个实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的十个或更多个特性。在甚至另一个实施方案中,亚硝酸盐具有

(i) 至 (xxix) 的十五个或更多个特性。在一些实施方案中,亚硝酸盐具有 (i) 至 (xxix) 中的二十个或更多个特性。在特定的实施方案中,亚硝酸盐具有 (i) 至 (xxix) 的所有特性。在更特定的实施方案中,亚硝酸盐是具有 (i) 至 (xxix) 的所有特性的亚硝酸钠。

[0134] 在一些实施方案中,亚硝酸盐含有按重量计约97%至约101%的亚硝酸盐,任选地通过相关USP量热分析来测定,例如通过离子色谱法来测定,诸如与抑制电导检测联用的离子色谱法。在可替代实施方案中,亚硝酸盐含有按重量计约98%至约102%的亚硝酸盐,任选地通过相关USP量热分析来测定,例如通过离子色谱法来测定,诸如与抑制电导检测联用的离子色谱法。

[0135] 在特定的实施方案中,亚硝酸盐具有以下特性:

[0136] (i) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.02%的碳酸钠;

[0137] (ii) 亚硝酸盐含有不超过约10ppm的抗结块剂;

[0138] (vi) 亚硝酸盐含有不少于按重量计97%的亚硝酸盐和不超过按重量计101%的亚硝酸盐,通过USP量热法来测定;

[0139] (viii) 亚硝酸盐的干燥损失不超过按重量计约0.25%;

[0140] (ix) 亚硝酸盐的含水量不超过按重量计约0.5%;

[0141] (x) 亚硝酸盐中的重金属含量不超过约10ppm;

[0142] (xi) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.4%的硝酸盐;

[0143] (xii) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%的不溶物;

[0144] (xiii) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.005%的氯化物;

[0145] (xiv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.01%的硫酸盐;

[0146] (xv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.001%的铁;

[0147] (xvi) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.01%的钙;

[0148] (xviii) 亚硝酸盐含有不超过约5000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的有机挥发性化合物;

[0149] (xxi) 亚硝酸盐含有不超过约10ppm或不超过约2.5ppm的非挥发性有机碳;

[0150] (xxii) 亚硝酸盐含有不超过约0.05ppm的汞;

[0151] (xxiii) 亚硝酸盐含有不超过约2ppm的铝;

[0152] (xxiv) 亚硝酸盐含有不超过约3ppm的砷;

[0153] (xxv) 亚硝酸盐含有不超过按重量计约0.003%的硒;

[0154] (xxvi) 亚硝酸盐中微生物负荷的总需氧计数不超过约100CFU/g;

[0155] (xxvii) 硝酸盐中酵母和霉菌总计数不超过约20CFU/g;以及

[0156] (xxviii) 亚硝酸盐含有不超过约0.25EU/mg的细菌内毒素。

[0157] 在这些实施方案中,亚硝酸盐可以是亚硝酸钠,并且含有不超过按重量计约0.005%的钾。优选地,亚硝酸钠还具有以下限制中的一个或多个:

[0158] (iii) 亚硝酸钠是白色至灰白色固体;

[0159] (iv) 亚硝酸钠对根据相关USP中的相关方法测定的钠具有阳性鉴定;

[0160] (v) 亚硝酸钠对根据相关USP中的相关方法测定的亚硝酸根具有阳性鉴定检测;

[0161] (vii) 25°C下在10%溶液中测定时,亚硝酸钠的pH值在约7和约9之间,或约8和约9之间,任选地根据相关USP和/或使用pH计来测定;

[0162] (xix) 亚硝酸钠含有不超过按重量计约0.1%、不超过约5000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的乙醇;

[0163] (xx) 亚硝酸盐含有不超过约3000ppm、不超过约1000ppm、不超过约500ppm、不超过约100ppm或不超过约10ppm的甲醇;以及

[0164] (xxix) 亚硝酸盐含有少于约0.1ppm的磷酸盐,诸如磷酸钠、磷酸氢二钠或磷酸三钠,并且优选地亚硝酸盐不含有可检测量的磷酸盐。

[0165] 可根据USP XXXII (2009) 中的相关方法来确定(i)至(xxix)的特性。在WO 2010/093746中提供了用于确定(i)至(xxix)的特性的方法,其公开内容在此引入作为参考。在WO 2010/093746中还描述了制备具有(i)至(xxix)的特性中的一个或多个的亚硝酸钠的方法。

[0166] 包括一种或多种有机羧酸的质子源和质子源组分

[0167] 本发明的方面涉及质子源,该质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸。下面的术语“质子源组分”涵盖质子源本身以及含有质子源的用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的反应体系的任何组分。

[0168] 在该部分中,将更详细地举例说明有机羧酸。

[0169] 本文的表达“有机羧酸”是指分子中含有一个或多个-COOH基团的任何有机酸。有机羧酸可以是直链或支链的。羧酸可以是饱和的或不饱和的。羧酸可以是脂族的或芳族的。羧酸可以是无环的或环状的。羧酸可以是插烯羧酸。

[0170] 有机羧酸可以带有一个或多个取代基,例如一个或多个羟基。可用于本发明的羟基取代的有机羧酸的实例包括 α -羟基羧酸、 β -羟基羧酸和 γ -羟基羧酸。

[0171] 一种或多种有机羧酸(或者如果多于一种,则他们中的每一种)应当优选 pK_{a1} 小于约7,更优选小于7.0。

[0172] 一种或多种羧酸可以是一种或多种还原性羧酸、包括一种或多种还原性羧酸,或由一种或多种还原性羧酸组成。

[0173] 羧酸可以是酸性水凝胶,其含有共价连接到形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子上的侧挂-COOH基团。此类含有羧酸的水凝胶的实例描述于例如WO 2007/007115、WO 2008/087411、WO 2008/087408、WO 2014/188174和WO 2014/188175以及本文提到的文献中,所有这些文献的公开内容在此引入作为参考。此类水凝胶通常包括以酸或盐形式共价结合到三维聚合物基质上的侧基羧酸和磺酰基。为了进一步讨论,请参见下面标题为“用于组分的其他贮存器:水凝胶”的部分。

[0174] 然而,通常优选地,选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的一种或多种酸中的至少一种不共价结合到聚合物或大分子上,例如形成水凝胶的三维聚合物或大分子基质的聚合物或大分子。不希望受理论的约束,该证据——例如在下文标题为“有机多元醇”的部分中讨论的依赖于多元醇立体异构作用的证据——表明至少部分地通过在酸化反应期间有机多元醇分子与亚硝酸盐和质子相互作用的作用来实现本发明提高一种或多种亚硝酸盐与质子源反应产出的效果,这意味着反应物分子在多元醇分子作用下在反应过程中取向和重定位的迁移性可能是重要的。即使多元醇不一定存在,诸如在本发明的第八方面,也可以推测在一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应中,反应物之间的相同迁移性可能是重要的。

[0175] 例如,有机羧酸可以选自水杨酸、乙酰水杨酸、乙酸、柠檬酸、乙醇酸、扁桃酸、酒石酸、乳酸、马来酸、苹果酸、苯甲酸、甲酸、丙酸、 α -羟基丙酸、 β -羟基丙酸、 β -羟基丁酸、 β -羟

基- β -丁酸、萘甲酸、油酸、棕榈酸、帕莫 (embolic) 酸、硬脂酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、葡萄糖庚酸、葡萄糖醛酸、乳糖酸、肉桂酸、丙酮酸、乳清酸、甘油酸、甘草酸、山梨酸、透明质酸、藻酸、草酸、其盐及其组合。在特定的实施方案中,有机羧酸选自柠檬酸、其盐及其组合。在一个特定实施方案中,有机羧酸是柠檬酸或其盐。羧酸可以是聚合或聚合化的羧酸,或包括聚合或聚合化的羧酸,例如聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸,或乳酸和乙醇酸的共聚物。本文所用的术语“有机羧酸”还涵盖有机羧酸的部分或全部酯,或其部分或全部盐,条件是它们可用作根据本发明使用的质子源。

[0176] 优选地,紧接在一种或多种亚硝酸盐与质子源接触之前的质子源的pH被缓冲,以将pH控制在已知的范围内并限制随着亚硝酸盐的消耗而pH增加的速率。请参见以下标题“pH控制;任选的缓冲液体系”部分以了解更多详情。特别地,设想质子源的至少一种有机羧酸可以与其共轭碱适当地存在。酸及其共轭碱可以适当地在含水载体中形成缓冲液。可以选择缓冲液,从而在NO_x生成反应进行时保持所需的pH,优选pH在约3至9的范围内,例如约4至8,优选用于生理接触或用于与活细胞和生物体接触的pH在约5至约8的范围内。如果存在的话,可以单独加入共轭碱,或者可以通过使用酸和/或碱,优选无机酸和/或无机碱,调节pH从质子源原位生成共轭碱。

[0177] 在加入NO_x生成反应混合物的其他组分将会影响pH之前(例如,紧接之前),质子源水溶液(包括任何所需的缓冲液)的初始pH,或者在与一种或多种亚硝酸盐反应开始时反应混合物的pH,合适地在约3至9的范围内,例如约4至8,例如约5至8。本文与质子源一起使用的表达“初始pH”是指在加入NO_x生成反应混合物的其他组分(包括一些但并非全部组分)将会影响pH之前(例如,紧接之前),该质子源水溶液(包括任何所需的缓冲液)的pH。干粉状质子源材料或质子源水溶液的其他前体将以适当的量使用,这将得到具有所需初始pH的水溶液。

[0178] 如果希望将质子源组分储存在凝胶或其他载体体系(例如水性载体)中,例如作为水性凝胶或溶液,优选将含有质子源的体系缓冲到合适的pH,以防止在储存期间保持酸性并防止质子源降解。优选pH为约3-6,例如约3-5。如果需要,可以通过在使用质子源组分之前立即加入碱来提高pH。

[0179] 例如,一些患者对柠檬酸具有不耐受性。在治疗之前,应当测试患者对酸的可能不耐受性,并且相应地选择酸组分。

[0180] 在一个实施方案中,可以以干燥形式、任选地以诸如粉末的颗粒形式提供亚硝酸盐组分用于本发明中。如果需要,亚硝酸盐组分可以被包封或微包封,例如为了控制或延迟一种或多种亚硝酸盐与质子源之间的反应。特别地,当质子源在室温下通常为液体或凝胶状态时,可以使用包封形式。干燥形式和/或包封可以有助于质子源的储存,无论是单独的还是与根据本发明的生成一氧化氮的反应的其他组分混合。更进一步地,干燥形式和/或包封可以有助于将质子源组分单独地或与根据本发明的生成一氧化氮的反应的其他组分混合地掺入到诸如医疗装置之类的小物体中。此类物体包括例如创伤敷料、绷带、血管和其他支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、矫形螺钉和销钉、以及其他薄的医疗和/或可植入制品。请参见下面标题为“任选的组分的包封(例如微包封)”的部分以了解更多详情。

[0181] 如果需要,任选地被包封或微包封的一种或多种有机羧酸可作为干粉或晶体存在

于质子源组分中,或者与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)联合,例如作为水性凝胶或其溶液存在。含有有机羧酸的质子源组分是干燥或粉末形式,在使用前可以通过加入水来方便地配制成溶液。在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在与亚硝酸盐的反应开始之前(例如,紧接之前),此类溶液中总质子源(包括任何存在的有机非羧酸还原性酸)的摩尔浓度可以在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前),特别是在与亚硝酸盐的反应开始之前(例如,紧接之前),此类溶液中总质子源的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在与亚硝酸盐的反应开始之前,此类溶液中总质子源的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更特定的实施方案中,在与亚硝酸盐的反应开始之前,此类溶液中总质子源的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在与亚硝酸盐的反应开始之前,此类溶液中总质子源的摩尔浓度可以在约0.8M至约1.2M的范围内。例如,在与亚硝酸盐的反应开始之前,此类溶液中总质子源的摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0182] 本文所用的表达“总质子源的摩尔浓度”、“总质子源的浓度”等应当理解为是指在于质子(H⁺)供体部分或至少一个质子(H⁺)供体部分(其中存在多于一个)主要是质子化的(即超过50%的质子化摩尔数)pH下,被用作根据本发明的质子源的任意一种有机羧酸和/或有机非羧酸的浓度。换言之,如果在NO_x生成反应开始之前将pH调节到较高的pH,从而质子化程度降低,那么不应认为总质子源的摩尔浓度或浓度相应降低。

[0183] 应当注意,如本领域技术人员所熟知的那样,组合NO_x生成反应混合物的两种或更多种前体溶液的动作将导致稀释每种溶质的浓度或每种溶液中溶质的组合。例如,将等体积的溶质A和B的两种1M溶液混合的动作使A的浓度变为0.5M,B的浓度变为0.5M。除非另有说明或暗示,本文所述的亚硝酸盐的浓度是其在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前)的初始溶液中的浓度,所述其他组分作为液体(例如溶液)加入。可以容易地导出NO_x生成反应混合物中的实际浓度,知道反应混合物的组分以及他是如何制备的。

[0184] 可以在使用前通过加入水,方便地将干燥或粉末形式的质子源组分制成溶液。

[0185] 如果需要,一种或多种有机羧酸(无论是以干燥形式还是以载液形式)可以与一种或多种多元醇或一些此类多元醇以混合物或溶液的形式存在。

[0186] 优选亚硝酸盐组分不与质子源接触,直到需要生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体。为此,质子源组分或其一部分优选保持在试剂盒、设备或装置的存储器或容器中。然而,可替代地,一种或多种亚硝酸盐或亚硝酸盐组分、质子源和一种或多种多元醇的干燥组分也可以作为干燥组合物保持,例如颗粒混合物,并且通过简单地加入水或另一种合适的溶剂或液体载体来引发反应。

[0187] 包括一种或多种有机非羧酸还原性酸的质子源组分

[0188] 对包括一种或多种有机羧酸或由一种或多种有机羧酸组成的质子源组分的上述讨论类似地适用于包括一种或多种有机非羧酸还原性酸或由一种或多种有机非羧酸还原性酸组成的质子源组分。在此部分中,将更详细地举例说明有机非羧酸还原性酸。

[0189] 本文的表达“有机非羧酸还原性酸”是指在分子中不含-COOH基团的任何有机还原性酸。有机非羧酸还原性酸可以是直链或支链的。非羧酸还原性酸可以是饱和的或不饱和

的。非羧酸还原性酸可以是脂族的或芳族的。非羧酸还原性酸可以是无环的或环状的。非羧酸还原性酸可以是插烯的。

[0190] 一种或多种有机非羧酸还原性酸(或者如果多于一种,则他们中的每一种)应当优选 pK_{a1} 小于约7,更优选小于7.0。

[0191] 由于上述原因,通常优选地,选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的一种或多种酸中的至少一种不共价连接到聚合物分子上,例如形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子。

[0192] 例如,有机非羧酸还原性酸可以选自抗坏血酸;抗坏血酸棕榈酸(抗坏血酸棕榈酸酯);抗坏血酸盐衍生物,诸如3-0-乙基抗坏血酸、其他3-烷基抗坏血酸、6-0-辛酰基抗坏血酸、6-0-十二烷酰基抗坏血酸、6-0-十四烷酰基抗坏血酸、6-0-十八烷酰基抗坏血酸和6-0-十二烷二酰基抗坏血酸;酸性还原性酮,诸如还原酸;异抗坏血酸;草酸;其盐;及其组合。在一个特定实施方案中,有机非羧酸还原性酸是抗坏血酸或其盐。

[0193] 有机非羧酸还原性酸可以带有一个或多个取代基,例如一个或多个羟基。可用于本发明的羟基取代的有机非羧酸还原性酸的实例包括酸性还原性酮,例如还原酸(2,3-二羟基-2-环戊酮)。

[0194] 优选地,在一种或多种亚硝酸盐与质子源接触之后,缓冲质子源和/或反应混合物的pH,以将pH控制在已知的范围内,并在消耗亚硝酸盐时控制pH的增加。请参见以下标题为“pH控制:任选的缓冲液体系”部分以了解更多详情。特别地,设想质子源的至少一种有机非羧酸还原性酸可以与其共轭碱一起适当地存在。酸及其共轭碱可以适当地在含水载体中形成缓冲液。可以选择缓冲液,从而在NO生成反应进行时保持所需的pH,优选pH在约3至9的范围内,例如约4至8,优选用于生理接触或用于与活细胞和生物体接触的pH在约5至8的范围内。如果存在的话,可以单独加入共轭碱,或者可以通过使用酸和/或碱,优选无机酸和/或无机碱,调节pH从质子源原位生成共轭碱。

[0195] 在加入NO_x生成反应混合物的其他组分将会影响pH之前(例如,紧接之前)质子源水溶液(包括任何所需的缓冲液)的初始pH值,或者在与一种或多种亚硝酸盐反应开始时反应混合物的pH,合适地在约3至9的范围内,例如约4至8,例如约5至8。干粉状质子源材料或质子源水溶液的其他前体将以适当的量使用,这将得到具有所需初始pH的水溶液。

[0196] 如果希望将质子源组分储存在凝胶或其他载体体系(例如水性载体)中,例如作为水性凝胶或溶液,优选将含有质子源的体系缓冲到合适的pH,以防止在储存期间保持酸性并防止质子源降解。优选pH为约3-6,例如约3-5。如果需要,可以通过在使用质子源组分之前立即加入碱来提高pH。

[0197] 一些还原性酸(诸如草酸)是有毒的。应当相应地选择酸组分。

[0198] 除了上述一种或多种有机羧酸之外,或者代替上述一种或多种有机羧酸,可以在质子源组分中使用一种或多种有机非羧酸还原性酸。请参见标题为“包括一种或多种有机羧酸的质子源和质子源组分”的部分以了解进一步的详情。

[0199] 有机多元醇和有机多元醇组分

[0200] 本发明的方面涉及一种或多种有机多元醇。下面的术语“有机多元醇组分”或“多元醇组分”涵盖有机多元醇本身以及含有有机多元醇的用于生成一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体的反应体系的任何组分。

[0201] 本文的表达“有机多元醇”是指具有两个或更多个羟基的有机分子,其不是质子源,特别是对于亚硝酸盐反应,并且不是糖或多糖(术语“糖”和“多糖”包括寡糖、聚糖和糖胺聚糖)。因此,有机多元醇的 pK_{a1} 将为约7或更大,例如7.0或更大。

[0202] 本文的表达“有机多元醇”优选不包括还原剂。因此,在本发明的一个实施方案的所有方面中,有机多元醇不包括还原剂。还原剂的实例是具有两个或更多个羟基而并非糖或多糖的有机分子,是硫代丙三醇(例如1-硫代丙三醇)、对苯二酚、丁基化对苯二酚、抗坏血酸、抗坏血酸盐、异抗坏血酸和异抗坏血酸盐。因此,由于是还原剂,硫代丙三醇(例如1-硫代丙三醇)、对苯二酚、丁基化对苯二酚、抗坏血酸盐和异抗坏血酸盐优选不包括在表达“有机多元醇”中。因为抗坏血酸和异抗坏血酸是质子源,特别是用于亚硝酸盐反应,所以他们不包括在该表达中。为了避免怀疑,我们确认,为质子源的还原剂(例如抗坏血酸和/或异抗坏血酸)不排除在本发明的质子源或质子源组分、组合、试剂盒、组合物、用途、方法或本发明的任何其他部分及其作为质子源存在的实施方式之外。

[0203] 有机多元醇可以是环状或无环的,或者可以是一种或多种环状有机多元醇与一种或多种无环有机多元醇的混合物。例如,一种或多种有机多元醇可以选自被两个或更多个OH基团取代的一种或多种烷烃、被两个或更多个OH基团取代的一种或多种环烷烃、被两个或更多个OH基团取代的一种或多种环烷基烷烃、以及他们的任意组合。最优选有机多元醇不带有除OH以外的任何取代基。

[0204] 优选地,一种或多种有机多元醇是一种或多种无环有机多元醇。优选的一种或多种无环有机多元醇选自具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的糖醇(sugar alcohol)。优选的一种或多种无环有机多元醇选自单糖醇(alditol),例如具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的单糖醇。优选地,一种或多种有机多元醇不包括皂苷、皂苷配基、甾体或甾体糖苷。

[0205] 可替代地,一种或多种有机多元醇可以是一种或多种环状有机多元醇。在这些实施方案中,一种或多种环状有机多元醇可以是环状糖醇或环状单糖醇。例如,一种或多种环状多元醇可以是具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的环状糖醇,或具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的环状单糖醇。环状多元醇的具体实例是肌醇。

[0206] 在一些实施方案中,一种或多种有机多元醇具有7个或更多个羟基。在特定的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有7个或更多个羟基的糖醇或单糖醇。在更具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇具有9个或更多个羟基。在另一个实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有9个或更多个羟基的糖醇或单糖醇。在一些实施方案中,一种或多种有机多元醇具有20个或更少的羟基。在特定的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有20个或更少羟基的糖醇或单糖醇。在更特定的实施方案中,一种或多种有机多元醇具有15个或更少的羟基。在另一个实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有15个或更少羟基的糖醇或单糖醇。一种或多种有机多元醇的羟基数量可以在7至20范围内,更特别地在9至15的范围内。在某些实施方案中,一种或多种有机多元醇包括9、12、15或18个羟基。

[0207] 优选地,一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,该糖醇化合物包括一个或多个单糖单元以及一个或多个无环糖醇单元,例如由其组成。一种或多种有机多元醇可以是糖醇化合物,该糖醇化合物包括一个或多个单糖单元和一个或多个无环糖醇单元的直链,或者一个或多个单糖单元和一个或多个无环糖醇单元的支链,例如由其组成。

[0208] 本文所用的单糖单元是指与化合物中的至少一个其他单元(不管是另一个单糖单元还是无环糖醇单元)共价连接的单糖。本文所用的无环糖醇单元是指与化合物中的至少一个其他单元(无论是单糖单元还是另一个无环糖醇单元)共价连接的无环糖醇。化合物中的单元可以通过醚键连接。在一些实施方案中,一个或多个单糖单元通过糖苷键与化合物的其他单元共价连接。在特定的实施方案中,每个单糖单元通过糖苷键与化合物的其他单元共价连接。在某些实施方案中,糖醇化合物是具有单糖或寡糖糖基和无环糖醇苷元的糖苷。

[0209] 优选的无环糖醇单元是具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的糖醇单元。在特定的实施方案中,无环糖醇单元选自赤藓糖醇、苏糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇和庚七醇的单元。

[0210] 在特定的实施方案中,一个或多个单糖单元是 C_5 或 C_6 单糖单元。换言之,一个或多个单糖单元是戊糖或己糖单元。在更特定的实施方案中,每个单糖单元是 C_5 或 C_6 单糖单元。在特定的实施方案中,一个或多个糖醇单元是 C_5 或 C_6 糖醇单元。在更特定的实施方案中,每个糖醇单元是 C_5 或 C_6 糖醇单元。

[0211] 在某些实施方案中,糖醇化合物包括(例如由其组成) n 个单糖单元和 m 个无环糖醇单元,其中 n 是整数并且至少为1, m 是整数并且至少为1,并且 $(n+m)$ 不大于10。在某些实施方案中,糖醇化合物包括(例如由其组成) n 个单糖单元的链,以一个无环糖醇单元封端,其中 n 是1和9之间的整数。在这些实施方案中,单糖单元的链可以通过糖苷键共价连接。在特定的实施方案中,每个单糖单元通过糖苷键与另一单糖单元或无环糖醇单元共价连接。在某些实施方案中,糖醇化合物包括(例如由其组成)以一个无环糖醇单元封端的1、2或3个单糖单元的链。1、2、3或每个单糖单元可以是 C_5 或 C_6 单糖单元。无环糖醇单元可以是 C_5 或 C_6 糖醇单元。糖醇化合物的实例包括但不限于:异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇($n=1$);麦芽三糖醇($n=2$);以及麦芽四糖醇($n=3$)。

[0212] 此类糖醇化合物可以描述为来源于二糖或寡糖的糖醇。本文所用的寡糖是指由3至10个单糖单元组成的糖。来源于二糖或寡糖的糖醇可以由二糖、寡糖或多糖合成(例如通过水解和氢化),但不限于由二糖、寡糖或多糖合成的化合物。例如,来源于二糖的糖醇可以由单糖和糖醇的脱水反应形成。一种或多种有机多元醇可以是来源于二糖、三糖或四糖的糖醇。来源于二糖的糖醇的实例包括但不限于异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。来源于三糖的糖醇的实例包括但不限于麦芽三糖醇。来源于四糖的糖醇的实例包括但不限于麦芽四糖醇。

[0213] 作为合适的有机多元醇,可以选自以下的任意一种:赤藓糖醇、苏糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚葡萄糖醇(polyglycitol)及其任意组合。可以使用丙三醇,并且当存在时,优选与一种或多种其他有机多元醇结合,例如赤藓糖醇、苏糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚葡萄糖醇或其任意组合。

[0214] 许多有机多元醇含有一个或多个手性中心,因此以立体异构形式存在。有机多元醇的所有立体异构体形式、光学异构体和异构体混合物都包括在本发明和专利的范围内。

特别地,可以使用D和/或L形式的所有手性有机多元醇及其所有混合物。

[0215] 有趣的是,已经发现在本发明中使用多元醇的效果是立体化学依赖性的。因此,用于本发明的一种或多种有机多元醇的光学异构体形式或光学异构体混合物的选择可以影响亚硝酸盐和质子源之间的反应的结果,至少就NO的生成量而言是这样的。

[0216] 例如,山梨糖醇是甘露醇的立体异构体,在一个羟基的取向上彼此不同。如下面实施例2D和实施例2E所示(图5和图6),山梨糖醇和甘露醇对亚硝酸盐和质子源之间反应产生的影响在其他方面相同的反应体系中存在差异。

[0217] 在特定的实施方案中,有机多元醇选自阿拉伯糖醇、木糖醇、甘露醇、山梨糖醇及其任意组合。所述阿拉伯糖醇可以是D或L阿拉伯糖醇或其混合物。木糖醇可以是D或L木糖醇或其混合物。山梨糖醇可以是D或L山梨糖醇或其混合物。甘露醇可以是D或L甘露醇或其混合物。

[0218] 在具体的实施方案中,当用于本文所述的系统、方法、组合、试剂盒和组合物用于治疗结核病感染或用于减少结核病细菌数量的抗微生物方法时,一种或多种多元醇是糖醇化合物,该糖醇化合物包括(例如由其组成)本文所述的一个或多个单糖单元以及一个或多个无环糖醇单元(包括来源于二糖或寡糖的糖醇)。

[0219] 在一个实施方案中,有机多元醇组分可以干燥形式、任选地以诸如粉末的颗粒形式提供用于本发明中。如果需要,有机多元醇可以被包封或微包封,例如为了控制或延迟多元醇参与一种或多种亚硝酸盐和质子源之间的反应。当有机多元醇在室温下通常为液体或凝胶状态时,可以特别使用包封形式。干燥形式和/或包封可有助于有机多元醇组分的储存,无论是单独的还是与根据本发明的生成一氧化氮的反应的其他组分混合。更进一步地,干燥形式和/或包封可以有助于将有机多元醇组分单独地或与根据本发明的生成一氧化氮的反应的其他组分混合地掺入到诸如医疗装置之类的小物体中。此类物体包括例如创伤敷料、绷带、血管和其他支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、矫形螺钉和销钉、以及其他薄的医疗和/或可植入制品。请参见下面标题为“任选的组分的包封(例如微包封)”的部分以了解更多详情。

[0220] 可替代地,有机多元醇组分可以包括载体介质,例如水性载体液体或凝胶载体。如果有机多元醇在室温下通常为液体,他可以直接使用而不需要任何附加的载体组分,或者可以与一种或多种载体添加剂(例如水)混合使用。

[0221] 如果需要,任选包封或微包封的一种或多种有机多元醇可作为干粉或晶体存在于多元醇组分中,或者与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)联合,例如作为水性凝胶或其溶液存在。含有有机多元醇的多元醇组分为干燥或粉末形式,在使用前可以通过加入水来方便地配制成溶液。在与亚硝酸盐反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度可以是任何浓度,直到溶液中的多元醇或每种多元醇的饱和极限。例如,一种或多种多元醇的总摩尔浓度可以在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在与亚硝酸盐反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度为约0.01M至约2M。在一些实施方案中,在与亚硝酸盐的反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度为约0.1M至约2M。在更特定的实施方案中,在与亚硝酸盐反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度为约0.2M至约1.6M。在实施方案中,在与亚硝酸盐反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度可以在0.8M至1.2M的范围内。例如,在与

亚硝酸盐反应开始之前,此类溶液中的一种或多种多元醇的总摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0222] 应当注意,如本领域技术人员所熟知的那样,组合NO_x生成反应混合物的两种或更多种前体溶液的动作将导致稀释每种溶质的浓度或每种溶液中溶质的组合。例如,将等体积的溶质A和B的两种1M溶液混合的动作使A的浓度变为0.5M,B的浓度变为0.5M。除非另有说明或暗示,本文所述的亚硝酸盐的浓度是其在加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前(例如,紧接之前)的初始溶液中的浓度,所述其他组分作为液体(例如溶液)加入。可以容易地导出NO_x生成反应混合物中的实际浓度,知道反应混合物的组分以及他是如何制备的。

[0223] 可以在使用前通过加入水,方便地将干燥或粉末形式的多元醇组分制成溶液。

[0224] 如果需要,多元醇(无论是以干燥形式还是以载液形式)可以与一种或多种亚硝酸盐或质子源或一些此类质子源以混合物或溶液的形式存在。

[0225] 在特定的实施方案中,其中亚硝酸盐在使用前与生成一氧化氮的反应的其他组分保持分离,亚硝酸盐组分可以包括一种或多种多元醇。在这些实施方案中,有机羧酸组分可以实质上不含多元醇。在可替代的实施方案中,有机羧酸组分包括一种或多种多元醇。在这些实施方案中,亚硝酸盐组分可以实质上不含多元醇。在另外的实施方案中,有机羧酸组分和亚硝酸盐组分可以各自包括一种或多种多元醇,两种组分之间的一种或多种多元醇可以相同或不同。

[0226] 在另一个实施方案中,有机羧酸组分和亚硝酸盐组分可以实质上不含多元醇,并且一种或多种多元醇可以包括在分离的多元醇组分中。

[0227] 反应混合物中亚硝酸盐质子源和任何多元醇的相对浓度

[0228] 在NO_x生成反应开始时(或之前),多元醇组分中或反应溶液中的任何一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度可以适当地为亚硝酸根离子总摩尔浓度的约0.05至约3倍,例如为亚硝酸根组分或反应溶液中亚硝酸根离子的总摩尔浓度的约0.1至约2倍,例如约0.25至约1.5倍,例如约0.3至约1.2倍。在根据本发明的组合物或试剂盒的组分中,或在根据本发明的组合物中,在NO_x生成反应开始之前(例如,紧接之前),适当地使一种或多种有机多元醇与亚硝酸根离子之间的相对摩尔浓度相同。

[0229] 在NO_x生成反应开始时(或之前),多元醇组分中或反应溶液中的任何一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度可以适当地为质子源总摩尔浓度的约0.05至约3倍,例如质子源组分或反应溶液中质子源总摩尔浓度的约0.1至约2倍。在根据本发明的组合物或试剂盒的组分中,或在根据本发明的组合物中,在NO_x生成反应开始之前(例如,紧接之前),适当地提供一种或多种有机多元醇与质子源之间相同的相对摩尔浓度。

[0230] 任选的附加组分

[0231] 用于本发明的这些组合、试剂盒或组合物可以掺入一定范围的稀释剂、载体和赋形剂中和/或与一种或多种附加组分联合提供,特别是功能组分,所述功能组分旨在为其所用的组合、试剂盒或组合物提供一种或多种特定的益处。在体内使用所需时,此类稀释剂、载体、赋形剂和/或附加组分通常是生理相容的。

[0232] 合适的生理相容性稀释剂、载体和/或赋形剂的实例包括但不限于乳糖、淀粉、磷酸二钙、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、纤维素衍生物、交联羧甲基纤维素钠、葡萄糖、明

胶、蔗糖、碳酸镁、氯化镁、硫酸镁、氯化钙等。

[0233] 通常而言,取决于预期的施用方式,药物制剂将含有按重量计约0.005%至约95%、优选约0.5%至约50%的本发明的组合或组合物或其组分。制备此类剂型的实际方法是已知的,或者对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0234] 赋形剂可选自己知的赋形剂,这取决于预期的使用或施用途径,由此将反应物和/或反应产物输送到目标位点,以输送一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体。例如,可以通过将亚硝酸盐掺入赋形剂(诸如乳膏、乳液和软膏基质或其他增稠剂和增粘剂(例如Eudragit L100、卡波姆、羧甲基纤维素或羟甲基纤维素))中,来配制乳膏、乳液和软膏。质子源可以掺入赋形剂中或在水性基质中,该赋形剂选自羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、甲基纤维素。如果需要形成薄膜,可以使用形成薄膜的赋形剂,例如丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮)、明胶、瓜尔胶和虫胶。

[0235] 任选的附加组分可以例如选自甜味剂、掩味剂、增稠剂、增粘剂、润湿剂、润滑剂、粘合剂、成膜剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、香料、盐、包衣剂、抗氧化剂、药学活性剂和防腐剂。此类组分在本领域中是众所周知的,并且对于熟练的读者来说,不需要对他们进行详细的讨论。诸如润湿剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂和增溶剂等助剂的实例包括例如磷酸钠、磷酸钾、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、失水山梨糖醇单月桂酸酯、乙酸三乙醇胺、油酸三乙醇胺等。甜味剂或掩味剂可以包括例如糖、糖精、天冬甜素、三氯蔗糖、纽甜或其他化合物,该其他化合物可有益地影响味道、后味、感觉到的令人不快的咸味、酸味或苦味,降低口服或吸入制剂刺激接受者的趋势(例如,通过引起咳嗽或咽喉肿痛或其他不希望的副作用,诸如可能降低输送剂量或不利地影响患者对规定治疗方案的依从性)。某些掩味剂可以与一种或多种亚硝酸盐形成络合物。以上给出了增稠剂、增粘剂和成膜剂的实例。

[0236] 可以通过对相关疾病或医学病症的治疗方案的适用性,以及根据本发明的组合或组合物的所需施用途径,来确定选择药学活性剂和其他附加组分,例如用作稀释剂、载体和赋形剂的那些。可以参考标准参考文献,诸如《马丁代尔药物大典(Martindale)》第39版(2017)、《默克索引(Merck Index)》第15版(2013)、《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》第13版(2017)、英国国家处方集(British National Formulary)在线(<https://bnf.nice.org.uk/>)、《雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science&Practice of Pharmacy)》第22版(2012)或《医师药用指南(Physician's Desk Reference)》第71版(2017)。

[0237] 根据本发明的组分和组合物可用于治疗目的的动物(包括人)受试者的施用途径的实例包括局部(例如乳膏、洗剂、凝胶、软膏、糊剂、润肤剂、喷雾剂)、耳用、鼻用(例如鼻用喷雾剂)、阴道、直肠(例如栓剂)、口服(例如雾剂、喷雾剂、漱口剂、气溶胶)、肠溶(例如片剂、锭剂(pastille)、锭剂(lozenge)、胶囊剂、口服糖浆、酏剂)和胃肠外(例如可注射液体)、眼、耳、鼻或咽喉(例如滴剂),或经由呼吸道或肺(例如喷雾、气溶胶、粉末吸入)。

[0238] 可以掺入到根据本发明的组分和组合物中或与组分和组合物共同施用的药学活性剂的实例包括抗生素、甾族化合物、麻醉剂(例如局部麻醉剂,诸如利多卡因)、丁卡因、西洛卡因、布比卡因、普利洛卡因、罗匹法卡因、苯佐卡因、美匹法卡因、可可碱或其任意组合)、镇痛剂、消炎药(例如非甾体消炎药(NSAID))、抗感染药、疫苗、免疫抑制剂、抗惊厥药、

抗痴呆药、前列腺素、解热药、抗真菌药、抗银屑病药、抗病毒药、血管舒张剂或血管收缩剂、防晒制剂(PABA)、抗组胺药、激素(诸如雌激素、孕酮或雄激素)、抗脂流变剂、心血管治疗剂(诸如 α 或 β 阻断剂)或培健(Rogaine)、维生素、皮肤软化剂、酶、肥大细胞稳定剂、杀疥疮药、杀菌剂、角质溶解剂、润滑剂、麻醉药、洗发剂、抗痤疮制剂、烧伤治疗制剂、清洁剂、除臭剂、脱色剂、尿布疹治疗用品、润肤剂、增湿剂、光敏剂、毒常春藤或毒橡木或漆树制品、晒伤治疗制剂、蛋白质、肽、蛋白聚糖、核苷酸、寡核苷酸(诸如DNA、RNA等)、矿物质、生长因子、含焦油制剂、含蜂蜜制剂(例如含有Manuka蜂蜜的制剂)、疣治疗制剂、湿敷料、创伤护理产品或其任意组合。

[0239] 特定的实例包括镇痛剂,诸如布洛芬、吲哚美辛、双氯芬酸、乙酰水杨酸、对乙酰氨基酚、普萘洛尔、美托洛尔和羟考酮;甲状腺释放激素;性激素,诸如雌激素、孕酮和睾酮;胰岛素;维拉帕米;血管升压素;氢化可的松;东莨菪碱;硝化甘油;二硝酸异山梨酯;抗组胺药,诸如特非那定;可乐宁;尼古丁;非甾体免疫抑制剂药物,诸如环孢菌素、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、环磷酰胺、TNF- α 拮抗剂和抗-IL5、-IL4Ra、-IL6、-IL13、-IL17、-IL23细胞因子单克隆抗体;抗惊厥药;以及治疗阿尔茨海默氏病、痴呆和/或帕金森氏病的药物,诸如阿朴吗啡和利斯的明。如果需要,任何任选的附加组分可以被包封或微包封,例如为了控制或延迟其释放的目的。请参见下面标题为“任选的组分的包封(例如微包封)”的部分以了解更多详情。

[0240] 任选的组分的包封(例如微包封)

[0241] 用于本发明的组合、试剂盒和组合物的至少一些组分可以被包封,例如微包封。

[0242] 使用微包封组分对NO生成是有用的,因为其使得由化学稳定形式的前体延长生产相对不稳定的化合物(例如NO)。多种微包封的反应物和/或一种或多种任选的附加组分可以容易地在干燥环境中储存、混合以及彼此接触,并且可以简单地通过向前体混合物提供少量的水来引发NO的产生。可替代地,此类微包封反应物和/或一种或多种任选的附加组分的混合物可以直接施用于受试者,例如皮肤、粘膜表面或根据本发明进入受试者的鼻、口、呼吸道和/或肺,其中生理环境本身提供足够的水以引起治疗量NO的释放。另一个优点是微包封的反应物和/或一种或多种任选的附加组分所占的体积相对较小,因此他们可以容易地结合到诸如医疗装置之类的小物体中。此类物体包括例如创伤敷料、绷带、血管和其他支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、矫形螺钉和销钉、以及其他薄的医疗和/或可植入制品。

[0243] 用于包封或微包封反应物和/或一种或多种任选的附加组分的生产方法的一个实例是对反应物和/或一种或多种任选的附加组分的熔体或聚合物溶液进行喷雾干燥,以产生包括分散在聚合物基质中的材料的单独颗粒的细分粉末。也可以使用其他包封或微包封方法,诸如锅包衣、空气悬浮包衣、离心挤出、纤维纺丝、纤维挤出、喷嘴振动、电离凝胶化、凝聚相分离、界面交联、原位聚合和基质聚合。包封聚合物优选是生物相容的。此类聚合物包括乙基纤维素、天然聚合物(诸如玉米醇溶蛋白(在包括玉米的某些禾本科物种中发现的醇溶谷蛋白种子储存蛋白)、壳聚糖、透明质酸和藻酸,或可生物降解的聚酯、聚酐、聚(邻位酯)、聚磷腈或多糖(参见Park等,Molecules 10(2005),第141-161页)。已知将如上所述的一种化学物质微包封于其中的组合物用于输送药物和其他试剂。参见:Shalaby和Jamiolkowski,美国专利号4130639;Buchholz和Meduski,美国专利号6491748。然而,实际

上在所有此类组合物中,治疗剂被微包封,并且该治疗剂并非通过微包封试剂的反应而产生。然而,对现有技术教导的适当修改将在本领域普通技术人员的技术范围之内。已经描述了用于不涉及NO加成物/供体的医疗制品的一氧化氮释放聚合物。例如,参见:Arnold,美国专利号7829553(连接至疏水聚合物的碳基二醇二氮烯鎓盐(diazeniumdiolate));Knapp,美国专利号7135189(亚硝基硫醇前体和一氧化氮供体)。

[0244] pH控制;任选的缓冲液体系

[0245] 组合物可以具有受控的pH值。特别地,组合物的pH值可以在3.0至8.0的范围内,或者更特别地在4.0至8.0的范围内。在更特定的实施方案中,组合物的pH值在4.0至7.4的范围内。在更特定的实施方案中,组合物的pH可在4.0至6.0的范围内。在这些实施方案中,组合物的pH值可在4.5至6.0的范围内。

[0246] 可以以任何已知的方式控制组合物的pH。在特定的实施方案中,在与亚硝酸盐组分结合之前,控制有机羧酸组分或有机还原性酸组分的pH。在一些实施方案中,有机羧酸组分或有机还原性酸组分包括缓冲液。缓冲液可以是药理学上可接受的缓冲液,诸如磷酸盐缓冲液。

[0247] 在一些实施方案中,通过混合有机羧酸或有机非羧酸还原性酸及其盐对应物而形成缓冲液。例如,有机羧酸组分可以包括有机羧酸和该有机羧酸的盐。有机非羧酸还原性酸组分可以包括有机非羧酸还原性酸和有机非羧酸还原性酸的盐。在特定的实施方案中,有机羧酸组分包括柠檬酸和柠檬酸盐。在其他实施方案中,有机羧酸组分或有机还原性酸组分包括抗坏血酸和抗坏血酸盐。在一些实施方案中,有机羧酸组分包括有机羧酸和另一种有机酸的盐。例如,有机羧酸组分可以包括柠檬酸和抗坏血酸盐。在又一个实施方案中,有机羧酸组分可以包括有机羧酸、有机羧酸的盐和另一种有机羧酸的盐。例如,有机羧酸组分可以包括柠檬酸、柠檬酸盐和抗坏血酸盐。

[0248] 在其他实施方案中,通过调节有机羧酸或有机非羧酸还原性酸的pH以使酸(质子化形式)与其盐对应物共存而形成缓冲液。通过向有机羧酸或有机非羧酸还原性酸中加入强无机碱和任选地强无机酸,其加入量使得原位产生缓冲液体系,从而适当地实现。合适的强无机碱的实例包括氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、氢氧化铷和氢氧化铯。合适的强无机酸的实例包括盐酸、硫酸、氢溴酸和硝酸。

[0249] 缓冲液可以包括一种或多种生理缓冲液,特别是当根据本发明的组合或组合物接触细胞或动物(包括人)皮肤、粘膜或其他组织时,诸如在根据本发明对鼻、口、呼吸道或肺进行施用的情况下。合适的生理相容性缓冲液的实例包括Good's缓冲液,该缓冲液的pH范围为约5至约9,例如2-氨基-2-甲基-3-丙二醇、N-2-氨基乙磺酸(ACES)、N-(2-乙酰氨基)-亚氨基二乙酸(ADA)、N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸(AMPSO)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、2-双(2-羟乙基)氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(BIS-TRIS)、1,3-双[三(羟甲基)甲氨基]-丙烷(BIS-TRIS丙烷)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙磺酸(DIPSO)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS)、二甘氨酸、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁烷磺酸)(HEPBS)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙烷磺酸(MOPS)、3-吗啉代-2-羟基丙磺酸(MOPSO)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)、哌嗪-1,4-双(2-羟基-3-丙磺酸)脱水(POPSO)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、[三(羟甲基)甲氨基]

丙磺酸 (TAPS)、2-羟基-3-[三(羟甲基)甲氨基]-1-丙磺酸 (TAPSO)、2-[(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)氨基]乙磺酸 (TES)、N-[三(羟甲基)-甲基]甘氨酸 (Tricine) 或 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇 (TRIZMA)。

[0250] 组合物的渗透压摩尔浓度

[0251] 应当控制要被输送到生理系统的亚硝酸盐、质子源、有机多元醇或其任意组合的任何溶液的溶质浓度,特别是通过导致与皮肤、粘膜或根据本发明的人或动物受试者的鼻、口、呼吸道或肺接触的途径,以避免受试者的器官和组织出现任何不希望的脱水。

[0252] 渗透压摩尔浓度 (Osm) 定义为溶解在一千克溶剂中的溶质摩尔数,可表示为每千克渗透压摩尔数 (Osmol/kg)。根据本发明的向人或动物受试者施用的任何溶液的渗透压摩尔浓度通常应在约100至约5000mOsmol/kg的范围内,例如约100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000至约2000、2250、2500、2750、3000、3250、3500、3750、4000、4250、4500、4750或5000mOsmol/kg。

[0253] 混合组分以引发NO_x生成

[0254] 我们已经发现,为了引发NO_x生成而混合NO_x生成系统的组分的顺序可以对使用由此生成的NO_x的结果产生影响。下面的实施例6中提供了这种影响的证据。

[0255] 在该实施例中,我们证明了根据本发明的组合物杀灭THP-1细胞中的细菌结核分枝杆菌HN878的效力不同,一方面,根据亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分首先以所需比例混合,其浓度高于组合物中所用形式的所需浓度,然后用水适当稀释该浓缩物,以得到要使用的组合物,或者另一方面,亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分首先以组合物所需浓度的所需比例以要使用的形式混合。

[0256] 此外,无法预测的是,混合这些组分的哪种方式将在抗菌效果方面产生更好的结果。虽然通常似乎稀释相对浓缩的预混物以得到要使用的组合物可以对THP-1细胞中的结核HN878产生更好的抗微生物作用,在某些情况下,其产生的结果不像其中组分首先以所需浓度混合以供使用的方法那样好。

[0257] 因此,在本发明的一个实施方案中,一种制备NO_x生成组合物的方法包括以所需比例混合亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分,其浓度高于组合物中所用形式的所需浓度,形成浓缩物预混物,随后用水适当稀释该浓缩物预混物,以提供要使用的组合物。

[0258] 因此,在本发明的另一个实施方案中,一种制备NO_x生成组合物的方法包括以组合物所用形式所需的浓度以所需比例混合亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分,以提供要使用的组合物。

[0259] 优选实施方案

[0260] 本发明的第一至第八方面的优选实施方案是其中存在以下中的一个或多个的那些:

[0261] -一种或多种亚硝酸盐包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如:亚硝酸钠;亚硝酸钾;或其任意组合;

[0262] -质子源包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液;柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液;或其两种或更多种的任意组合;

[0263] -所述抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,或其两种或更多种的任意组合的分子不与聚合物或大分子共价结合;

[0264] -一种或多种有机多元醇包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)每分子具有4至12个碳原子和4至12个OH基团的直链糖醇或单糖醇;例如山梨糖醇;甘露醇;阿拉伯糖醇;木糖醇;或其两种或更多种的任意组合;

[0265] -一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,所述糖醇化合物包括(例如由其组成)以一个无环醇单元封端的1、2或3个单糖单元的链,任选地其中1、2、3个或每个单糖单元是C₅或C₆单糖单元,和/或无环醇单元是C₅或C₆糖醇单元;例如异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇;

[0266] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是亚硝酸根组分或反应溶液中亚硝酸根离子的总摩尔浓度的0.05至3倍;

[0267] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是质子源组分或反应溶液中质子源的总摩尔浓度的0.05至3倍;

[0268] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)皮肤(包括粘膜)、器官或其他组织之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在3.0至9.0的范围内;

[0269] -对于涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)皮肤(包括粘膜)、器官或其他组织之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在4.0至8.0的范围内;

[0270] -对于涉及反应混合物与根据本发明的动物(包括人)受试者的鼻、口、呼吸道或肺之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在5.0至8.0的范围内;

[0271] -靶向的微生物选自以下标题为“用于抗微生物用途的目标”部分中所列的微生物,例如但不限于流感病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),包括其抗生素抗性菌株。

[0272] 本发明第九方面的优选实施方案是其中存在以下中的一个或多个的那些:

[0273] -一种或多种亚硝酸盐包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如:亚硝酸钠;亚硝酸钾;或其任意组合;

[0274] -质子源包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液;柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液;或其两种或更多种的任意组合;

[0275] -所述抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,或其两种或更多种的任意组合的分子不与聚合物或大分子共价结合;

[0276] -一种或多种有机多元醇包括(例如包括,或基本上由其组成,或仅由其组成)每分子具有4至12个碳原子和4至12个OH基团的直链糖醇或单糖醇;例如山梨糖醇;甘露醇;阿拉伯糖醇;木糖醇;或其两种或更多种的任意组合;

[0277] -一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,所述糖醇化合物包括(例如由其组成)以一个无环醇单元封端的1、2或3个单糖单元的链,任选地其中1、2、3个或每个单糖单元是C₅或C₆单糖单元,和/或无环醇单元是C₅或C₆糖醇单元;例如异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇;

[0278] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是亚硝酸根组分或反应溶液中亚硝酸根离子的总摩尔浓度的0.05至3倍;

[0279] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度是质子源组分或反应溶液中质子源的总摩尔浓度的0.05至3倍;

[0280] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)皮肤(包括粘膜)、器官或其他组织之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在3.0至9.0的范围内;

[0281] -对于涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)皮肤(包括粘膜)、器官或其他组织之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在4.0至8.0的范围内;

[0282] -对于涉及反应混合物与根据本发明的动物(包括人)受试者的鼻、口、呼吸道或肺之间接触的应用,在NO生成反应开始之前,特别是紧接在NO生成反应开始之前,质子源的pH在5.0至8.0的范围内;

[0283] -靶向的微生物选自以下标题为“用于抗微生物用途的目标”部分中所列的微生物,例如但不限于流感病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、铜绿假单胞菌,包括其抗生素抗性菌株。

[0284] 组合和组合物

[0285] 可以以多种方式引发NO_x生成反应。他们的一般特征在于使一种或多种亚硝酸盐与质子源在NO_x生成反应能够开始的条件下接触。

[0286] 可以通过将组合的单独组分混合而引发该反应。所述组合可在体外实现,然后可根据本发明将所得组合物施用于受试者或施用于根据本发明的任何待治疗表面。可替代地,根据本发明,释放的气体可施用于受试者或施用于任何待治疗的表面。此外,所得组合物的两种用途可以按时间间隔进行,以便在一些气体释放之后,将该组合物施用于受试者或施用于任何待治疗表面。

[0287] 混合可以是分步的,例如,最初混合干粉形式的组分,然后与水或另一种液体载体介质混合,以引发反应。可替代地,组分的干粉形式可以最初单独与水或另一种液体载体介质混合,随后两种或更多种液体混合,以引发反应。

[0288] 可替代地,根据本发明的NO_x生成反应的至少一些组分可以以混合物形式存在于单一组合物中,并且在该组合物上引发NO_x生成反应。例如,引发NO_x生成反应的一种可能的方法可以是如下:如果组合物的组分是干的或胶囊形式,则加入引发反应的关键组分或添加剂,例如水;或者如果组合物的组分缺少质子源,则使用质子源。

[0289] 在防止NO_x生成反应发生的情况下,根据本发明的试剂盒通常包括根据本发明的组合或根据本发明的组合物中的一种或多种组分。试剂盒的各部分通常保持在容器中,该容器可以是分离的或适合于促进引发NO_x生成反应所需的混合。需要由试剂盒的使用者将用于引发NO_x生成反应的关键引发组分引入到其他必要组分中,该关键引发组分例如可以是亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分中的一种,或者可以是附加组分,通常是可由使用者提供的普通可用组分,诸如水。

[0290] 本专利中所定义和描述的组合和组合物的参数通常包括物理参数,诸如pH、浓度

和渗透压摩尔浓度。在任何可能的情况下,都要在NO_x生成反应开始之前测定这些参数。除非另有说明,pH参数是指在用于引发NO_x生成反应的浓度下,去离子水中质子源的pH。除非另有说明,溶液的浓度是指在与其它组分混合以引发NO_x生成反应之前的浓度。通常,当亚硝酸盐与有机羧酸或有机还原性酸混合反应生成一氧化氮气体时,在NO_x生成反应进行中不可能容易地测定这些参数。

[0291] 此外,应当注意,当在反应混合物中时,组分的浓度不一定对应于他们混合前在组合的各部分中的浓度。例如,假设由大约等体积的亚硝酸盐组分和质子源组分作为预制溶液一起加入而形成根据本发明的用于引发NO_x生成反应的组合物。在该实施方案中,混合反应组合物的亚硝酸盐浓度为亚硝酸盐组分浓度的一半并且质子源浓度为质子源组分浓度的一半。

[0292] 根据在NO_x生成反应期间或之后系统的预期用途,组合和组合物的部分可以是任何合适的物理形式。例如,组合和组合物的各部分可以是液体、凝胶或薄膜的形式,使得NO_x生成反应混合物类似地是液体、凝胶或薄膜的形式。液体可适于被雾化以便吸入呼吸道或肺。如果将生成NO_x的混合物施用于口或咽喉,则组合和组合物的部分可以是漱口剂或饮料的形式。可替代地,如果NO_x生成反应混合物要局部施用于皮肤,组合和组合物的部分可以是软膏、洗剂或乳膏的形式。

[0293] 多组分体系、试剂盒和分配器

[0294] 本文所述的多组分体系可包括亚硝酸盐组分和质子源组分,任选地具有多元醇组分,如根据本发明所定义的以及如本文所述的。多组分体系中的组分适于彼此接触,并且通过用于在使用前保持组分的合适的容器或贮存器和用于混合组分、分配反应混合物和/或释放的气体、以及大体上控制所述混合和分配的装置,来分配反应混合物和/或释放的气体。在一个优选的实施方案中,可以以气流中夹带的液滴的雾或气溶胶的形式来分配反应混合物。

[0295] 本发明的试剂盒和分配器通常包括至少一些用于在使用前保持组分的容器,至少一个用于混合组分、分配反应混合物和/或释放的气体、以及大体上控制所述混合和分配的装置或其他装置,以及在使用前在试剂盒或分配器的容器中含有的一种或多种组分(如果有的话)。可以适当地存在使用说明书,或者可以找到使用说明书的指引,例如在线使用说明书。此类试剂盒和分配器构成了本发明的另一方面。

[0296] 本发明的试剂盒可以是用于混合组分、分配反应混合物和/或释放的气体、以及大体上控制所述混合和分配的容器和装置的相对简单的集合。此类试剂盒可以适当地提供用于研究目的,或者其中可以预期和容忍在混合和分配操作中的大范围变化。

[0297] 本发明的其他试剂盒可以是一个或多个容器的更复杂的集合,所述容器包括耗材(是使用者引发NO_x生成反应所需的组合和/或组合物,任选地与由使用者提供的水或其他通常可用的成分一起)以及本发明的一个或多个分配器。

[0298] 本发明的分配器通常适用于对反应混合物、包括反应混合物的载体和/或释放的气体进行分配的重复类似动作。分配器可包括泵或推进剂系统,以将包括生成NO_x的反应混合物或释放的气体的组合物从分配器中携带出来,并将其引导至目标。推进剂系统可以使用加压和/或液化气体,该加压和/或液化气体适用于医学用途,将是药学上可接受的或生物相容的,例如加压空气或加压/液化丁烷。可替代地,可以使用来自使用者肺的抽吸来将

包括生成NO_x的反应混合物或释放的气体的组合物从分配器中携带出来,并将其引导至目标。用于本发明的分配器可以适当地包括启动器装置,诸如手动操作的触发器或按钮,由此使用者可以启动分配器。此类分配器可适于专业人员、研究人员、消费者或患者使用,并相应地适于促进治疗目标的预期路线。

[0299] 原则上已知大量试剂盒和分配器设备,其可用于或容易地适用于在使用前保持组分、混合组分或促进所述混合、分配包括反应混合物和/或释放的气体的组合物、以及大体上控制所述混合和分配或促进所述控制。

[0300] 例如:

[0301] -注射器,例如双筒分配注射器。

[0302] -容器系统,例如泵作用容器、挤压作用容器或振动作用容器,例如包括两个容器,以至少混合亚硝酸盐组分和质子源组分,并分配包括NO_x生成反应或释放的气体的组合物。US 2019/0134080中描述了此类系统,其公开内容在此引入作为参考。

[0303] -用于在使用前将组分保持在水溶液中、混合组分、雾化液体反应混合物并将其分配以吸入入肺中、以及用于大体上控制所述混合和分配的装置。实例包括软雾吸入剂、喷射式雾化器、超声波雾化器和振动网式雾化器。WO 03/032928和WO 2009/086470中描述了选择合适的雾化器、液滴大小、助剂、包装形式等用于通过亚硝酸盐的酸化吸入雾化的NO_x生成反应介质,其公开内容在此引入作为参考。

[0304] -上述装置可被布置成在预混合液体反应混合物被装入雾化器中之后将其雾化并分配以吸入人的肺中,并且大体上控制所述混合和分配。

[0305] -用于在使用前将组分保持在水溶液中、混合组分、雾化液体反应混合物并将其分配以吸入入肺中的装置、以及用于大体上控制所述混合和分配的装置。实例包括计量式剂量吸入剂。WO 03/032928和WO 2009/086470中描述了选择合适的液滴大小、助剂、包装形式等用于通过亚硝酸盐的酸化吸入雾化的NO_x生成反应介质,其公开内容在此引入作为参考。

[0306] -美国专利9730956中描述了用于将释放一氧化氮的溶液喷入上呼吸道的技术和设备,其公开内容在此引入作为参考。

[0307] -用于在使用前以干粉形式保持组分并将其分配以吸入入肺中的装置。实例包括干粉吸入剂(DPI),其可以配制成单剂量胶囊或多剂量干粉吸入剂,或者配制成贮存器粉末或多剂量独立气泡。WO2009/086470中描述了选择合适的粉末粒度、助剂、包装形式等,用于吸入干粉组合用于在肺内提供反应介质以通过亚硝酸盐的酸化原位产生NO,其公开内容在此引入作为参考。

[0308] -美国专利申请号2013/0200109、美国专利号7066356和美国专利申请号2019/0134080中描述了用于在以溶液形式使用之前保持组分的分配器,向他们充气并将其作为泡沫分配以用于皮肤消毒剂用途或治疗皮肤病,其公开内容在此引入作为参考;

[0309] -WO 2014/188175中描述了一种用于保持组分并将其分配到受试者皮肤上的经皮贴剂组件,其公开内容在此引入作为参考。

[0310] 根据待治疗的疾病、病症或症状(在医疗情况下)或所需的效果(在非医疗情况下)、所需治疗的严重程度、以及待治疗的受试者的状况、年龄和健康情况,或者在非医疗的情况下待治疗的受试者的性质,本发明的组合和组合物或释放气体的剂量可以在大范围内变化。在医疗情况下,最终医师将确定要使用的适当剂量。在非医疗情况下,本领域技术人

员能够通过合理的试验对相关文献进行审查来研究合适的剂量和治疗方法。

[0311] 在一些实施方案中,可在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后600秒内,将发生NO_x生成反应的组合物或由其释放的气体施用于目标位置,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。以这种方式,目标位置可以暴露于大量突发的一氧化氮中。

[0312] 在一些实施方案中,发生NO_x生成反应的组合物可以在目标位置处或其附近原位形成,例如在微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者上、内部或其附近,包括无生命表面和空间。在这些实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后0秒,施用起效。在其他实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后大于0秒且小于600秒的范围内,将组合物施用于目标位置或其附近。在更具体的实施方案中,在0至120秒的范围内施用组合物。在又一个实施方案中,在0至60秒的范围内施用组合物。

[0313] 在其他实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后超过600秒,例如超过2000秒,例如超过4000秒,例如超过8000秒,发生NO_x生成反应的组合物或由其释放的气体可施用于目标部位或其附近,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。在这种情况下,目标位点(例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者)可以不必暴露于大量突发的一氧化氮,但是仍然可以经历有益的性质,诸如抗微生物作用。在这些实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后至多48小时,施用发生NO_x生成反应的组合物或由其释放的气体。在特定的实施方案中,可在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后至多数周或数月,例如至多约6个月,或至多约2个月,或至多约1个月、至多约3周,或至多约2周,或至多约1周,或至多约3天,或至多24小时,施用该组合物或由其释放的气体。

[0314] 如果适当储存的话,可以在亚硝酸盐组分与质子源组分组合后超过48小时,施用发生NO_x生成反应的组合物或由其释放的气体。例如,该组合物可以储存在密封容器中,例如在真空下。通常在将亚硝酸盐与有机羧酸或有机还原性酸组合后不超过24小时,将其储存在密封容器中。可在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后不超过600秒,将组合物储存在密封容器中。以这种方式,可以保持一定比例的一氧化氮气体。如果在低温下储存NO_x生成组合物,例如温度在约-30°C至约+10°C的范围内,例如在约1°C至约10°C的范围内,气体的释放速率可显著减慢,使得组合物的储存时间非常长。

[0315] 在一个特定的实施方案中,气溶胶分配器可以包括多个贮存器,其中第一贮存器含有液体形式的亚硝酸盐组分(例如水溶液),第二贮存器含有液体形式的质子源组分(例如水溶液)。在该实施方案中,在所述亚硝酸盐和质子源组分组合之前、期间或之后,可以适当地将各组分与推进剂混合。

[0316] 在另一个特定的实施方案中,分配器可以是含有本发明的组合物的单筒注射器。组合物的粘度可以选择为能够通过手动操作或通过注射器的动力操作从注射器中分配。例如,组合物可以是液体或凝胶。

[0317] 在另一个特定实施方案中,分配器可以是具有第一筒和第二筒的多筒注射器,其中第一筒含有亚硝酸盐组分,第二筒含有质子源组分。组分的粘度可以选择为能够通过手动操作或通过注射器的动力操作从注射器中分配。例如,每种组分可以独立地是液体或凝胶。

[0318] 用于组分的其他贮存器:水凝胶

[0319] 在本发明的一些实施方案中,可以使用分子贮存器,例如水凝胶。水凝胶是高度水

合的,通常是交联的三维聚合物(均聚物或共聚物)或大分子网络,其能够吸收和保持许多倍于其干重的水、其他水性液体或其他非水性亲水性液体。液体的吸入通常伴随着水凝胶的膨胀。通过适当选择与聚合物或大分子共价结合的组分化学基团,可以制备具有其他特殊化学性质的酸性水凝胶或水凝胶。

[0320] 已知在本发明中可用作质子源组分的水凝胶。此类含有酸性-COOH基团的水凝胶的实例描述于例如WO 2007/007115、WO 2008/087411、WO 2008/087408、WO 2014/188174和WO 2014/188175以及其中提到的文献中,所有这些文献的公开内容在此引入作为参考。WO 2014/188174和WO 2014/188175中特别描述了此类水凝胶在使用NO_x生成进行皮肤护理的用途,包括与NO_x生成结合的药物经皮输送。此类水凝胶的具体实例包括丙烯酸、甲基丙烯酸、2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(ATBS,可从Vinati Organics公司获得)及其盐的均聚物和共聚物。由包括(甲基)丙烯酸或由丙烯酸组成的单体形成的聚合物将包括用作根据本发明的质子源的侧挂羧酸基团。

[0321] 因此,例如,多组分体系可以包括第一酸性水凝胶垫或层组分,该层组分包括质子源组分,任选地还含有有机多元醇,并且其他组分可以是亚硝酸盐组分。例如,亚硝酸盐组分可以是含有溶解的亚硝酸盐的液体介质。以这种方式,水凝胶垫或层的表面可与亚硝酸盐组分接触以引发NO_x生成反应。可替代地,亚硝酸盐组分可以是固体载体,例如垫或层,其以这样的形式含有亚硝酸盐,从而在固体载体和水凝胶之间接触时可溶解在水凝胶的吸入液体中。

[0322] 通常,对于氮氧化物的扩散,固体载体垫或层是可渗透的(完全可渗透的或至少半可渗透的)。以这种方式,当组合固体载体垫或层与水凝胶以使亚硝酸盐组分和质子源组分组合时,一氧化氮可以扩散到治疗区域。例如,固体载体垫或层可以是网、非织造片、薄膜、泡沫、藻酸盐层或膜。

[0323] 在特定的实施方案中,固体载体层是网。网可以是多个连接的实心股线,通常是柔性的,他们形成孔或间隙的网格,某些物质通过这些孔或间隙。网可以是织造的或非织造的。在一些实施方案中,网是非织造的。

[0324] 固体载体层(例如网)可以由聚合物材料制成。合适的聚合物材料的实例包括但不限于粘胶、聚酰胺、聚酯、聚丙烯或其共混物。可以处理聚合物材料以例如增加其亲水性。在特定的实施方案中,固体载体层是聚丙烯网。

[0325] 在特定的实施方案中,固体载体是吸收性的,亚硝酸盐组分至少部分地被吸收、吸入或浸渍在固体载体中。被吸收、吸入或浸渍的亚硝酸盐组分可以是固体(干燥的)或者可以是在固体载体内的水溶液中。

[0326] 在特定的实施方案中,固体载体包括超过一个的层,亚硝酸盐组分被吸收、吸入或浸渍在至少一个层中,或涂覆在至少一个外层上。例如,固体载体可以包括2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个层,诸如聚丙烯网层,他们吸收、吸入、浸渍或涂覆有一种或多种干燥和/或溶液形式的亚硝酸盐。

[0327] 酸性水凝胶由于具有大量内部质子化侧挂酸性基团而具有天然缓冲能力,由此H⁺离子可以经由被吸入的水性介质迁移,以在NO_x生成反应期间,当表面的侧挂酸性部分变得去质子化时,在水凝胶结构的表面保持相对酸性的pH。

[0328] 非酸性(例如中性或碱性)水凝胶也是已知的,其中可以吸入并含有亚硝酸盐组分

和/或多元醇组分以在本发明中使用。通过将质子源提供在与水凝胶接触的液体介质中,和/或通过将质子源吸收、吸入、浸渍或涂覆在固体载体上,质子源组分可以与此类水凝胶接触。在此类水凝胶中,可以是亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分中没有一种共价结合到水凝胶的聚合物或大分子网络上;例如,本发明所需的所有组分——考虑到亚硝酸盐组分和质子源组分必须在NO_x生成反应开始之前不一起反应——可被吸入水凝胶中并包含在水凝胶物质内的水介质中,但不共价结合到水凝胶的聚合物或大分子上。

[0329] 水凝胶垫或层的厚度可以在0.5至2mm的范围内。在一些实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1至2mm的范围内。在特定的实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1.0至1.6mm的范围内。

[0330] 上述关于质子源组分的特征通常同样适用于用作质子源组分的任何酸性水凝胶。因此,例如,水凝胶可含有缓冲液以将水凝胶的pH保持在4.0至9.0,或5.0至8.0的范围内。

[0331] 在一些实施方案中,水凝胶可以包括阻挡层。阻挡层通常是聚合物薄膜,例如聚氨酯薄膜,并且位于水凝胶的外表面上。在使用中,阻挡层通常位于水凝胶的与例如受试者皮肤相对的表面上,以便在组合的多组分体系和大气之间提供阻挡。与水凝胶相邻的阻隔膜的表面通常具有比相邻水凝胶表面更大的表面积。以这种方式,阻挡层可以延伸超过水凝胶的外围。在这些实施方案中,阻挡层可以在其外围边缘周围具有粘合剂,以在使用中将水凝胶粘合到例如受试者的皮肤上。

[0332] 在一个特定的实施方案中,本发明提供了一种双组分体系,其包括:

[0333] a) 一种或多种网,其吸入、浸渍或涂覆有一种或多种亚硝酸盐,诸如NaNO₂;以及

[0334] b) 包括质子源的水凝胶,所述质子源包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原性酸的酸,

[0335] 其中组分(a)与组分(b)分离,并且其中组分(a)和组分(b)中的一种或多种还包括一种或多种有机多元醇;

[0336] 以下面的一个或多个为特征:

[0337] (a) 一种或多种有机多元醇以提高反应产出的量存在;

[0338] (b) 质子源不只是水凝胶,该水凝胶包括共价结合到三维聚合物基质上的侧挂羧酸基团;

[0339] (c) 一种或多种有机多元醇不只是丙三醇;

[0340] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,一种或多种有机多元醇不只是丙三醇;

[0341] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,一种或多种有机多元醇不只是丙三醇;

[0342] (f) 一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇;

[0343] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,一种或多种有机多元醇不只是聚乙烯醇;

[0344] (h) 上述(b)至(g)中的任何一个或多个,其中词语“不只是”替换为“不包括”;

[0345] (i) 一种或多种有机多元醇不只是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合,或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合;

[0346] (j) 一种或多种有机多元醇不包括丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(甘油硬脂酸酯)、三乙醇胺、D-泛醇、泛醇、泛醇与肌醇的组合、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁烷-1,2,3-三醇、丁烷-1,2,4-三醇、己烷-1,2,6-三醇、亚己基二醇、辛酰基二醇、除此外所列二醇之外的二醇、对苯二酚、丁基化对苯二酚、1-硫代丙三醇、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、其任意组合,或以上任一种与丙三醇和/或聚乙烯醇的任意组合。

[0347] 为了避免怀疑,由此证实,上述关于本发明各方面的表征特征(a)至(h)的实施方案和优选实施方案同样适用于该实施方案。

[0348] 例如,通过组合组分(a)和(b)来引发NO_x生成反应,可以使用此类系统。然后此类组合可用于人或动物体的治疗或其他治疗,例如局部施用。这些用途可以如W0 2014/188174和W0 2014/188175中所述,或者可以如下所述。该系统还可用于如下所述的非医疗用途。当用于局部医学应用时,其中系统接触受试者的皮肤(包括粘膜),一个或多个网可以是皮肤接触层(多个)。

[0349] 在治疗或外科手术中的用途

[0350] 根据本发明进行NO_x生成反应的组合物以及由其释放的气体在治疗和外科手术中应用广泛,包括治疗和/或预防治疗、用于治疗疾病和病症的外科手术、美容外科手术、重建外科手术,包括人和兽医以及外科手术。身体缺陷或异常引起或加重焦虑、抑郁或另一种精神疾病或紊乱,其对用该组合物或由其释放的气体进行的治疗有反应,身体状况的治疗、预防或缓解可以相应地治疗、预防或缓解精神状况,由此本发明的用途也扩展到心理健康领域。

[0351] 文献中已经报道了一氧化氮和生成一氧化氮的组合物的多种生理作用以及基于此的医疗,因此已经开发了多种治疗方法。提供下面的非穷举列表作为说明。本发明和专利中涵盖所列出的用途以及未列出的其他用途。

[0352] 一氧化氮扩张血管以提高血液供应和/或降低血压(参见van Faassen等, Med.Res.Rev.2009年9月;29(5),第683-741页);

[0353] Houston等在J.Clin.Hypertens.(格林威治),2014年7月,16(7),第524-529页中描述了口服一氧化氮增补剂在高血压患者中降低血压、改善血管顺应性和恢复上皮功能的急性作用。

[0354] 一氧化氮保护组织免受由低血供引起的损伤(参见van Faassen等, Med.Res.Rev.2009年9月;29(5),第683-741页);

[0355] 一氧化氮作为神经递质在氮能神经元中的作用,例如对平滑肌有活性的氮能神经元,例如在胃肠道和勃起组织中的作用(参见Toda等, Pharmacol.Ther.,2005年5月;106(2),第233-266页);

[0356] 一氧化氮抑制血管平滑肌收缩和生长、血小板聚集和白细胞粘附到内皮,辅助血管内环境稳定(参见Dessey和Ferron,当前医学化学——医药化学中的消炎和抗过敏剂(Current Medical Chemistry-Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry),2004;3(3),第207-216页);

[0357] 一氧化氮降低心脏收缩力和心率的作用(参见Navin等, J.Cardiovascular Pharmacology,2002;39(2),第298-309页);

[0358] 促进毛细血管和肺脏扩张的危重新生儿护理,例如治疗新生儿患者原发性肺动脉高压,以及胎粪吸入(参见Barrington等,科克伦系统综述数据库(The Cochrane Database of Systemic Reviews),2017;1,CD000399(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375630>);以及Chotigeat等,J.Med.Assoc.Thai.,2007;90(2),第266-271页;以及Hayward等,Cardiovascular Research,1999;43(3),第628-638页);

[0359] 在糖尿病患者中预防血管损伤、内皮功能障碍和血管炎症、神经病变和非愈合性溃疡,并减少由此引起的需要下肢截肢的危险(参见NFB大学研究——“一氧化氮有望用于糖尿病”,<http://www.nfb.org/Images/nfb/Publications/vod/vod212/vodspr0613.htm>);

[0360] 改善急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征和严重肺动脉高压中的低氧血症;治疗低氧血症呼吸窘迫的可逆病因(参见Mark等,N.Eng.J.Med.,2005年12月22日;353(25),第2683-2695页);

[0361] 施用一氧化氮作为肺栓塞继发性急性右心室衰竭患者的抢救疗法(参见Summerfield等,2011;Respir.Care 57(3),第444-448页);

[0362] 治疗心绞痛、百草枯中毒的影响和其他心血管疾病(参见Abrams,The American Journal of Cardiology,1996;77(13),第31C-37C页);

[0363] 治疗膀胱收缩功能障碍(参见Moro等,Eur.J.Pharmacol.,2012年1月;674(2-3),第445-449页;以及Andersson等,Br.J.Pharmacol.2008年2月;153(7),第1438-1444页);

[0364] 治疗急性和慢性肺部感染和脓毒症(参见Fang等,Nature Reviews.Microbiology,2004年10月;2(10),第820-832页;以及参见Goldfarb等,Critical Care Medicine,2007年1月;35(1),第290-292页);

[0365] 包括一氧化氮的毒性反应性氮中间体(RNI)已被认为是抗剧毒结核分枝杆菌的活化鼠巨噬细胞的抗分枝杆菌作用中的效应分子(参见Chan等,J.Exp.Med.,1992年4月;175,第1111-1122页);

[0366] 气态一氧化氮可有效治疗囊性纤维化患者的耐抗生素细菌和真菌肺部感染(参见Deppisch等,2016年2月9日;“气态一氧化氮用于治疗囊性纤维化患者的耐抗生素细菌和真菌肺部感染:I期临床研究(Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis:a Phase I clinical study)”;[Springer,DOI 10.1007/s15010-016-0879-x](https://doi.org/10.1007/s15010-016-0879-x));

[0367] 据报道,一氧化氮是皮肤病的潜在局部广谱抗微生物剂,不易产生抗性(参见B L Adler和A J Friedman,Future Sci.OA,2015;1(1),FS037);

[0368] 一氧化氮是一种神经递质,并且与男性和女性的神经元活性以及从回避学习到生殖器勃起的各种功能有关(参见Kim等,J.Nutrition,2004,134,第28735页);

[0369] 一氧化氮用于治疗男性阳痿和勃起功能障碍描述于Sullivan等,Cardiovascular Research,1999年8月,43(3),第658-665页;

[0370] 一氧化氮作为外科辅助剂用于辅助创伤愈合、减少缺血-再灌注损伤、辅助从外科手术中恢复心脏和肺并辅助从血管外科手术中恢复、以及辅助从矫形外科手术中恢复的潜在用途(参见A Krausz和A J Friedman,Future Sci.OA,2015;1(1),FS056);

[0371] 一氧化氮的抗微生物和创伤愈合作用描述于WO 95/22335和Hardwicket等,2001,

Clin, Sci. 100, 第395-400页;

[0372] 欧洲专利号1411908 (阿伯丁大学) 报道了数据, 这些数据表明一氧化氮可有效治疗甲下感染, 包括黑曲霉 (*Aspergillus niger*);

[0373] 将生成NO_x的组合物局部施用于皮肤, 以治疗真菌性皮肤感染, 诸如足癣 (香港脚) (参见Weller等, J. Am. Acad. Dermatol., 1998年4月, 38(4), 第559-563页);

[0374] 将生成NO_x的组合物局部施用于皮肤, 以治疗病毒皮肤感染 (参见WO 99/44622);

[0375] 将生成NO_x的组合物局部施用于皮肤, 以治疗其中可能存在血管收缩问题的病症, 诸如雷诺综合征 (也称作雷诺氏现象) (参见Tucker等, Lancet, 1999年11月3日, 354, 9191, 第1670-1675页);

[0376] WO 2000/053193中描述了酸化亚硝酸盐作为在皮肤表面产生局部一氧化氮的试剂的用途, 用于治疗外周局部缺血和相关病症 (诸如雷诺氏现象) 和创伤 (诸如术后创伤和烧伤);

[0377] 美国专利号9,730,956 (Stenzler等) 要求保护使用液体一氧化氮释放溶液 (NORS) 来治疗人的创伤。NORS还被认为具有抗菌、抗真菌和/或抗病毒的性质, 并且提供的数据被认为证明对鲍曼醋杆菌 (*Acetobacter baumannii*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimia haemolytica*) 具有抗菌功效。提供的数据表明NORS对H1N1流感病毒、传染性牛鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒和牛副流感病毒-3型病毒的抗病毒效力。提供的数据表明NORS对红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*) 和须癣毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 的抗真菌功效;

[0378] Chous S-H等, 去条带对左心室压力过载大鼠中ET-1、eNOS和cGMP肺表达的影响 (The effects of debanding on the lung expression of ET-1, eNOS, and cGMP in rats with left ventricular pressure overload). Exp. Biol. Med. 2005, 231, 第954-959页;

[0379] Gladwin MT等, 亚硝酸盐作为血管内分泌一氧化氮储库有助于低氧信号传导、细胞保护和血管舒张 (Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation). Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006, 291, 第H2026-H2035页;

[0380] Hunter CJ等, 吸入的雾化亚硝酸盐是缺氧敏感的NO依赖性选择性肺血管舒张剂 (Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator). Nat. Med. 2004, 10, 第1122-1127页;

[0381] Ozaki M等, 通过来自内皮的一氧化氮减少低氧肺血管重构 (Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium). Hypertension. 2001, 37, 第322-327页;

[0382] Rubin LJ, 2006. 肺动脉高压 (Pulmonary arterial hypertension). Proc. Am. Thorac. Soc. 3, 第111-115页;

[0383] Yellon D.M.等, 2007. 心肌再灌注损伤 (Myocardial Reperfusion Injury), N. Engl. J. Med., 357, 第1121-1135页;

[0384] Duranski M.R.等, 亚硝酸盐在心脏和肝脏的体内局部缺血再灌注期间的细胞保

护作用(Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver).J.Clin.Invest.2005,115,第1232-1240页;

[0385] Jung K-H.等,早期静脉输注亚硝酸钠保护大脑免受体内缺血再灌注损伤(Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury),Stroke,2006,37,第2744-2750页;

[0386] Esme H.等,在再灌注诱导的肺损伤的再灌注期间给予补充一氧化氮供体的有益效果(Beneficial Effects of Supplemental Nitric Oxide Donor Given during Reperfusion Period in Reperfusion-Induced Lung Injury).Thorac.Cardiovasc.Surg.2006,54,第477-483页;

[0387] 中国专利申请号CN 101028229中描述了酸化亚硝酸盐用于释放NO作为改善人皮肤质量的试剂的用途;

[0388] 中国专利申请号CN 101062050中描述了酸化亚硝酸盐用于释放NO作为促进毛发生长以及预防或治疗人脱发的试剂的用途。

[0389] 一氧化氮的生理作用的其他一般论述可参见例如Lancaster等,Proc Natl Acad Sci,1996,91,第8137-8141页;Ignarro等,Proc Natl Acad Sci,1987,84,第9265-9269页;描述于Brent,J Cell Science,2003,116,第9-15页;描述于Murad,N Engl J Med,2006,355,第2003-2011页。

[0390] 已经发表用于输送NO的药理学形式描述于Butler和Feelisch,Circulation,2008,117,第2151-2159页中。

[0391] 以上引用的每份参考文献的公开内容在此引入作为参考。

[0392] 本发明可应用于一氧化氮和一氧化氮生成系统的所有治疗和外科用途,包括但不限于以上参考文献中公开的特定治疗和外科用途、以及所有其他公开的治疗和外科用途、以及基于一氧化氮的生理作用和一氧化氮生成反应的产物的基本知识的治疗和外科用途。

[0393] 血管舒张

[0394] 一氧化氮诱导血管舒张的性质表征了使用本发明的组合和组合物以及由其释放的气体的多种治疗用途。

[0395] 对血管舒张有反应的疾病、病症和症状的具体实例包括但不限于与局部缺血和皮肤损伤有关的症状。

[0396] 与组织局部缺血相关的症状包括雷诺综合征、严重原发性血管痉挛和组织局部缺血,例如由外科手术、脓毒性休克、辐射或外周血管疾病(例如糖尿病和其他慢性全身性疾病)引起的组织局部缺血。

[0397] 当用于治疗或预防由外科手术引起的与组织局部缺血相关的症状时,在手术之前、期间或之后,可以向受试者施用本发明的组合或组合物或使用本发明由NO_x生成反应释放的一氧化氮。组合、组合物或释放的气体可施用于外科手术部位或外科手术部位附近。其中可以使用这种治疗或预防组织局部缺血的外科手术的实例包括移植手术、组织或器官移植手术、冠状外科手术、颈动脉插管、提供留置动脉或静脉导管用于施用全身药剂如化疗药物的外科手术、美容外科手术方法(包括但不限于带蒂或旋转皮瓣)、重复外科手术(其中在与先前外科手术相同的位置进行切口)、在皮肤差和/或下面组织灌注差的区域或其中可能由于伴随的疾病而预计灌注差的区域(例如在动脉硬化或糖尿病患者中)进行外科手术、在

损伤或损害血管的创伤情况下进行外科手术、以及去除或矫正皮肤或皮下动静脉畸形的手术。

[0398] 例如,组合、组合物或释放的气体可用于通过将本发明的组合、组合物或释放的气体施用于器官来治疗或预防器官的缺血性再灌注损伤。器官可以是选自以下的一种或多种:心脏(例如预防或治疗心肌缺血)、脑(例如治疗或预防脑缺血和/或梗塞(中风))、肺(例如治疗或预防肺的缺血性再灌注损伤)、肾(例如治疗或预防肾的缺血性再灌注损伤)和肝(例如治疗或预防肝的缺血性再灌注损伤)。外科手术可以是器官移植。可以在局部缺血发作之后施用该组合、组合物或释放的气体,或可以是预防性的。

[0399] 经皮药物输送用途

[0400] 一氧化氮诱导经皮输送药物的性质代表了本发明的组合和组合物以及由其释放的气体的另一重要用途。

[0401] WO 02/17881和WO 2014/188175(其公开内容在此引入作为参考)描述了组合和组合物用于对所生成的一氧化氮和由其释放的气体进行经皮药物输送的用途,这些文献中描述的用于此类用途的相同条件、偏好和实例也适用于本发明的组合和组合物以及由其释放的气体。

[0402] 通常,本发明的组合和组合物将包括向受试者经皮输送的一种或多种药学活性剂,并且将以局部组合或组合物形式提供以施用于受试者的皮肤。对于可以使用的药学活性剂的实例,请参见以上标题为“任选的附加组分”的部分。

[0403] 合适的局部组合可以包括含亚硝酸盐的网和分离的含质子源的水凝胶,这两种物质适合一起用于受试者的皮肤上,如上文标题为“用于组合或组合物体系的其他贮存器:水凝胶”的部分中所述。多元醇和药学活性剂可以以组合物的一种或多种分离的组分提供,或掺入水凝胶中,或者这些选项的任意组合可以分别用于多元醇和药学活性剂。

[0404] 创伤、皮肤损伤和烧伤治疗

[0405] 一氧化氮诱导血管舒张和药物经皮输送以及杀死或防止微生物增殖的特性已带来本发明的组合和组合物以及由其释放的气体在治疗创伤、皮肤损伤和烧伤中的另一重要用途。可使用本发明治疗的病症包括溃疡、皮肤供体部位、外科创伤(术后)、烧伤(诸如烫伤、表面烧伤、部分厚度烧伤和全厚度烧伤)、撕裂和擦伤。创伤可以是慢性的或急性的。溃疡可以是各种来源的,诸如动脉或静脉来源的。溃疡的实例包括腿溃疡(例如慢性腿溃疡或急性腿溃疡)、压力溃疡(例如慢性压力溃疡或急性压力溃疡)、静脉溃疡以及与糖尿病相关的溃疡(例如糖尿病足溃疡)。

[0406] WO 2014/188174(其公开内容在此引入作为参考)描述了用于治疗创伤、皮肤损伤和烧伤的用于生成一氧化氮和由其释放的气体的组合和组合物的用途,并且该文献中描述的相同条件也适用于本发明的组合和组合物以及由其释放的气体。

[0407] 通常,本发明的组合和组合物将包括一种或多种药学活性剂,并且将以局部组合或组合物形式提供以施用于受试者的皮肤。对于可以使用的药学活性剂的实例,请参见以上标题为“任选的附加组分”的部分。为了治疗创伤、皮肤损伤和烧伤,一种或多种药学活性剂可以适当地选自镇痛剂和/或麻醉剂(例如局部麻醉剂)(例如用于减少慢性疼痛、急性疼痛或神经性疼痛的镇痛剂和/或麻醉剂)、抗微生物剂、消毒剂、消炎剂和抗瘢痕形成剂。

[0408] 合适的局部组合可以包括含亚硝酸盐的网和分离的含质子源的水凝胶,这两种物

质适合一起用于受试者的皮肤上,如上文标题为“用于组合或组合物体系的其他贮存器:水凝胶”的部分中所述。多元醇和药学活性剂可以以组合物的一种或多种分离的组分提供,或掺入水凝胶中,或者这些选项的任意组合可以分别用于多元醇和药学活性剂。

[0409] 局部抗微生物用途

[0410] 在抗微生物应用中,治疗有效NO剂量可以很小,例如低至几百万分之一(ppm),例如100至600ppm(例如,参见Ghaffari等,Nitric Oxide Biology and Chemistry,2009,14,第21-29页,其公开内容在此引入作为参考),但是一氧化氮的有效性基本上取决于保持皮肤接触多长时间(Ormerod等,BMC Research Notes,2011,4,第458-465页,其公开内容在此引入作为参考)。

[0411] 已经公布了缓慢局部释放一氧化氮的提议(例如,参见美国专利号6103275)。然而,所得的局部NO剂量持续少于1小时,这使得局部抗微生物作用较差。如以上在标题为“多组分体系、试剂盒和分配器”的部分及其他地方所讨论的,并且如下面的实施例所示,本发明使得在局部和非局部施用系统中具有更长的NO给药周期,带来显著的临床优点。

[0412] 特别地,已经发现,本发明的组合和组合物能够在NO_x生成反应开始(“初始突发”)后的最初大约200-500秒内提供大量一氧化氮,随后任选地在气体释放停止或降到有效水平以下之前,于多个小时内缓慢释放一氧化氮(“尾部”)。由本发明的组合和组合物产生的NO剂量超过公开的最小有效抗微生物剂量,使得本发明的组合和组合物及其释放的气体具有潜在有效的局部抗微生物用途。

[0413] 现有技术中很好地描述了用于局部抗微生物应用的生成NO_x的组合和组合物的制剂,例如美国专利申请号2014/0056957,其公开内容在此引入作为参考,并且此类制剂也适用于本发明的组合和组合物。另一种合适的局部组合可以包括含亚硝酸盐的网和分离的含质子源的水凝胶,两者适合一起施用于受试者的皮肤上,如上文标题为“用于组合或组合物体系的其他贮存器:水凝胶”的部分中所述。多元醇和药学活性剂可以以组合物的一种或多种分离的组分提供,或掺入水凝胶中,或者这些选项的任意组合可以分别用于多元醇和药学活性剂。

[0414] 其他皮肤或局部治疗

[0415] 一氧化氮和生成一氧化氮的组合物的其他局部应用包括刺激毛发生长以及治疗阳痿和勃起功能障碍。本发明的组合和组合物可以配制为局部应用于此类治疗。

[0416] 局部敷料和敷料系统,例如创伤敷料

[0417] 在局部治疗中,通常希望和应用治疗的同时覆盖或保护皮肤的治疗区域。这可以有助于防止创伤的污染,有助于从愈合过程中除去脓液或碎屑,防止或限制治疗组合物在沐浴或淋浴时或通过与衣物接触或由于受试者的正常活动而损失,并且缓冲治疗区域以防止磕碰或摩擦。

[0418] 为此,通常将该治疗并入局部敷料或敷料系统(例如创伤敷料或敷料系统)中。敷料或敷料系统的至少一个组成部分通常包括背衬片,该背衬片可以是不透水的或透水的,并且可任选地设置有皮肤粘附部分和任选地其他层,诸如纱布或垫层。

[0419] 另一方面,本发明提供了一种局部敷料,例如创伤或皮肤敷料,或包括根据本发明第五方面的组合或组合物的敷料系统,该敷料或敷料系统的至少一个组分包括背衬片和任选地一个或多个其他层,例如选自纱布层和衬垫层的层。根据本发明第五方面的组合或组

合物适当地设置在背衬片的皮肤定向侧上,并且布置成使得当敷料施用于皮肤并引发NO_x生成反应时,用NO_x生成反应混合物或由此生成的气体对所需皮肤区域进行治疗。

[0420] 在使用前,该敷料或敷料系统可以适当地设置在密封的无菌包装中。

[0421] 鼻、口、呼吸道和肺用途

[0422] 一氧化氮诱导血管舒张和经皮输送药物以及杀死或防止微生物增殖的性质已带来本发明的组合和组合物及其释放的气体的另一重要用途,即治疗鼻、口、呼吸道和肺的粘膜和组织,和/或鼻、口、呼吸道和肺用作将本发明的组合和组合物输送到人或动物受试者的施用途。可使用本发明治疗的病症包括肺部疾病,诸如病毒感染(例如流感、SARS-CoV或SARS-CoV-2)、肺动脉高压、心脏缺血性再灌注损伤、移植涉及的脑和器官、慢性阻塞性肺病(COPD)(特别是肺气肿、慢性支气管炎)、哮喘(包括重症哮喘、病毒和细菌引起的哮喘和顽固性(不可逆性)哮喘的恶化)、鼻内或肺部细菌感染(诸如肺炎、结核病、非结核分枝杆菌感染以及其他细菌和病毒肺部感染,例如呼吸道病毒感染后的继发性细菌感染)。

[0423] WO 2002/086470(其公开内容在此引入作为参考)描述了雾化液体组合和用于生成一氧化氮的组合物以及由其释放的气体用于治疗鼻、口、呼吸道和肺部疾病,和/或鼻、口、呼吸道和肺用作将此类组合和组合物输送到人或动物受试者的施用途,并且在该文献中描述的用于此类用途的相同条件、优选例和实例也适用于本发明的组合和组合物以及由其释放的气体。

[0424] 通常,本发明的用于向鼻、口、呼吸道和肺输送的组合和组合物将包括一种或多种药学活性剂。对于可以使用的药学活性剂的实例,请参见以上标题为“任选的附加组分”的部分。

[0425] 经由鼻、口、呼吸道或肺的输送路径,两种主要的输送方法可以实施本发明。第一种方法是将本发明的组合或组合物直接输送到鼻、口、呼吸道或肺。第二种方法是从使用本发明的NO_x生成反应中产生的气体输送到鼻、口、呼吸道或肺,而本发明的组合或组合物不进入患者体内。

[0426] 1.将组合或组合物直接输送到鼻、口、呼吸道或肺

[0427] 组合或组合物或其组分可以干燥固体形式直接输送到鼻、口、呼吸道或肺,由此粘膜的流体溶解固体组分材料并引发NO_x生成反应。

[0428] 组合物的组分可以分开施用或一起施用。在一个优选实施方案中,质子源或其至少一种组分可先于剩余组分施用,从而在粘膜中建立相对酸性的环境,当亚硝酸盐组分原位接触质子源组分时,该环境有助于快速引发NO_x生成反应。

[0429] 适当地通过使用干粉吸入剂的干粉吸入,可以将组合的任何干燥组分或干燥组合物直接输送到鼻、口、呼吸道或肺,将治疗有效剂量的一种或多种干粉组分(例如亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一种或多种)或干粉组合物输送到受试者,其中干粉吸入剂将含有体积平均直径小于6微米的颗粒的气溶胶输送到受试者。干粉吸入剂可适于装载干粉的单次或多次给药,使得干粉吸入剂每次吸入约0.1mg至约100mg的一种或多种干粉组分或干粉组合物,以小于6微米的体积平均直径的颗粒形式输送到受试者。

[0430] 附加地或可替代地,组合或组合物或其组分可以以亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一种或多种的溶液的液滴的雾或喷雾的形式直接输送到鼻、口、呼吸道或肺。

[0431] 本文所述的本发明的实施方案通常适用于直接输送到受试者的鼻、口、呼吸道或肺。不受限制,例如,该组合或组合物或其组分可与一种或多种生理相容性稀释剂、载体和/或赋形剂联合直接施用于患者的鼻、口、呼吸道或肺,和/或与一种或多种附加组分(特别是用于提供一种或多种特定益处的功能组分)联合施用。合适的生理相容性稀释剂、载体和/或赋形剂的实例包括但不限于乳糖、淀粉、磷酸二钙、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、纤维素衍生物、交联羧甲基纤维素钠、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁、氯化镁、硫酸镁、氯化钙等。如果需要,还可以存在少量无毒的助剂,诸如润湿剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂和增溶剂,例如磷酸钠、磷酸钾、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、失水山梨糖醇单月桂酸酯、乙酸三乙醇胺、油酸三乙醇胺等。通常而言,取决于预期的施用方式,药物制剂将含有按重量计约0.005%至约95%、优选约0.5%至约50%的本发明的组合或组合物或其组分。制备此类剂型的实际方法是已知的,或者对本领域技术人员来说是显而易见的。例如,参见《马丁代尔药物大典(Martindale)》第39版(2017)、《默克索引(Merck Index)》第15版(2013)、《古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》第13版(2017)、英国国家处方集(British National Formulary)在线(<https://bnf.nice.org.uk/>)、《雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science & Practice of Pharmacy)》第22版(2012)或《医师药用指南(Physician's Desk Reference)》第71版(2017)。

[0432] 在一个优选实施方案中,一种用于向受试者的鼻、口、呼吸道或肺输送的组合或组合物将采取单位剂型的形式,诸如含有液体的小瓶、待悬浮的固体、干粉、冻干物或其他组合物,组合或组合物可适当地含有:稀释剂,例如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等,连同NO_x生成反应的组分;润滑剂,诸如硬脂酸镁等;粘合剂,诸如淀粉、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素、纤维素衍生物等。

[0433] 将包括该组合的组分的任何液滴,或液滴形式的组合物直接输送到鼻、口、呼吸道或肺,可以通过使用雾化器吸入,将治疗有效剂量的一种或多种液体组分(例如亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一种或多种)或液体形式的组合物,其中雾化器将含有体积平均直径小于5微米的颗粒的气溶胶输送到受试者。雾化器可适于单次或多次加药,单次或多次加药装载有组合的液体组分或液体组合物,使得雾化器每次吸入约0.1mg至约100mg的一种或多种液体组分或液体形式的组合物,以小于5微米的体积平均直径的液滴形式输送到受试者,优选液滴大小在约2至约5微米的范围内。

[0434] 在一个实施方案中,基于允许形成包括组合的组分的液滴气溶胶,或液滴形式的组合物,来选择雾化器,该液滴的质量中值空气动力学直径(MMAD)主要在约2至约5微米之间。

[0435] 在一个实施方案中,包括组合的组分的液滴或液滴形式的组合物的输送量具有对肺部病理、呼吸道感染和/或肺外全身分布的治疗效果,以治疗肺外和全身疾病。

[0436] 之前,已显示喷射式和超声波两种类型的雾化器能够产生和输送尺寸在2和4微米之间的气溶胶颗粒。已显示这些颗粒尺寸对于中间气道沉积是最佳的,因此,治疗由革兰氏阴性菌引起的肺部细菌感染,诸如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠杆菌(*Enterobacter*)菌种、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、铜绿假

单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、产碱杆菌 (*Alcaligenes xylosoxidans*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和耐多药铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。然而,除非使用特殊配制的溶液,否则这些雾化器通常需要较大的体积来施用足够量的药物以获得治疗效果。喷射式雾化器利用气压使水溶液破裂成气溶胶液滴。超声波雾化器利用压电晶体对水溶液进行剪切。然而,通常,喷射雾化器在临床条件下的效率仅为约10%,而超声波雾化器的效率仅为约5%。因此,尽管在雾化器中放置了大量的药物,但是在肺中沉积和吸收的药物量是10%部分。较小的颗粒尺寸或缓慢的吸入速率使得出现深肺沉积。根据适应症,本发明可能需要中肺沉积和肺泡沉积,例如,用于抗微生物活性的中气道沉积,或用于肺动脉高压和全身输送的中肺泡沉积和/或肺泡沉积。使用雾化器的制剂输送的组合物和方法的示例性公开内容可参见例如US 2006/0276483,包括使用振动网状雾化器的雾化喷雾输送的技术、方案和特征的描述。US 2006/0276483的公开内容在此引入作为参考。

[0437] 因此,在一个实施方案中,在优选的实施方案中,使用振动网状雾化器来输送包括组合的组分的液滴或液滴形式的组合物的气溶胶。振动网状雾化器包括与膜片以及吸入和呼出阀流体接触的液体存储容器。在一个实施方案中,将约1至约5ml待输送的液体制剂放置在储存容器中,并且接合气溶胶发生器以选择性地产生粒径在约1至约5微米体积平均直径之间的雾化气溶胶。

[0438] 因此,例如,在优选的实施方案中,亚硝酸盐组分制剂或质子源组分(其中一种或两种任选地包括根据本发明的一种或多种有机多元醇)放置在液体雾化吸入剂中,并制备成从约1至约5ml的给药溶液中输送约7至约700mg的剂量,优选在约1至约5ml中为约17.5至约700mg,更优选在约1至约5ml中为约17.5至约350mg,优选在约1至约5ml中为约0.1至约300mg,更优选在约1至约5ml中为约0.25至约90mg,产生体积平均直径为约1至约5微米的颗粒。

[0439] 通过非限制性实例,可以在少于约20分钟内、以所述可呼吸输送剂量施用包括组合的组分的雾化液体或液滴形式的组合物,优选少于约10分钟,更优选少于约7分钟,更优选少于约5分钟,更优选少于约3分钟,并且在一些情况下最优选少于约2分钟。

[0440] 通过非限制性实例,在其他情况下,包括组合的组分的雾化液体或液滴形式的组合物可以实现耐受性提高和/或当较长时间施用时表现出曲线下面积(AUC)形状增强特性。在这些条件下,所述可呼吸输送剂量超过约2分钟,优选超过约3分钟,更优选超过约5分钟,更优选超过约7分钟,更优选超过约10分钟,在一些情况下最优选约10至约20分钟。

[0441] 分离组分制剂的一个实例可以包括(i)亚硝酸盐水溶液,pH大于约6,例如在约6至约8的范围内,例如约7;和(ii)质子源组分水溶液,至少两种分离的液体溶液组分(i)和(ii)能够混合以形成NO_x生成组合物,所述NO_x生成组合物可用于装载雾化器以输送给人类患者或动物受试者。

[0442] 对于含水和其他非加压液体体系,可以使用各种雾化器(包括小体积雾化器)来使组合的组分或组合物雾化。压缩机驱动的雾化器结合喷射技术并使用压缩空气来产生液体气溶胶。此类装置可商购自例如Healthdyne Technologies公司商购:Invacare公司;

Mountain Medical Equipment公司;Pari Respiratory公司(Midlothian,弗吉尼亚州);Mada Medical公司;Puritan-Bennet;Schuco公司,DeVilbiss Health Care公司;和Hospitak公司。超声波雾化器依赖于压电晶体振动形式的机械能来产生可呼吸的液滴,可商购自例如Omron Healthcare公司和DeVilbiss Health Care公司。振动网状雾化器依赖于压电或机械脉冲来产生可呼吸的液滴。本文所述的与亚硝酸根、亚硝酸盐或亚硝酸根供体化合物或一氧化氮供体化合物一起使用的雾化器的其他实例描述于美国专利号4,268,460;4,253,468;4,046,146;3,826,255;4,649,911;4,510,929;4,624,251;5,164,740;5,586,550;5,758,637;6,644,304;6,338,443;5,906,202;5,934,272;5,960,792;5,971,951;6,070,575;6,192,876;6,230,706;6,349,719;6,367,470;6,543,442;6,584,971;6,601,581;4,263,907;5,709,202;5,823,179;6,192,876;6,644,304;5,549,102;6,083,922;6,161,536;6,264,922;6,557,549;和6,612,303,其全部内容在此引入作为参考。

[0443] 可与本文所述的包括组合的组分的液滴或液滴形式的组合物一起使用的雾化器的商业实例包括Aerogen (Aerogen公司, Galway, 爱尔兰) 生产的Respirgard II®、Aeroneb®、Aeroneb®Pro、AeroEclipseXL®和Aeroneb®Go;Aradigm公司生产的AERx®和AERx Essence™;Respironics公司(Murrysville, 美国宾夕法尼亚州) 生产的Porta-Neb®、Freeway Freedom™、SideStream、SideStream Plus、Ventstream和I-neb;以及PARI公司(PARI Respiratory Equipment公司, Midlothian, 美国弗吉尼亚州;PARI公司, Starnberg, 德国) 生产的PARI LC-Plus®、PARI LC-Star®、PARI LC-Sprint®和e-Flow™。根据制造商的规格, 这些雾化器中的任何一个都可以与面罩或口罩一起使用。通过另一个非限制性实例, 美国专利号6,196,219的全部内容在此引入作为参考。

[0444] 在一个实施方案中, 提供了含有可溶性或纳米颗粒状药物颗粒的水性制剂。对于含水气溶胶制剂, 药物的浓度可以为约0.67mg/ml至约700mg/ml;在某些优选的实施方案中, 亚硝酸盐的浓度为约0.667mg亚硝酸盐阴离子/mL至约100mg亚硝酸盐阴离子/mL。此类制剂使得能够有效输送到肺的合适区域, 更浓缩的气溶胶制剂具有另外的优点, 即能够在非常短的时间内将大量的药物物质输送到肺。在一个实施方案中, 优化制剂以提供良好耐受的制剂。因此, 某些优选的实施方案包括亚硝酸盐(诸如亚硝酸钠、亚硝酸钾或亚硝酸镁), 并被配制为具有良好的味道, pH为约4.7至约6.5, 渗透压摩尔浓度为约100至约3600mOsmol/kg, 并且任选地在某些进一步的实施方案中, 渗透离子(例如氯化物、溴化物)浓度为约30至约300mM。

[0445] 在一个实施方案中, 用于制备气溶胶制剂的溶液或稀释剂的pH范围为约4.5至约9.0, 优选约4.7至约6.5(例如, 作为酸性混合物), 或作为单瓶构型为约7.0至约9.0。该pH范围提高了耐受性, 如本文其他地方所述的根据某些实施方案的掩味剂的加入也提高了耐受性。当气溶胶为酸性或碱性时, 他可引起支气管痉挛和咳嗽。尽管pH的安全范围是相对的, 并且一些患者可能耐受温和的酸性气溶胶, 但另一些患者将经历支气管痉挛。pH低于约4.5的任何气溶胶通常引起支气管痉挛。pH为约4.5至约5.5的气溶胶有时会引起支气管痉挛。任何pH大于约8的气溶胶可能具有低耐受性, 因为身体组织通常不能缓冲碱性气溶胶。pH控制在约4.5以下和约8.0以上的气溶胶通常导致肺部刺激, 伴随严重的支气管痉挛咳嗽和炎症反应。出于这些原因, 以及为了避免患者支气管痉挛、咳嗽或炎症, 确定气溶胶制剂的最

适pH为约pH 5.5至约pH 8.0。

[0446] 因此,在一个实施方案中,如本文所述使用的气溶胶制剂pH被调节至约4.5至约7.5,酸性混合物的最优选pH范围为约4.7至约6.5,并且对于单瓶构型最优选的pH范围为约7.0至约8.0。通过非限制性实例,根据本文公开的某些实施方案,组合物还可以包括pH缓冲液或pH调节剂,其通常是由有机酸或碱制备的盐,并且在优选的实施方案中,本文所述的酸性赋形剂(例如,诸如柠檬酸的非还原性酸或诸如柠檬酸钠的柠檬酸盐)或缓冲液(诸如柠檬酸盐或上述并参照表1的其他缓冲液)。因此,这些和其他代表性缓冲液可以包括柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的有机酸盐、Tris、氨丁三醇、盐酸盐或磷酸盐缓冲液。

[0447] 许多患者对各种化学味道,包括苦味、咸味、甜味、金属感觉的敏感性增加。为了产生良好耐受的药物产品,可以通过加入掩味剂和赋形剂、调节渗透压摩尔浓度和甜味剂来掩蔽味道。

[0448] 许多患者对各种化学试剂的敏感性增加,并且支气管痉挛、哮喘或其他咳嗽事件的发生率高。他们的气道对低渗或高渗和酸性或碱性条件以及任何永久离子(如氯化物)的存在特别敏感。这些情况或氯化物的存在超过一定浓度值的任何失衡都会导致支气管痉挛或炎性事件和/或咳嗽,这极大地损害了采用可吸入制剂的治疗。根据本文公开的某些实施方案,在无法有利地使用调节pH、渗透压摩尔浓度和掩味剂的情况下,这两种情况都可能阻止雾化药物有效输送到支气管内空间中。

[0449] 在一些实施方案中,通过提供赋形剂来调节本文公开的亚硝酸盐化合物(或在亚硝酸盐(或一氧化氮)供体化合物的不同实施方案中)的水溶液的渗透压摩尔浓度。在一些情况下,一定量的渗透离子)诸如氯化物、溴化物或另一种阴离子)可以促进成功并有效输送雾化的亚硝酸盐。然而,已经发现,对于本文公开的亚硝酸盐组分,此类渗透离子的量可以低于通常用于其他药物化合物的雾化施用的量。

[0450] 在所有情况下,都不能通过使用具有给定渗透压摩尔浓度的用于雾化的稀释剂来改善支气管痉挛或咳嗽反射。然而,当稀释剂的渗透压摩尔浓度处于一定范围内时,这些反射通常可以被充分地控制和/或抑制。安全和耐受的用于治疗化合物的气溶胶化的优选溶液的总渗透压摩尔浓度为约100至约3600mOsmol/kg,其氯化物浓度范围为约30mM至约300mM,优选约50mM至约150mM。该渗透压摩尔浓度控制支气管痉挛,并且氯离子浓度作为渗透阴离子控制咳嗽。因为他们都是渗透离子,所以溴化物或碘化物阴离子可以取代氯化物。此外,碳酸氢盐可以取代氯离子。

[0451] 纳米颗粒药物分散体也可冷冻干燥以获得适于鼻或肺输送的粉末。此类粉末可以含有具有表面改性剂的聚集的纳米颗粒药物颗粒。此类聚集体的尺寸可以在可呼吸的范围内,例如约2至约5微米MMAD。

[0452] 2. 向鼻、口、呼吸道或肺输送由NO生成反应产生的气体

[0453] 用于将计量量的一氧化氮输送到患者肺的吸入剂是众所周知的。通常而言,一氧化氮是在现场外产生的,并在与专用输送装置连接的加压瓶中输送到医院或诊所备用。可以提及INOmax治疗系统作为一个实例(BOC Healthcare,英国,<https://www.bochealthcare.co.uk/en/products-and-services/products-and-services-by-category/medical-gases/inomax/inomax.html>)。缩写INOmax(吸入一氧化氮)通常用于

INOmax治疗系统的瓶,而INOvent用于输送装置。已经发表了对INOmax治疗系统的评价,例如Kirmse, Chest, 1998年6月, 113(6), 第1650-1657页。本发明的公开内容在此引入作为参考。

[0454] 可以在专用NO制造设备中适当地执行根据本发明第一方面的方法,并且根据本发明第二方面的气体产品以正常方式在加压瓶中提供给使用者。然后以已知的方式将加压气瓶与分配、监测、给药、混合和输送设备结合使用。

[0455] 用于抗微生物用途的目标

[0456] 如前所述,本发明的NO_x生成反应以及由其释放的气体对潜在的广泛范围的微生物具有杀生物或生物抑制作用,带来多种抗微生物应用。

[0457] 例如,微生物可以是选自细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微寄生虫中的任意一种或多种,并且可以是单个细胞、生物体或群落。细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微寄生虫可以存在于宿主生物体上或体内,例如作为人或其他动物的肠道微生物组,或存在于人或其他动物的细菌感染中。细菌和/或真菌细胞和/或病毒颗粒和/或微寄生虫可以是体外、体内或离体的。

[0458] 本发明可特别用于治疗或预防受试者皮肤损伤部位的微生物感染。本发明可特别用于治疗预防免疫抑制受试者的微生物感染。

[0459] 当微生物存在于人或其他动物的细菌感染、真菌感染、病毒或微寄生虫感染中时,例如,所述感染可以是诸如普通感冒、流感、结核病、SARS、COVID-19、肺炎或麻疹等疾病。

[0460] 1. 细菌细胞

[0461] 细菌可以是致病菌种类。微生物感染可以由病原菌物种引起的感染,病原菌种类包括革兰氏阳性和革兰氏阴性、需氧和厌氧、抗生素敏感和抗生素抗性细菌。

[0462] 可使用本发明靶向的细菌种类的实例包括以下种类:放线菌(Actinomyces)、芽孢杆菌(Bacillus)、巴尔通氏体菌(Bartonella)、博尔德氏杆菌(Bordetella)、疏螺旋体(Borrelia)、布鲁氏菌(Brucella)、弯曲杆菌(Campylobacter)、衣原体(Chlamydia)、嗜衣原体(Chlamydophila)、梭菌(Clostridium)、棒状杆菌(Corynebacterium)、肠球菌(Enterococcus)、埃希氏菌(Escherichia)、弗朗西斯氏菌(Francisella)、嗜血杆菌(Haemophilus)、螺杆菌(Heliobacter)、军团菌(Legionella)、钩端螺旋体(Leptospira)、李斯特菌(Listeria)、分枝杆菌(Mycobacterium)、支原体(Mycoplasma)、奈瑟氏球菌(Neisseria)、假单胞菌(Pseudomonas)、立克次体(Rickettsia)、沙门氏菌(Salmonella)、志贺氏菌(Shigella)、葡萄球菌(Staphylococcus)、链球菌(Streptococcus)、螺旋体(Treponema)、脲原体(Ureaplasma)、弧菌(Vibrio)或耶尔森氏菌(Yersinia)属。本发明也可以靶向他们的任意组合。

[0463] 在特定的实施方案中,微生物可以是棒状杆菌、分枝杆菌、链球菌、葡萄球菌、假单胞菌或其任意组合的病原种类。

[0464] 在更特定的实施方案中,待靶向的微生物可以选自:衣氏放线菌(Actinomyces israelii)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)、百日咳杆菌(Bordetella pertussis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、伽氏疏螺旋体(Borrelia garinii);阿氏疏螺旋体(Borrelia afzelii);回归热疏螺旋体(Borrelia recurrentis);流产布鲁氏菌(Brucella abortus);犬布鲁氏菌(Brucella canis);羊布鲁

氏菌 (*Brucella melitensis*); 猪布鲁氏菌 (*Brucella suis*); 空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*); 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*); 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*); 鹦鹉热嗜性衣原体 (*Chlamydophila psittaci*); 肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*); 艰难梭菌 (*Clostridium difficile*); 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*); 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*); 白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*); 犬埃利希氏体 (*Ehrlichia canis*); 查菲埃立克体 (*Ehrlichia chaffeensis*); 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*); 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 诸如肠产毒性大肠杆菌 (ETEC)、肠致病性大肠杆菌、肠侵入性大肠杆菌 (EIEC) 和肠出血性大肠杆菌 (EHEC), 包括大肠杆菌 0157:H7; 土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*); 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*); 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*); 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*); 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*); 钩端螺旋体 (*Leptospira*) 种类; 单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*); 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*); 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*); 脓肿分枝杆菌 (*Mycobacterium abscessus*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*); 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*); 淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*); 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*); 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*); 星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*); 立克次氏体 (*Rickettsia rickettsia*); 伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*); 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*); 宋内志贺氏菌 (*Shigella sonnei*); 痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*); 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*); 腐烂葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*); 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*); 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*); 化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*); 绿色链球菌 (*Streptococcus viridans*); 梅毒螺旋体亚种梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum subspecies pallidum*); 霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*); 鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*); 及其任意组合。

[0465] 特别地, 所述微生物可以选自肺炎衣原体、炭疽芽孢杆菌、白喉棒杆菌、流感嗜血杆菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌或其任意组合。

[0466] 微生物可以是抗生素抗性或抗生素敏感性致病性细菌种类, 或细菌种类的抗生素抗性或抗生素敏感性菌株。例如, 一氧化氮用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 和对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 的用途描述于例如 WO 02/20026 中, 其公开内容在此引入作为参考。可使用本发明杀死或治疗的抗生素抗性或抗生素敏感性病原菌种类的实例是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 或对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA)。

[0467] 2. 真菌细胞

[0468] 微生物可以是致病真菌种类。微生物感染可以由致病真菌种类 (包括致病酵母) 引起的感染。

[0469] 可使用本发明靶向的真菌种类的实例包括曲霉属 (*Aspergillus*)、芽生菌属 (*Blastomyces*)、假丝酵母属 (*Candida*) (例如耳道假丝酵母 (*Candida auris*))、球孢子菌属 (*Coccidioides*)、隐球菌属 (*Cryptococcus*) (特别是新生隐球菌 (*Cryptococcus*

neofromans) 或格特隐球菌 (*Cryptococcus gattii*)、组织胞浆菌属 (*Histoplasma*)、*Murcomycetes*、肺孢子虫属 (*Pneumocystis*) (例如耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*))、孢子丝菌属 (*Sporothrix*)、篮状菌属 (*Talaromyces*) 或他们的任意组合。

[0470] 真菌感染的实例包括曲霉病 (诸如过敏性支气管肺曲霉病)、足癣 (香港脚)、由假丝酵母致病种引起的感染 (诸如阴道酵母感染)、真菌性脚趾甲感染和尿布疹、股癣 (癣) 和体癣 (癣)。

[0471] 3. 病毒颗粒

[0472] 微生物可以是病毒颗粒。感染可由致病病毒引起。

[0473] 可使用本发明靶向的病毒的实例包括流感病毒、副流感病毒、腺病毒、诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、星形病毒和肝病毒。特别地, 本发明的组合物可用于治疗或预防由选自以下的一种引起的感染: H1N1 流感病毒、传染性牛鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒、牛副流感-3 病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2 及其任意组合。

[0474] 特别地, 本发明可应用于治疗由病毒感染引起的疾病或病症。本发明可以靶向的此类疾病的实例包括呼吸道病毒性疾病、胃肠道病毒性疾病、发热性病毒性疾病、肝病毒性疾病、皮肤病毒性疾病、出血性病毒性疾病和神经性病毒性疾病。

[0475] 呼吸道病毒感染包括流感、鼻病毒 (即普通感冒病毒)、呼吸道合胞病毒、腺病毒、冠状病毒感染, 例如 COVID-19 和严重急性呼吸道综合征 (SARS)。胃肠病毒性疾病包括诺如病毒感染、轮状病毒感染、腺病毒感染和星形病毒感染。发疹型病毒性疾病包括麻疹、风疹、水痘、带状疱疹、玫瑰疹、天花、第五病和基孔肯雅病毒病。肝病毒性疾病包括甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎。皮肤病毒性疾病包括疣, 诸如生殖器疣、口腔疱疹、生殖器疱疹和传染性软疣。出血型病毒性疾病包括埃博拉、拉萨热、登革热、黄热病、马尔堡出血热和克里米亚-刚果出血热。使用本发明可以靶向的神经病学病毒性疾病包括脊髓灰质炎、病毒性脑膜炎、病毒性脑炎和狂犬病。

[0476] 4. 寄生微生物

[0477] 微生物可以是寄生微生物 (微寄生虫)。感染可由病原寄生微生物引起。

[0478] 可以使用本发明靶向的寄生微生物的实例包括原生动物。

[0479] 特别地, 本发明可以靶向原生动物组的肉足纲 (*Sarcodina*) (例如变形虫, 例如内阿米巴属 (*Entamoeba*), 诸如痢疾内变形虫 (*Entamoeba histolytica*) 或迪斯帕内变形虫 (*Entamoeba dispar*))、鞭毛纲 (*Mastigophora*) (例如鞭毛虫类、例如贾第鞭毛虫 (*Giardia*) 和利什曼原虫属 (*Leishmania*))、纤毛亚纲 (*Ciliophora*) (例如纤毛虫 (*ciliates*), 例如肠袋虫属 (*Balantidium*))、孢子虫纲 (*Sporozoa*) (例如疟原虫 (*Plasmodium*) 和隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*))、及其任意组合。

[0480] 可以使用本发明治疗的寄生虫感染包括疟疾、阿米巴痢疾和利什曼病 (例如皮肤利什曼病、粘膜皮肤利什曼病或内脏利什曼病)。

[0481] 人/动物宿主或受试者

[0482] 受试者可以是动物或人类受试者。本文的术语“动物”通常可以包括人; 然而, 在术语“动物”出现于短语“动物或人类受试者”中的情况下, 从上下文中可以理解, 术语“动物”特别是指非人动物, 或者“人”仅仅详细说明了动物可以是人的选择, 以免产生疑义。

[0483] 在特定的实施方案中, 受试者是人类受试者。人类受试者可以是婴儿或成人受试

者。

[0484] 在特定的实施方案中,受试者是脊椎动物受试者。脊椎动物可以是无颌超纲(无颌鱼)、软骨鱼纲(软骨鱼)、硬骨鱼纲(硬骨鱼)、两栖纲(两栖动物)、爬行纲(爬行动物)、鸟纲(鸟类)或哺乳动物纲(哺乳动物)。在特定的实施方案中,受试者是哺乳动物纲或鸟纲的动物受试者。

[0485] 在特定的实施方案中,受试者是家畜物种。家畜种类可以是下列之一:

[0486] -适应人类生境的共生动物(例如狗、猫、豚鼠)

[0487] -寻找或饲养作为食物的捕食动物或农畜(例如牛、绵羊、猪、山羊);以及

[0488] -主要用于牵引目的的动物(例如马、骆驼、驴)

[0489] 家畜的实例包括但不限于:羊驼、曲角羚羊、野牛、骆驼、金丝雀、水豚、猫、牛(包括巴厘牛)、鸡、领西猫、鹿(包括小鹿、梅花鹿、白唇鹿和白尾鹿)、狗、驴、野鸽(dove)、鸭、大羚羊、麋鹿、鹌鹑、白鼬、大额牛、山羊、鹅、珍珠鸡、豚鼠、大捻角羚、马、美洲驼、水貂、驼鹿、小鼠、骡、麝牛、鸵鸟、鸚鵡、猪、鸽(pigeon)、鹌鹑、兔、大鼠(包括大蔗鼠)、驯鹿、弯角大羚羊、绵羊、火鸡、水牛、牦牛和瘤牛。

[0490] 动物/人宿主或受试者的器官、结构和内部空间

[0491] 施用本发明组合物或多组分体系的器官不限于此。器官的实例包括皮肤以及呼吸系统、泌尿生殖系统、心血管系统、消化系统、内分泌系统、排泄系统、淋巴系统、免疫系统、被皮(integumentary)系统、肌肉系统、神经系统、生殖系统和骨骼系统的器官。

[0492] 心血管系统器官的实例包括心脏、肺、血液和血管。消化系统器官的实例包括唾液腺、食道、胃、肝、胆囊、胰腺、肠、结肠、直肠和肛门。内分泌系统器官的实例包括下丘脑、垂体、松果体或松果腺、甲状腺、甲状旁腺和肾上腺(adrenal)(即肾上腺(adrenal gland))。排泄系统器官的实例包括肾、输尿管、膀胱和尿道。淋巴系统器官的实例包括淋巴和淋巴结及血管。免疫系统器官的实例包括扁桃体、腺样体、胸腺和脾脏。被皮系统器官的实例包括哺乳动物的皮肤、毛发和指甲、以及鱼、爬行动物和鸟类的鳞片、以及鸟类的羽毛。神经系统器官的实例包括脑、脊髓和神经。生殖系统器官的实例包括性器官,诸如卵巢、输卵管、子宫、外阴、阴道、睾丸、输精管、精囊、前列腺和阴茎。骨骼系统器官的实例包括骨、软骨、韧带和腱。

[0493] 人类受试者的腔体包括但不限于口、鼻、耳、喉、呼吸道、肺、胃肠道、背侧体腔(诸如颅腔或椎腔)或腹侧体腔(诸如胸腔、腹腔或盆腔)。鼻、口、呼吸道和肺的施用途径是本发明的特征。

[0494] 表面的体外抗微生物治疗

[0495] 本发明的组分和组合物以及根据本发明的NO_x生成反应产生的气体可用于体外抗微生物治疗。“体外”是指被治疗的表面不是活的生物体,即使他最终可能用于医学应用。

[0496] 此类应用的实例包括在使用前对外科器械、皮下注射针和其他医疗装置进行消毒的方法,以及无论在医院或诊所或其他任何地方,对表面进行清洁或治疗以减少或防止病原体传播的方法。

[0497] 其他实例包括用于在将装置定位于受试者体内之前消毒假体和可植入装置(诸如支架(例如冠状支架))、外科螺钉、棒、板和夹板、矫形植入物、心脏起搏器、胰岛素输注装置、导管、造口术器械、眼内透镜、耳蜗植入物、电止痛植入物、可植入避孕装置、神经刺激

器、人工心脏瓣膜、电极、静脉滴注和药物输送装置等的方法。

[0498] 如果需要,本发明的组分或组合物可以涂覆在假体或可植入装置的表面上,由此在NO_x生成反应中产生的NO可以灌注到其他组织或器官中,或者在假体或植入装置附近施加其他生理作用。

[0499] 本领域技术人员已知用于生物相容的假体或可植入装置的表面的技术,包括结合功能性涂层,诸如包括本发明的组分或组合物的涂层。例如,参见Gultepe等,Advanced Drug Delivery Reviews,2010年3月8日,62(3),第305-315页;以及美国专利号5702754和6270788以及其中提到的文献,所有这些文献的公开内容在此引入作为参考。

[0500] 用于对无生命表面进行更一般的抗微生物治疗的组合物和方法在本领域中是众所周知的,并且在此不需要进行广泛描述。例如,个体消费者将抗菌组合物用于保健业、食品服务业、肉类加工业和私人部门。抗菌清洁组合物通常在水性和/或醇性载体中含有一种或多种活性抗菌剂或其组分、表面活性剂以及一种或多种其他组分,例如染料、香料、pH调节剂、增稠剂、皮肤调理剂等。广谱防腐剂或抗微生物组合物的目的是减少一系列病原体在表面上的病原体负载。通常,该组合物是液体(或在使用前由固体预混物制成液体),在进行任何所需的浓度调节之后,适当地通过加入水,通常借助于布或其他擦拭装置将液体铺展或喷射到待治疗的表面上,然后可以让其干燥或将其擦去。常规的组合物和表面治疗方法原则上适用于与本发明一起使用,其中活性抗微生物剂是根据本发明的生成NO_x的组合物或其组分,或包括根据本发明的生成NO_x的组合物或其组分。

[0501] 为了进一步讨论和举例说明可与本发明结合使用的已知抗微生物组合物和使用方法,我们例如参考美国专利号6,110,908;5,776,430;5,635,462;6,107,261;6,034,133;6,136,771;8,034,844;欧洲专利申请号EP 0505935;以及PCT专利申请WO 98/01110;WO 95/32705;WO 95/09605;和WO 98/55096;其内容在此全文引入作为参考。

[0502] 用于改善人和/或动物的健康的用途

[0503] 除了以上讨论的医学用途之外,本发明还可用于人或动物受试者的非治疗性应用。非治疗性应用与治疗性应用的区别在于,受试者是健康的,或者应用不针对治疗受试者确实患有的任何诊断疾病、病症或症状。

[0504] 非治疗性应用可包括旨在改善受试者的健康或舒适感的治疗,或提高受试者的代谢效率或免疫系统活性,从而使受试者能够更好地正常发挥作用或抵御未来感染的发展。非治疗性应用还包括帮助受试者认知功能或产生信心和控制感的治疗。

[0505] 为了用于此类非治疗性应用,本发明的组合和组合物可以与药物制剂类似的方式配制,或以非药物方式配制。关于类似药物制剂的制剂的更多细节,请参见上文标题为“任选的附加组分”的部分。非药物制剂可适当地包括食品添加剂、营养制剂、食品、饮料和饮料添加剂。适于加入到食品和饮料中的制剂可以适当地为液体或粉末的形式。营养制剂可以适当地为片剂、胶囊或口服可吸收液体的形式。

[0506] 如上所述,在标题为“在治疗或外科手术中的用途”的部分中,本发明的医学和/或外科手术用途可以在增强的健康或信心方面为患者提供次要益处。

[0507] 植物用途

[0508] 一氧化氮对活的或死的植物的有益作用是已知的。本发明包括将所述方法、装置、组合、试剂盒、组合物、用途以及由其释放的气体应用于为活的或死的植物提供有益效果。

[0509] 一氧化氮以及生成一氧化氮的系统在植物上的已知用途的实例包括以下:

[0510] 一氧化氮预防或延缓切花和植物枯萎(参见Siegel-Itzkovich,BMJ,1999;319(7205),第274页;以及Mur等,2013;“植物中的一氧化氮:知识现状的评估(Nitric oxide in plants:an assessment of the current state of knowledge)”,AoB PLANTS doi:10.1093/aobpla/pls052(<https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>));

[0511] 通过一氧化氮来调节植物-病原体相互作用,促进植物超敏反应,与固氮根瘤中的生物体共生,侧根和不定根以及根毛的发育,以及气孔开度的控制(参见Mur等,2003;引用如上);

[0512] 一氧化氮在植物中抗氧化和活性氧种类反应中的作用(参见Verma等,2003;“一氧化氮(NO)抵消由芥菜中的活性氧物质(ROS)介导的镉诱导的细胞毒性过程:ROS、NO和抗氧化反应之间的串扰(Nitric oxide(NO) counteracts cadmium-induced cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species(ROS) in Brassica juncea:cross-talk between ROS,NO and antioxidant responses)”;在BioMetals中);

[0513] 一氧化氮在生长素、细胞分裂素和其他植物激素的信号途径中的作用(参见Liu等,Proceedings of the National Academy of Sciences,2013;110(4),第1548-1553页)。

[0514] 以上引用的每份文献的公开内容在此引入作为参考。

[0515] 此外,本发明的一氧化氮生成系统及其产生的气体的抗微生物作用,特别是但不限于上述标题为“在治疗或外科手术中的用途”、“局部抗微生物用途”“鼻、口、呼吸道和肺用途”以及“用于抗微生物用途的目标”的部分中所描述的;同样适用于植物的微生物感染的靶向,本发明也涉及此类用途。

[0516] 上述已知的用途,以及一氧化氮和一氧化氮产生系统在植物上的所有其他用途,当与使用本发明的一氧化氮产生反应和/或一氧化氮、任选地其他氮氧化物和/或任选地其前体一起使用时,构成本发明的其他方面。

[0517] 被治疗的植物可以特别是农作物或家养植物,即由人培育的植物种类。

[0518] 农作物包括但不限于食品作物(诸如谷物、蔬菜和水果)、药物活性成分作物(诸如奎宁)、纤维作物(诸如棉花或亚麻)、其他材料作物(诸如橡胶和木材)、以及花卉作物(诸如玫瑰花和郁金香)。

[0519] 用于人类食品消费的作物的其他实例包括但不限于生产水稻作物的作物、小麦、甘蔗等糖类作物、玉米、大豆油、土豆、棕榈油、木薯、豆类干豆、葵花籽油、菜籽油、芥末油、高粱、小米、花生、豆子、红薯、香蕉、大豆、棉籽油、花生、花生油、山药、番茄、葡萄、洋葱、苹果、咖啡、芒果、山竹、番石榴、辣椒、花椒、茶、黄瓜、橙、核桃、杏仁、胡萝卜、萝卜、椰子、橘、柠檬、酸橙、草莓和榛子。

附图说明

[0520] 附图中:

[0521] 图1示出了在实施例1的不同反应条件下释放的一氧化氮随时间演变的累积曲线(nmol NO/mg亚硝酸根)。

[0522] 图2至图16示出了实施例2中所述的各种试验的结果。

[0523] 图17示出了用于SIFT-MS测定的设备的示意图。

[0524] 图18至图21示出了实施例3中所述各种检测的结果,涉及已知抗生素、羧酸溶液、羧酸-亚硝酸盐溶液和羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液的组合对脓肿分枝杆菌的抗微生物活性。

[0525] 图22示出了实施例4中所述试验的结果,涉及含有柠檬酸、亚硝酸钠和甘露醇的溶液对大量临床分离培养物的最低抑菌浓度(MIC)。

[0526] 图23示出了实施例5中所述试验的结果,涉及含有或不含多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液对铜绿假单胞菌的抗微生物活性。

[0527] 图24至图27示出了实施例6中所述试验的结果,涉及THP-1细胞中对结核分枝杆菌HN878的抗微生物活性。

[0528] 图28示出了实施例7中所述试验的结果,涉及在MDCK细胞(a)在 $MOI=0.002$ (●)且 $MOI=0.02$ (■)水平、在一系列稀释范围(水平轴是亚硝酸盐摩尔浓度)对H1N1甲型流感病毒的细胞毒性(LDH细胞毒性测定)和抗微生物活性,以灰色显示细胞毒性,右侧为细胞毒性刻度(在测定的亚硝酸盐浓度达到并包括 $0.015M$ 时的细胞毒性小于LDH对照的1%);以及(b)与奥司他韦($1\mu M$)相比,在 $MOI=0.002$ 且亚硝酸盐浓度为 $0.15M$ 、 $0.015M$ 和 $0.0015M$ 下的平板照片。上述句子中列举的板的顺序与图中从左到右的板的顺序相同(有两个实验,每个相应实验的板显示为一个在另一个之上)。最右边的一对板,紧邻奥司他韦对板的右边,为病毒对照。细胞毒性显示在每对试验板的下面,作为LDH对照的%(感染后24小时3次LDH测定的平均值)。

[0529] 图29示出了与阿米卡星和阴性对照相比,在类似条件下(描述于实施例3中),使用氢氧化钠缓冲至pH 5.8的亚硝酸钠、柠檬酸和甘露醇的酸化溶液杀死脓肿分枝杆菌的有效性的试验结果。

[0530] 图30和图31以示意性形式(图30)示出了实施例10中描述的用于治疗人类受试者肺部感染的本发明的实施方案,以及(图31)与吸入的气态一氧化氮(图31的左侧)相比,液体NO生成制剂与本发明的肺组织之间的接触点的视图(图31的右侧)。

[0531] 图32示出了实施例8的LDH细胞毒性测定的结果(第1轮和第2轮)。数据表示为两个实验的平均值+标准偏差(SD)。SD表示为灰色误差条。最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设定为100%,所有样品结果都与该值相关。LDH阳性对照是来自试剂盒的阳性对照。黑色条(2小时温育)是每种情况下每对条的左侧条,红色条(24小时温育)是每种情况下每对条的右侧条。

[0532] 图33示出了在 $MOI=3.0$ 下实施例8的对SARS-CoV-2进行抗病毒试验的结果(第1轮)。在第1轮中,使用SARS-CoV-2在4倍感染(MOI)下进行一次病毒产率降低测定试验,这通过接种物病毒的反滴定来证实。对于接种 MOI 为3的细胞,在滴定后在病毒对照中发现 $2.11\log_{10}$ TCID₅₀/ml。对于一些试验的条件,可以观察到SARS-CoV-2产率的降低。温育24小时后,在最低的三个 MOI (即0.3、0.03和0.003)中几乎没有检测到任何病毒。可能在Vero E6细胞上复制24小时不足以获得高水平的子代病毒。数据表示为两次滴定的平均值+标准偏差(SD)。SD表示为误差条。具有氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值的水平虚线水平是该测定的检测极限(LOD)。

[0533] 图34示出了在(a) $MOI=3.0$ 和(b) $MOI=0.3$ 下实施例8的对SARS-CoV-2进行抗病毒试

验的结果(第2轮)。该方法对应于那些MOI的第1轮部分,不同之处在于,制剂是第2轮制剂,温育48小时而不是24小时,以增加子代病毒的水平。数据表示为两次滴定的平均值+标准偏差(SD)。SD表示为误差条。具有氯喹和细胞对照log₁₀ TCID₅₀/ml值的水平虚线水平是该测定的检测极限(LOD)。

[0534] 图35示出了在MOI 3.0下实施例9对SARS-CoV进行抗病毒试验的结果。在用结晶紫进行细胞单层染色之前,显微检查2个板并对细胞病变效应(CPE)进行评分。发现在这些板中存在位于下层单层顶部的细胞碎片形式的CPE。示出了显微检查的两个板的结果。数据是每种条件的单一滴定。对于剩余的板,由于细胞单层过于致密,在结晶紫染色后不能对CPE进行评分。细胞对照log₁₀ TCID₅₀/ml值的水平虚线水平是该测定的检测极限(LOD)。

[0535] 实施例

[0536] 为了进一步说明本发明,提供了以下非限制性实施例。

[0537] 实施例1和实施例2中使用的材料、设备和方法

[0538] 溶液

[0539] 通过将合适的物质溶解在去离子水中制备0.1M和1M柠檬酸的储备溶液(Halky Supplies公司,Thornton Heath,英国)、0.1M柠檬酸钠(Fisher Scientific,Loughborough,英国)、1M亚硝酸钠(Sigma Aldrich,Dorset,英国)、0.5M和1M山梨糖醇(Special Ingredients,Chesterfield,英国)、0.5M和1M D-甘露醇(Sigma Aldrich,Dorset,英国)、3M氢氧化钠(Fisher Scientific,Loughborough,英国)以及0.1M和1M L-抗坏血酸(ICN Biomedicals公司,OH,美国)。从Arium Mini实验室水系统(Sartorius,德国)获得去离子水(18.2MΩ)。

[0540] 通过两种方法制备柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液:

[0541] 1.使用Sigma Aldrich,2018(<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>)所述的体积,滴定0.1M柠檬酸和0.1M柠檬酸钠的储备溶液;

[0542] 2.将用于0.1M或1M制剂的已知质量的柠檬酸溶解在小体积的去离子水中,然后滴定3M氢氧化钠和去离子水的储备溶液,以获得所需的缓冲液pH(pH 3至pH 6.2)。

[0543] 类似地,使用抗坏血酸和抗坏血酸钠(用于方法1)代替柠檬酸和柠檬酸钠(用于方法1),来制备抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液。

[0544] 通过用多元醇的储备溶液(例如山梨糖醇或甘露醇)溶解已知质量的亚硝酸钠,来实现多元醇的包合。

[0545] 缓冲液和原料的组分的加入顺序并不是关键的,可以以任何顺序混合。

[0546] 所有标准溶液在制备48小时内使用。使用邻苯二甲酸酯(pH 4)和溶于去离子水的磷酸盐(pH 7)片剂(Fisher Scientific英国公司,Leicestershire,英国)来制备校准缓冲液。

[0547] 选择离子流动管质谱法(SIFT-MS)启动和验证

[0548] Voice200选择离子流动管质谱仪(SIFT-MS)(Syft Technologies公司,新西兰)用于本报告中所述的所有气体分析。该仪器使用氦(Boc,Surrey,英国)作为载气。

[0549] 在分析之前,准备SIFT-MS用于简单的启动过程。使仪器退出待机模式,并进行一系列压力检查以确保毛细流动在可接受的操作范围内。随后是自动验证过程,其使用含有

苯、甲苯、乙苯和二甲苯的制造商的校准气体标准 (Syft Technologies公司, 新西兰)。最后, 使用10ppm二氧化氮标准 (Air Products公司, Surrey, 英国) 进行内部性能检查。

[0550] 用于生成NO的过程

[0551] 如图17所示, 设置SIFT-MS仪器、反应室和气体通路。

[0552] 用HT1温度智能传感器 (SensorPush, New York, 美国) 连续监测反应室内的温度。将反应室 (带硅氧烷密封件 (Tesco, Welwyn Garden City, 英国) 的670mL塑料 (无双酚A (无BPA)) 夹子锁桶) 连接到泵上, 该泵使湿润空气连续循环通过该室和SIFT-MS入口毛细管。加湿是通过将空气泵送通过两个含有去离子水的Dreschel瓶来实现的, 该方法类似于Vernon, W., 和Whitby, L. (1931) 实验室实验中空气的定量加湿 (The quantitative humidification of air in laboratory experiments), Trans. Faraday Soc. 27, 248-255 所描述的。在使用前, 使该系统均衡30分钟。开始连续的SIFT-MS扫描以实时检测和定量NO、NO₂和HONO。一旦观察到这些化合物的基线读数稳定 (浓度一致持续大于2分钟), 就将样品放入反应室并监测3小时。

[0553] 在SIFT-MS验证之后, 加热到120°C的毛细管入口延伸部通过T接头连接到反应室的出口, 使得SIFT-MS能够实时地对从反应室流出的气体进行采样。

[0554] 通过在称重盘 (~ 3mg) 中称取约0.3cm × 0.3cm的已梳理无纺布20克/平方米 (20gsm) 聚丙烯网 (RKW-Group, Frankenthal, 德国), 来制备样品。在将10μL的试验或对照溶液液滴加入到网中央之后 (确保液滴浸入到网中), 重新称重。最后, 将称重盘中装载的网放置在反应室中, 并将最后10μL的缓冲液滴吸移到网的中央。迅速密封反应室, 并在SIFT-MS界面上瞬时观察到含氮物质的产生。

[0555] 对所生成气体的分析

[0556] 使用所选择的SIFT-MS离子模式来分析所生成的气体, 并以连续批次进行扫描, 每一批次持续1000秒。重复扫描以下产品质量: 亚硝酸为30m/z, 亚硝酸为48m/z, 二氧化氮为46m/z以及一氧化氮为30m/z。使用所有三种正电前体离子来实现测定: 水合氢离子 (H₃O⁺)、亚硝酸酰离子 (NO⁺) 以及二氧正一价离子 (dioxygenyl) (O₂⁺)。空气以660ml/min的流速流过室, SIFT-MS入口以2.7ml/min的流速对该气流进行采样。

[0557] 所有实施例的pH测定

[0558] 具有玻璃电极 (LE438探针) 的Five Easy pH计 (Mettler Toledo, 瑞士) 用于所有的pH测定。用第二pH计确保该电极的精度; 手持205探针 (Testo, Alton, 美国)。新鲜校准品缓冲液用于pH计的日常校准。

[0559] 实施例1

[0560] 使用1M/c.pH 3柠檬酸与含有吸收1M亚硝酸钠的网接触, 来生成一氧化氮, 用或不用1M多元醇

[0561] 如上所述设置SIFT-MS仪器、反应室和气体通路, 如图17所示。

[0562] 如上所述, 将分别含有1M甘露醇的1M亚硝酸钠和含有1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠这两种试验溶液吸入网中, 以制备两个试验网。

[0563] 如上所述, 将不含多元醇的1M亚硝酸钠对照溶液吸入网中, 以制备对照网。

[0564] 如上所述, 将通过上述方法1和方法2中任一种制备的pH为约3的1M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的缓冲液加入到每个试验的每个试验网和对照网中, 以引发气体生成。

[0565] 结果如图1所示。

[0566] 数据表明,1M亚硝酸钠吸液网与1M/c.pH 3柠檬酸接触,当该网还含有1M甘露醇或1M山梨糖醇(甘露醇比山梨糖醇的作用更大)时,与不存在多元醇时相比,生成显著更大量的一氧化氮。

[0567] 实施例2

[0568] 研究不同羧酸、酸浓度、pH和多元醇对生成一氧化氮的作用。

[0569] 如上所述制备样品,如下改变有机酸、pH和多元醇:

[0570]

试验	每个试验轮次中吸入在网中的试验溶液	每个对照轮次中吸入在网中的对照溶液	加入网中的缓冲液 (其中指示在分开的轮次中使用可替代的缓冲液,如相关附图所示)
A (图 2)	1 M 亚硝酸钠	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3) 1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)

[0571]

B (图 3)	含 1 M 山梨糖醇 的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 阿拉伯糖 醇的 1 M 亚硝酸 钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3)
C (图 4)	含 1 M 山梨糖醇 的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 阿拉伯糖 醇的 1 M 亚硝酸 钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)

[0572]

D (图 5)	含 0.5 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 阿拉伯糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3)
E (图 6)	含 0.5 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 阿拉伯糖醇的 1 M 亚硝	-	1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)

[0573]

	酸钠		
F (图 7)	含 1 M 阿拉伯糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3) 0.5 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)
G (图 8)	含 1 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠	-	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3) 0.5 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)
H (图 9)	含 1 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含 1 M 阿拉伯糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3) 1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)
I (图 10)	含 0.5 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3)

[0574]

	钠 含 0.5 M 甘露醇 的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 木糖醇 的 1 M 亚硝酸钠 含 0.5 M 阿拉伯 糖醇的 1 M 亚硝 酸钠		1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 为约 3)
J (图 11)	含 0.5 M 甘露醇 的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 3)
K (图 12)	含 0.5 M 甘露醇 的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 4.8)
L (图 13)	含 0.5 M 甘露醇 的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 6.2)
M (图 14)	含 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠 含 2 M 丙三醇 的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 2)
N (图 15)	含 1 M 甘露醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 为约 2)

[0575]	含 1 M 山梨糖醇 的 1 M 亚硝酸钠		
	含 1 M 甘露醇和 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠		
	含 1 M 山梨糖醇 和 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠		
O (图 16)	含 0.5 M 甘露醇 的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 5.8)

[0576] 如上所述设置SIFT-MS仪器、反应室和气体通路,如图17所示。

[0577] 将如上所述的试验溶液吸入如上所述的网中,以制备试验网。

[0578] 使用时,如上所述将不含多元醇的1M亚硝酸钠对照溶液吸入网中,以制备对照网。

[0579] 如上所述,将通过上述方法1和方法2中任一种制备并具有所述pH的上述缓冲液或每种缓冲液加入到每个试验的每个试验网和对照网(如果使用的话)中,以如上所述引发气体生成。

[0580] 结果如图2至图13所示。附图中的“正常(normal)”是指不存在多元醇。

[0581] 图2比较了在不存在多元醇的情况下由柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液(pH为约3)产生的NO释放速率。这些曲线图清楚地表明,与抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液相比,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液在更高的水平上产生更高的初始突发和更长的释放持续时间。柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液痕量在约55000ppb处达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液痕量在约28000ppb处达到峰值。

[0582] 图3涉及含有多元醇或不含多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和亚硝酸盐体系。多元醇浓度为1M。与不含多元醇相比,当多元醇存在时,释放速率、初始突发和随后的随时间的释放发生改变。木糖醇和甘露醇产生最高峰,接着是山梨糖醇,然后是不含多元醇,然后是阿拉伯糖醇。在500至1000秒范围内,木糖醇和阿拉伯糖醇具有最高的产出,接着是甘露醇、山梨糖醇,然后是不含多元醇。峰值突发甘露醇=木糖醇(约64000ppb) > 山梨糖醇(约53000ppb) > 不含多元醇(约50000ppb) > 阿拉伯糖醇(约40000ppb)。

[0583] 图4涉及含有多元醇或不含多元醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液和亚硝酸盐体系。多元醇浓度为1M。峰值突发甘露醇(约40000ppb) > 阿拉伯糖醇(约35000ppb) > 木糖醇=不含多元醇(约30000ppb) > 山梨糖醇(约23000ppb),即与图3的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液体系顺序不同。

[0584] 图5涉及含有多元醇或不含多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和亚硝酸盐体系(为了清楚起见,省略了峰值突发与甘露醇线近似相同的“不含多元醇”线)。多元醇浓度为0.5M。峰值突发阿拉伯糖醇(约76000ppb) > 不含多元醇 = 甘露醇(约48000ppb) > 木糖醇 = 山梨糖醇(约40000ppb)。可以看出,与类似的1M多元醇柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液体系(图3)相比,该顺序不同,这表明多元醇作用是多元醇浓度依赖性的。

[0585] 图6涉及含有多元醇或不含多元醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液和亚硝酸盐体系(为了清楚起见,省略了峰值突发与山梨糖醇线近似相同的“不含多元醇”线)。多元醇浓度为0.5M。峰值突发木糖醇(约50000ppb) > 甘露醇(约38000ppb) > 山梨糖醇 = 不含多元醇(约30000ppb) > 阿拉伯糖醇(约23000ppb)。同样,与类似的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(0.5M多元醇)和抗坏血酸/抗坏血酸盐(1M多元醇)体系(分别为图5和图4)相比,观察到顺序不同。因此,表明多元醇作用是多元醇化学/立体化学和多元醇摩尔浓度依赖性的。

[0586] 图7和图8比较了柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液在多元醇(0.5M)存在下NO的释放速率。这些图强调了在图2至图6中观察到的一些差别。图7中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液痕量在约76000ppb处达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸缓冲液痕量在约22000ppb处达到峰值。图8中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液痕量在约48000ppb处达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸缓冲液痕量在约38000ppb处达到峰值。

[0587] 图9比较了1M多元醇浓度的累积产出。抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液在3000秒处的差异很小,顺序为甘露醇 > 山梨糖醇 = 阿拉伯糖醇 > 木糖醇。对于3000秒处的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,顺序为木糖醇 > 阿拉伯糖醇 > 甘露醇 > 山梨糖醇 > 不含多元醇。数据表明,一氧化氮的产出可提高直至约100%,或甚至更多,例如在不含多元醇(曲线E,其在3000秒后获得约10000nmol/mg亚硝酸根的累积一氧化氮释放,其甚至随后仍然升高)和木糖醇(曲线A,其在相同时间后获得约20000nmol/mg亚硝酸盐的累积一氧化氮释放,其亦仍然升高)之间。

[0588] 图10比较了0.5M多元醇浓度的累积产出。对于3000秒处的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,顺序为阿拉伯糖醇 > 甘露醇 = 木糖醇 > 山梨糖醇 > 不含多元醇(为了清楚起见,省略了位于山梨糖醇线之下的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的“不含多元醇”线)。对于3000秒处的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液,顺序为木糖醇 > 甘露醇 > 山梨糖醇 > 阿拉伯糖醇。同样,该顺序与1M多元醇不同(图9)。

[0589] 图11至图13比较了柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液1M和亚硝酸钠(1M)与甘露醇(0.5M)在不同pH下的累积曲线。当pH增加时,差异变得更小,并且在pH 6.2下,差异消失。因此,从这些实验中可以看出,多元醇作用也是pH依赖性的。

[0590] 图14示出了1M亚硝酸钠溶液中存在或不存在丙三醇(1M和2M)的情况下,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M, pH为约2)的累积NO产出(nmol/cm²网面积)。在前2000秒,1M和2M丙三醇的NO产出略低于不含多元醇的NO产出。在更长时间内,含有丙三醇的制剂产出更大,而含有2M丙三醇的产出更大。

[0591] 图15示出了柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M, pH为约2)和1M亚硝酸钠溶液的累积NO产出(nmol/cm²网面积),其中亚硝酸钠溶液中存在或不存在多元醇。该曲线显示,与不存在丙三醇时相比,甘露醇/亚硝酸盐溶液中加入丙三醇降低了产出。然而,令人惊奇的是,与甘露醇的情况不同,与不存在丙三醇时的产出相比,山梨糖醇/亚硝酸盐溶液中含有丙三醇提高

了NO产出。

[0592] 当使用丙三醇时,首先制备1M丙三醇溶液,并将其用于制备1M山梨糖醇或1M甘露醇溶液,然后将其用于制备1M亚硝酸盐溶液。

[0593] 图16示出了柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH 5.8)的累积NO产出(mol/mg亚硝酸盐),亚硝酸钠(1M)溶液中存在或不存在甘露醇(0.5M)。该曲线显示,加入多元醇在约2000秒的反应时间后产生更大的NO产出。

[0594] 图16显示,与不含甘露醇的相同体系相比,在生理上重要的pH值大于约5、特别是大于约5.5的情况下,甘露醇增强了一氧化氮生成,提供了在10000秒(167分钟)后每毫克亚硝酸盐1400nmol NO的累积水平。

[0595] 实施例3

[0596] 含有多元醇或不含多元醇的各种有机酸和亚硝酸盐溶液对脓肿分枝杆菌培养物的活性

[0597] 材料

[0598] 用900ml蒸馏水重建4.7g Middlebrook 7H9肉汤碱(Sigma-Aldrich),并在121°C高压灭菌15分钟。将Middlebrook ADC生长增补剂(Sigma-Aldrich)加入到高压灭菌的7H9溶液中(每450ml加入50ml,总共加入100ml)。

[0599] 1M亚硝酸钠(Emsure):将6.9g亚硝酸钠粉末溶解在100ml蒸馏水中,置于干净的螺旋顶玻璃瓶中。将混合物在121°C下高压灭菌15分钟。

[0600] 1M柠檬酸(Sigma-Aldrich):将19.2g柠檬酸粉末溶解在100ml蒸馏水中,置于干净的螺旋顶玻璃瓶中。将混合物在121°C下高压灭菌15分钟。

[0601] 1M抗坏血酸(Sigma-Aldrich):将17.6g抗坏血酸粉末加入到无菌玻璃瓶中。充分溶解于100ml灭菌蒸馏水中。由于他的半衰期短,他是使用严格的无菌技术在日常基础上制备的。由于其固有的不稳定性,不对其进行高压灭菌,而在使用前过滤通过0.2 μ 过滤器。

[0602] 1M柠檬酸三钠二水合物(Sigma-Aldrich):将29.4g柠檬酸钠粉末溶解在100ml蒸馏水中,置于干净的螺旋顶玻璃瓶中。将混合物在121°C下高压灭菌15分钟。

[0603] 1M L-抗坏血酸钠盐(Acros Organics):将19.8g抗坏血酸钠粉末溶解在100ml蒸馏水中,置于干净的螺旋顶玻璃瓶中。将混合物在121°C下高压灭菌15分钟。

[0604] 对于用多元醇进行的实验,使用D-甘露醇(Sigma-Aldrich)。将多元醇加入到上述亚硝酸钠储备溶液中,以形成以下储备溶液:

[0605] 储备溶液A——1M亚硝酸钠和0.5M甘露醇

[0606] 储备溶液B——1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露醇

[0607] 还制备了1.5M柠檬酸的储备溶液。

[0608] 针对稀释因子调节各组分的摩尔浓度,以确保各实验溶液的正确最终摩尔浓度。

[0609] 脓肿分枝杆菌(MAB)

[0610] 在本实施例中,所有实验条件均使用实验室参比菌株脓肿分枝杆ATCC 19977lux。

[0611] 方法

[0612] 将50ml离心管标记为管T(试验悬浮液)、管A(酸对照)和管C(对照)。

[0613] 向每个管中加入8ml 7H9+ADC补充剂。然后加入100 μ l MAB悬浮液(先前生长到大约3-4麦克法兰(McFarland)标准)。测定MAB悬浮液的基线相对光单位(RLU)读数。通过涡旋

混合内容物。

[0614] 当不存在多元醇(甘露醇)时的管内容物

[0615] 管T:向管中加入1ml亚硝酸钠(1M)溶液,紧接着加入1ml柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M),得到在10ml中0.1M的最终浓度。通过温和的转化将内容物混合,并在37°C温育24小时。

[0616] 管A:向管中加入1ml柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M),以及1ml无菌蒸馏水以产生10ml的最终体积,以检测0.1M的酸浓度。通过温和的转化将内容物混合,并在37°C温育24小时。

[0617] 管C:向管中加入2ml无菌蒸馏水,使总体积为10ml。这是在最佳条件下评估生长的对照。通过温和的转化将内容物混合,并在37°C温育24小时。

[0618] 当存在多元醇(甘露醇)时的管T内容物

[0619] 当甘露醇存在时,试管T的含量如下:

[0620] 1.管T:1ml亚硝酸钠(1M)和甘露醇(0.5M)以及1ml柠檬酸(1M)

[0621] 2.管T:1ml亚硝酸钠(1.5M)和甘露醇(0.5M)以及1ml柠檬酸(1M)

[0622] 3.管T:1ml亚硝酸钠(1M)和甘露醇(0.5M)以及1ml柠檬酸(1.5M)

[0623] 在温育30分钟、60分钟和24小时测定RLU,以评估T、A和C溶液的活性。

[0624] 温育24小时后,将管C、管A和管T平铺在哥伦比亚血琼脂(VWR Chemicals)上。将板在37°C温育72小时。在培养的第3、5和7天读取集落形成单元(CFU)。所有工作在CL2实验室设施内的CL2生物安全柜中进行。

[0625] 结果如图18至图21所示。

[0626] 图18显示:与仅含0.1M柠檬酸的溶液(管A)相比,0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液(管T)在pH 5和5.5下7天后能有效地消除脓肿分枝杆菌培养物,并在pH值6.0、6.5、7.0和7.4下减少脓肿分枝杆菌培养物。图18还显示与仅含抗坏血酸的溶液(管A)相比,0.1M抗坏血酸和0.1M亚硝酸盐(管T)的溶液在pH 5.0下7天后能有效地消除脓肿分枝杆菌培养物,并在pH值6.5、7.0和7.4下减少脓肿分枝杆菌培养物。

[0627] 图19a)显示:0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育三天后可有效降低脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并且0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐含有0.05M甘露醇的溶液在温育三天后几乎完全有效消除脓肿分枝杆菌培养物。图19b)显示:0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐不含甘露醇的溶液在温育五天后可有效维持降低的脓肿分枝杆菌CFU。该图还显示,0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐含有0.05M甘露醇的溶液在温育五天后可有效降低脓肿分枝杆菌培养物的CFU。

[0628] 图20a)显示:0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育三天后可有效降低脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并且0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐含有0.05M甘露醇的溶液在温育三天后可有效消除脓肿分枝杆菌培养物。图20b)显示:0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐不含甘露醇的溶液在温育五天后有效维持降低的脓肿分枝杆菌CFU。该图还显示,0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐含有0.05M甘露醇的溶液在温育五天后可有效消除脓肿分枝杆菌培养物。

[0629] 图21显示:0.1M柠檬酸和0.15M亚硝酸盐的溶液在温育三天后可有效降低脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并在温育5天后维持脓肿分枝杆菌培养物CFU的降低。该图还显示,0.1M柠檬酸和0.15M亚硝酸盐含有0.05M甘露醇的溶液在温育三天和五天后可有效消除脓

肿分枝杆菌培养物。

[0630] 实施例4

[0631] 在一系列临床分离培养物中,羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对脓肿分枝杆菌 (Mabs) 和结核分枝杆菌 (Mtb) 的最低抑菌浓度 (MIC)

[0632] 健康志愿者

[0633] 从提供书面知情同意书 (伦理批准参考REC No.12/WA/0148) 的健康志愿者提取外周血样本。

[0634] 分枝杆菌菌株

[0635] 脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977) 和结核分枝杆菌 (H37RV) 菌株均含有细菌荧光素酶 (lux) 基因盒 (luxCDABE), 可测定相对光单位 (RLU) 以及常规集落形成单位 (CFU) 测定细菌生存。

[0636] 通用试剂

[0637]

	编号	供应商
24孔细胞培养集群	3526	Costar Corning, 美国
CD14微珠, 人	130-150-201	Miltenyi Biotec, 英国
柠檬酸	791725	Sigma, 英国
哥伦比亚血琼脂平板	100253ZF	vWR, 英国
癸醛	D7384	Sigma, 英国
杜氏改良Eagle培养基-高糖	D6429	Sigma, 英国
FLUOstar Omega		BMG Labtech, 英国
胎牛血清	P30-3702	Pan-Biotech, 英国
GloMax-96光度计		Promega, 英国
甘露醇	M4125	Sigma, 英国
Middlebrook 7H11琼脂平板	PP4080	E&O Labs, 英国
Middlebrook 7H9肉汤	M0178	Sigma, 英国
脓肿分枝杆菌	19977	ATCC
结核分枝杆菌	H37RV	ATCC
青霉素链霉素	P0781	Sigma, 英国
重组人GM-CSF	300-03	PeptoTech EC, 英国
重组人IFN γ	300-02	PeptoTech EC, 英国
亚硝酸钠	1.06549.0500	Merck, 德国

[0638] 处理条件

[0639] 处理1: 柠檬酸0.15M、亚硝酸钠0.1M和甘露醇0.05M

[0640] 处理2: 柠檬酸0.1M、亚硝酸钠0.15M和甘露醇0.05M

[0641] 肉汤微量稀释最低抑菌浓度 (MIC)

[0642] 每种针对脓肿分枝杆菌和结核分枝杆菌的处理的MIC根据由临床和实验室标准研究所制定的抗菌药物敏感性试验指南 (M07-A9) 进行。在平板上对每种治疗进行双倍稀释, 并将平板在37°C下温育, 并在第3天和第7天读取Mabs, 在第14天和第21天读取Mtb。试验重复两次。

[0643] 所有工作均在CL2实验室设施内的CL2生物安全柜中进行。

[0644] 发现1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露醇溶液对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度为4.7mM。进一步发现,1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露醇溶液对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度为2.3mM。

[0645] 发现1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露醇溶液对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度为3.1mM。进一步发现,1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露醇溶液对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度为1.6mM。

[0646] 也通过使用以下编号的分离株进行肉汤微稀释来测定最低抑菌浓度(MIC):570、571、573、575、578、579、580、581、582、583、584、585、589、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、616、617、619、812、825、829、839、845、848、853、857、858、873、894、898、909、919、928、932、942、944、955、956、959、963、964、965、968、975、980、982、985、993、995、1000、1001、1007、1011、1017、1023、1024、1026、1027、1042、1043、1045、1047、1049、1054、1063、1066、1067、1070、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1082、1086、1094、1096、1101、1103、1104和1106,来自英国剑桥大学Floto实验室(<https://www.flotolab.com/>)脓肿分枝杆菌临床分离株库。评估每个单独的分离物重复两次。

[0647] 对临床分离株的试验结果显示在图22a)和b)中。该图显示一氧化氮对脓肿分枝杆菌的MIC(重复两次)并在分离物培养3、4和5天后读取读数。在培养的第7天也读取平板,但与第5天相比没有发现差异。实验室菌株ATCC 19977lux在两个实验中用作对照,并显示与临床分离株的比较结果。

[0648] 图22显示:柠檬酸-亚硝酸盐-甘露醇溶液对多种临床分离株具有影响。对于0.1M柠檬酸、0.15M亚硝酸盐和0.05M甘露醇溶液,大多数临床分离株的最低抑菌浓度在0.02M以内(图22a),并且对于0.15M柠檬酸、0.1M亚硝酸盐和0.05M甘露醇溶液,大多数临床分离株的最低抑菌浓度在0.04M以内(图22b)。

[0649] 在这两幅图中,某些样品的MIC在不同的日子里有所不同。这些是在分离样品的识别码上方显示一个以上点的样品。通常而言,在那种情况下,在温育后期观察到较高的MIC而非较低的MIC。总体而言,与较高柠檬酸(0.15M)和较低亚硝酸钠(0.1M)的组合(图22(b))相比,较低柠檬酸(0.1M)和较高亚硝酸钠(0.15M)的组合(图22(a))更有效。

[0650] 图29中示出了羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液在体外杀死脓肿分枝杆菌的附加数据。在该图中,表明使用氢氧化钠溶液缓冲至pH 5.8的亚硝酸钠、柠檬酸和甘露醇的水性制剂对脓肿分枝杆菌的杀死效力,在类似条件下,在24小时内,与阿米卡星和阴性对照进行比较。

[0651] 实施例5

[0652] 含和不含多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液对铜绿假单胞菌的抗菌活性

[0653] 仪器和培养基

[0654] UKAS校准移液器(100-1000μL范围)——Proline® Plus

[0655] UKAS校准的多道移液器(P300和P20)——Gilson®, 英国

[0656] 通用管——SLS, 英国

[0657] 校准天平——HR-100A

- [0658] 微生物培养箱——Heratherm™, ThermoFisher Scientific, 英国
- [0659] 胰蛋白胍大豆琼脂 (TSA) ——Southern Group Laboratories, 英国
- [0660] 胰蛋白胍大豆肉汤 (TSB) ——Acumedia®, SLS, 英国
- [0661] 麦芽琼脂——Acumedia®, Acumedia®, SLS, 英国
- [0662] 脑心浸液肉汤 (BHIB) ——Acumedia®, SLS, 英国
- [0663] 沙氏 (Sabouraud) 葡萄糖肉汤 (SDB) ——Acumedia®, SLS, 英国
- [0664] Dey-Engley中和剂 (DE-N) ——Acumedia®, SLS, 英国
- [0665] 柠檬酸——Sigma, 英国
- [0666] 亚硝酸钠——Sigma, 英国; 甘露醇——Sigma, 英国
- [0667] 山梨糖醇——Sigma, 英国
- [0668] 试验微生物
- [0669] 铜绿假单胞菌NCTC 13618——从囊性纤维化患者中分离
- [0670] 制剂

[0671]

制剂 1	液体	柠檬酸pH 5.2	亚硝酸钠
制剂 2	液体	柠檬酸pH 6.0	亚硝酸钠
制剂 3	液体	柠檬酸pH 5.2	亚硝酸钠, 含有甘露醇
制剂 4	液体	柠檬酸pH 6.0	亚硝酸钠, 含有甘露醇
制剂 5	液体	柠檬酸pH 5.2	亚硝酸钠, 含有山梨糖醇
制剂 6	液体	柠檬酸pH 6.0	亚硝酸钠, 含有山梨糖醇
阳性对照	液体	无	无
阴性对照	液体	无	无

- [0672] 浓度1——1M柠檬酸加1M亚硝酸钠(含有或不含0.5M多元醇)
- [0673] 浓度2——0.5M柠檬酸加1M亚硝酸钠(含有或不含0.5M多元醇)
- [0674] 浓度3——0.5M柠檬酸加0.5M亚硝酸钠(含有或不含0.5M多元醇)
- [0675] Dey-Engley中和剂验证
- [0676] 从胰蛋白胍大豆琼脂 (TSA) 中收获铜绿假单胞菌的24小时培养物, 并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ 悬浮液。这在脑心浸液肉汤 (BHIB) 中进一步稀释以制备 $1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ 工作悬浮液。
- [0677] 通过连续稀释和铺板确认起始接种物。使用对照 (9mL磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和1mL接种物)、毒性 (9mL Dey-Engley中和剂 (DE-N) 和1mL接种物) 以及中和剂功效 (8mL中和剂、1mL试验剂和1mL接种物) 样品。处理5分钟后, 从每个管中取出200μL悬浮液, 连续稀释并将

100 μ L接种到TSA上。琼脂平板在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下温育18-24小时。

[0678] 对浮游生物的抗菌功效

[0679] 从TSA中收获24小时铜绿假单胞菌培养物,并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7 \text{CFU mL}^{-1}$ 悬浮液。这在BHIB中进一步稀释以制备 $1 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4 \text{CFU mL}^{-1}$ 工作悬浮液。通用管中装有8mL细菌溶液。

[0680] 将1mL柠檬酸溶液和1mL亚硝酸钠溶液加入到每种试验试剂中,以达到上述所需的浓度。溶液在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下温育24小时。温育期后,从每个管中取出1mL,并转移到含有9mL中和剂的管中。使用连续稀释和平板计数对活生物体进行量化。

[0681] 结果如图23所示。

[0682] 数据显示对以下假单胞菌的抗菌效果:

[0683] -柠檬酸(1M)与亚硝酸盐(1M)混合,含有和不含多元醇(0.5M) (“浓度1”);

[0684] -柠檬酸(0.5M)与亚硝酸盐(1M)混合,含有和不含多元醇(0.5M) (“浓度2”);以及

[0685] -柠檬酸(1M)与亚硝酸盐(0.5M)混合,含有和不含多元醇(0.5M) (“浓度3”)。

[0686] 柠檬酸溶液的pH为5.2 (对于制剂1、3和5) 和6.0 (对于制剂2、4和6)。制剂1和2不含多元醇;制剂3和4含有甘露醇;制剂5和6含有山梨糖醇。

[0687] 所有制剂在pH 5.2下均显示出良好的功效。在pH 6时,含有甘露醇的制剂稍微更有效。

[0688] 实施例6

[0689] 评估了包括亚硝酸盐、有机酸和多元醇在内的制剂在THP-1细胞中对抗结核分枝杆菌HN 878的功效。

[0690] 制剂

[0691] 如下表所示制备制剂。如果制备方法被表述为“浓缩”,在样品参考中由后缀FC表示,这是指该制剂最初是作为一种浓缩的预混物制成的,其含有所有三种成分亚硝酸钠(0.75M)、多元醇(0.25M)和酸(0.5M),然后用蒸馏水稀释,以达到表中所列的所需浓度。如果制备方法被表述为“稀释”,在样品参考中由后缀FD表示,这是指该制剂最初是作为含有所有三种成分的预混物制成的,初始浓度为所需浓度,即亚硝酸钠(0.15M)、多元醇(0.05M)和酸(0.1M),然后用蒸馏水稀释以达到表中规定的每种浓度。

[0692] 在每种制剂中,通过连续稀释来制备一系列浓度的亚硝酸钠,即16、8、4、2、1、0.5、0.25和0.125 $\mu\text{g/mL}$,用于体外细菌抑制试验,用于抗结核分枝杆菌HN878。

[0693]

	样品编号	制备方法	试验混合物（稀释后的最终摩尔浓度）		
			亚硝酸钠	多元醇	酸
制剂 1	30RESP001F C	浓缩	亚硝酸钠 0.15 M	甘露醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
	30RESP001F D	稀释	亚硝酸钠 0.15 M	甘露醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
制剂 2	30RESP002F C	浓缩	亚硝酸钠 0.15 M	乳糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
	30RESP002F D	稀释	亚硝酸钠 0.15 M	乳糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
制剂 3	30RESP003F C	浓缩	亚硝酸钠 0.1 M	甘露醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
	30RESP003F D	稀释	亚硝酸钠 0.1 M	甘露醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬酸盐 0.1 M
制剂	30RESP004F	浓缩	亚硝酸钠	甘露醇	抗坏血酸/抗

[0694]

4	C		0.1 M	0.05 M	坏血酸盐 0.1 M
	30RESP004F D	稀释	亚硝酸钠 0.1 M	甘露醇 0.05 M	抗坏血酸/抗坏血酸盐 0.1 M

[0695] 使用THP-1巨噬细胞(1)化合物筛选测定,来进行MIC巨噬细胞试验。

[0696] 巨噬细胞制备和培养:将THP-1细胞扩增2周。此后,将THP-1细胞以 5×10^5 细胞/mL的浓度悬浮在用于巨噬细胞的完全DMEM培养基中。将细胞接种到24孔组织培养板中,每孔2mL(每孔 1×10^6)。一个24孔细胞板允许对7个药物浓度范围加上未经处理的对照进行三次重复试验。除了药物测定板之外,还接种了一个额外的板(或至少3个附加的孔),用于确定感染当天的细菌吸收。细胞在37°C和5%CO₂的加湿室中温育。DMEM不含抗生素/抗真菌剂的完全培养基在3天测定期间保持不变。

[0697] 用于巨噬细胞的完整DMEM培养基:

[0698] 杜氏改良Eagle培养基 (Cellgro 15-017-cv) 补充有:

[0699] 热灭活胎牛血清 (Atlas Biologicals, Fort Collins, CO, F-0500-A) (10%)

[0700] L929条件培养基 (10%)

[0701] L-谷氨酰胺 (Sigma G-7513) (2mM)

[0702] HEPES缓冲液 (Sigma H-0887) (10mM) 抗生素/抗真菌剂 (Sigma A-9909) (1X)

[0703] MEM非必需氨基酸 (Sigma M-7145) (1X)

[0704] 2-巯基乙醇 (Sigma M-6250) (50nM)

[0705] L-929条件培养基:

[0706] 将来自ATCC的L-929 (CCL-1) 细胞以 4.7×10^5 个细胞接种在75cm²烧瓶中的55mL DMEM+10%胎牛血清中。允许细胞生长用于THP-1细胞3天。在第3天, 收集上清液并通过0.45- μ m过滤器过滤, 等分, 并在-20C下冷冻。无细胞滤液用于DMEM培养基中用于THP-1感染。

[0707] THP-1细胞的感染:

[0708] 在第0天, 从细胞中取出培养基并用0.2ml含有结核分枝杆菌HN878的不含抗生素/抗真菌剂的DMEM替代, MOI为1巨噬细胞与10细菌的比例。将组织培养板放置在封闭的Ziploc袋内, 以便运回培养箱。一旦进入温育器, 袋子就会被拉开。细胞与细菌一起温育2小时。感染后, 去除附着在细胞外的细菌, 每孔用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤一次, 并加入2mL不同药物浓度的不含抗生素/抗真菌剂的完全DMEM培养基。为了制备药物浓度, 通过将10ml之前的悬浮液加入到下一管中的10ml完全培养基和血清中进行连续2倍稀释。将组织培养板放回37°C+5%CO₂的培养箱中 (药物在孔中保留3天)。每个药物浓度在三个平行孔中进行试验。

[0709] 在感染后2小时、1天、2天和5天后进行细胞裂解物的铺板和THP-1细胞的细胞活力评估。从所有孔中除去组织培养基, 用1ml PBS洗涤细胞两次。接下来, 每孔加入1ml无菌双蒸水+0.05%吐温-80; 细胞在室温下放置5-10分钟。细胞裂解物在24孔组织培养板中的无菌盐水中按1:10进行系列稀释。通过1/1,000稀释步骤, 将稀释的细胞裂解物接种到7H11/OADC琼脂上。(细胞的每个24孔TC板需要四个24孔TC板来进行系列稀释, 以及24个琼脂“四重”板)。平板在32°C下温育30天, 计数菌落以确定CFU/ml。

[0710] 结果:

[0711] 体外THP-1HN878光密度结果

[0712] 最低抑菌浓度 (MIC) 报告为抑制细菌的最稀释的组合物 (即特定制剂的最大稀释水平, 表示为16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/ml)

[0713]

组合物	MIC (μ g/ml) 第0天	MIC (μ g/ml) 第1天	MIC (μ g/ml) 第2天	MIC (μ g/ml) 第5天
制剂 1	16	16	16	16

[0714]

(30RESP001FC) 浓缩				
制剂 1 (30RESP001FD) 稀释	16	16	16	16
制剂 2 (30RESP002FC) 浓缩	8	8	8	16
制剂 2 (30RESP002FD) 稀释	16	8	16	16
制剂 3 (30RESP003FC) 浓缩	8	8	8	8
制剂 3 (30RESP003FD) 稀释	8	16	16	16
制剂 4 (30RESP004FC) 浓缩	4	4	4	0.125
制剂 4 (30RESP004FD) 稀释	16	16	0.25	0.25

[0715] 结果如图24至图27所示。

[0716] 图24:在THP-1细胞中评估了30RESP001FC和FD(浓缩和稀释)对抗结核分枝杆菌HN878的功效。评估制剂30RESP001FC(浓缩)(A)和30RESP001FD(稀释)(B)在感染并用16 μ g/ml(Δ)、8 μ g/ml(∇)、4 μ g/ml($\diamond$)、2 μ g/ml($\circ$)、1 μ g/ml($\square$)、0.5 μ g/ml($\bullet$)、0.25 μ g/ml($\blacktriangle$)和0.125 μ g/ml($\blacktriangledown$)处理后2小时(第0天)、1天、2天和5天后的功效,用于THP-1巨噬细胞中对结核分枝杆菌HN878($\square$)的细胞内杀伤。在图24的每个曲线图中,由于16 μ g/ml和8 μ g/ml的处理更有效,分别表示用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的 Δ 和 ∇ 曲线可以与分别表示用0.25 μ g/ml

和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的▲和▼曲线区分开来。换言之,表示用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,表示用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的□曲线可以很容易地与表示无处理的▣曲线区分开来,因为以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理更有效。表示无处理的▣曲线的CFU值在第1天后上升并保持在 1×10^4 以上。

[0717] 上述MIC表和图24中描述为“16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ”的30RESP001FC和FD组合物包括0.15M亚硝酸钠、0.05M甘露醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),8、4、2、1、0.5、0.25和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组合物各自分别按16至0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的所述顺序对先前组合物进行50%稀释(即浓度减半)。

[0718] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI感染结核分枝杆菌,并在感染后2小时(第0天)、1天、2天和5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)来确定细胞内细菌的数量。显示的值是来自一项独立实验的平均值 $\pm$ SD。特别地,在用30RESP001FC和FD(浓缩和稀释)16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理结核分枝杆菌HN878(*, $p < 0.05$)时,相对于无处理的对照,功效增加。

[0719] 图25:在THP-1细胞中评估了30RESP002FC和FD(浓缩和稀释)对抗结核分枝杆菌HN878的功效。评估制剂30RESP002FC(浓缩)(A)和30RESP002FD(稀释)(B)在感染并用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (△)、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▽)、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (◇)、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (○)、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (□)、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (●)、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▲)和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▼)处理后2小时、1天、2天和5天后的功效,用于THP-1巨噬细胞中对结核分枝杆菌HN878(▣)的细胞内杀伤。在图25的每个曲线图中,由于16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的处理更有效,分别表示用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的△和▽曲线可以与分别表示用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的▲和▼曲线区分开来。换言之,表示用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,表示用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的□曲线可以很容易地与表示无处理的▣曲线区分开来,因为以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理更有效。表示无处理的▣曲线的CFU值在第1天后上升并保持在 1×10^4 以上。

[0720] 上述MIC表和图25中描述为“16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ”的30RESP002FC和FD组合物包括0.15M亚硝酸钠、0.05M乳糖醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),8、4、2、1、0.5、0.25和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组合物各自分别按16至0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的所述顺序对先前组合物进行50%稀释(即浓度减半)。

[0721] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI感染结核分枝杆菌,并在感染后2小时、1天、2天和5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)来确定细胞内细菌的数量。显示的值是来自一项独立实验的平均值 $\pm$ SD。在用30RESP002FC(浓缩)16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及30RESP002FD(稀释)16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理结核分枝杆菌HN878(*, $p < 0.05$)时,相对于无处理的对照,功效增加。

[0722] 图26:在THP-1细胞中评估了30RESP003FC和FD(浓缩和稀释)对抗结核分枝杆菌HN878的功效。评估30RESP003FC(浓缩)(A)和30RESP003FD(稀释)(B)在感染并用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (△)、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▽)、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (◇)、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (○)、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (□)、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (●)、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▲)和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▼)处理后2小时(第0天)、1天、2天和5天后的功效,用于THP-1巨噬细胞中对结核分枝杆菌HN878(▣)的细胞内杀伤。在图26的每个曲线图中,由于16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的处理更有效,分别表示用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的△和▽曲线可以与分别表示用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的▲和▼曲线区分开来。换言之,表示用16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,表示用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的□曲线可以很容易地与表示无处理的▣曲线区分开来,因为以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理更有

效。表示无处理的□曲线的CFU值在第1天后上升并保持在 1×10^4 以上。

[0723] 上述MIC表和图26中描述为“ $16\mu\text{g}/\text{ml}$ ”的30RESP003FC和FD组合物包括0.1M亚硝酸钠、0.05M甘露醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),8、4、2、1、0.5、0.25和 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 组合物各自分别按16至 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 的所述顺序对先前组合物进行50%稀释(即浓度减半)。

[0724] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI感染结核分枝杆菌,并在感染后2小时、1天、2天和5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)来确定细胞内细菌的数量。显示的值是来自一项独立实验的平均值 $\pm$ SD。在用30RESP003FC(浓缩) $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及30RESP003FD $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理结核分枝杆菌HN878(*, $p < 0.05$)时,相对于无处理的对照,功效增加。

[0725] 图27:在THP-1细胞中评估了30RESP004FC和FD(浓缩和稀释)对抗结核分枝杆菌HN878的功效。评估30RESP004FC(浓缩)(A)和30RESP004FD(稀释)(B)在感染并用 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ (Δ)、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ (∇)、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\diamond$)、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\circ$)、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\square$)、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\bullet$)、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\blacktriangle$)和 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\blacktriangledown$)处理后2小时(第0天)、1天、2天和5天后的功效,用于THP-1巨噬细胞中对结核分枝杆菌HN878($\square$)的细胞内杀伤。在图27的每个曲线图中,由于 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 的处理更有效,分别表示用 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的 Δ 和 ∇ 曲线可以与分别表示用 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线区分开来。换言之,表示用 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的曲线显示出比用 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,表示用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理的 $\square$ 曲线可以很容易地与表示无处理的 $\square$ 曲线区分开来,因为以 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理更有效。表示无处理的 $\square$ 曲线的CFU值在第1天后上升并保持在 1×10^4 以上。

[0726] 上述MIC表和图27中描述为“ $16\mu\text{g}/\text{ml}$ ”的30RESP004FC和FD组合物包括0.1M亚硝酸钠、0.05M甘露醇和0.1M抗坏血酸/抗坏血酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),8、4、2、1、0.5、0.25和 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 组合物各自分别按16至 $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ 的所述顺序对先前组合物进行50%稀释(即浓度减半)。

[0727] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI感染结核分枝杆菌,并在感染后1天、2天和5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)来确定细胞内细菌的数量。显示的值是来自一项独立实验的平均值 $\pm$ SD。与无处理的对照相比,在用30RESP004FC(浓缩) $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理结核分枝杆菌HN878(*, $p < 0.05$)时,功效增加。

[0728] 得出的结论是,制剂在高于MIC的合适剂量下显示出对结核分枝杆菌HN878的体外抑制。

[0729] 还应当注意,在实施例6的试验中,制剂的制备方式影响着他们对结核分枝杆菌HN878的体外抗菌功效。

[0730] 通过比较制剂1的 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度在其FC和FD版本之间的功效来说明(图24A对比图24B)。温育后至少5天,FC版本的功效显著增加,而FD版本的功效在同一时间段内增加并不那么显著。这与 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度形成对比,在同一时期,FC和FD版本之间显示出非常相似且良好的功效。

[0731] 使用制剂2观察到不同的行为(图25A对比图25B)。在温育后的前2天, $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的FD版本的功效比FC版本增加更显著,然后没有变化,尽管在温育5天后,FD版本的功效良好并且FC版本的功效非常好。在 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的情况下,在温育后至少5天,FD版本的功效显著增加至良好功效,而FC版本的功效在同一时间段内增加并不那么显著。

[0732] 因此表明,至少在较高浓度下,加入水以达到最终抑菌制剂的阶段可以在初始抗菌作用和5天后细菌杀灭程度方面对制剂的抗菌作用产生实质性影响。通常而言,尽管并非普遍,最初将制剂制成浓缩的预混液,其中亚硝酸钠、多元醇和酸成分以他们所需的相对摩尔比例但比使用所需的浓度更高(例如至少3倍,例如比使用所需的浓度高至少5倍,例如比使用所需的浓度高约3至约80倍),然后才稀释浓缩物以获得供使用的制剂,在温育后0至5天期间产生更好的抗菌作用。

[0733] 实施例7

[0734] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对H1N1甲型流感病毒的细胞毒性和抗病毒活性

[0735] 分别对应于实施例6中的制剂30RESP001FC、其10倍稀释和100倍稀释的试验制剂表示为F1C1、F1C2和F1C3,与奥司他韦溶液(1 μ M)和病毒对照一起使用以获得比较细胞毒性以及甲型H1N1流感在MDCK细胞中24小时后的病毒杀伤效果。通过类似于实施例8的LDH细胞毒性测定,来测定细胞毒性。在MOI=0.002(●)和MOI=0.02(■)下,在一定范围的稀释度(横轴是亚硝酸盐摩尔浓度)下测定MDCK细胞中对H1N1甲型流感病毒的抗菌活性,细胞毒性以灰色显示,右侧的细胞毒性标度(在测定的亚硝酸盐浓度高达并包括0.015M时的细胞毒性 $\leq$ LDH对照的1%)。与奥司他韦(1 μ M)相比,在MOI=0.002和亚硝酸盐浓度0.15M、0.015M和0.0015M下获得板照片。结果如图28所示。倒数第二句中叙述的板顺序与图中从左到右的板顺序相同(有两个实验,每个相应实验的板显示为一个在另一个之上)。最右侧的一对板,紧邻奥司他韦板对的右侧,是病毒对照。细胞毒性显示在每对试验板下方,作为LDH对照的百分比(感染后24小时的3次LDH测定的平均值)。

[0736] 结果表明,在适当剂量的亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂下,可以完全根除病毒,并且明显优于奥司他韦。鼻病毒和呼吸道合胞病毒(RSV)已显示出类似的亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂的抗病毒活性。

[0737] 这些结果表明,根据本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂提供了对人和动物受试者的呼吸道病毒感染的治疗性和预防性治疗。

[0738] 实施例8

[0739] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对冠状病毒SARS-CoV-2的细胞毒性和抗病毒活性

[0740] 材料

[0741] 试验制剂F1(pH 5.8)

[0742] 通过下述方法,由储备溶液1.5M亚硝酸钠、pH为5.8的0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液、以及0.5M甘露醇溶液,制备六种试验浓度的制剂1(F2)(为亚硝酸钠、pH为5.8的柠檬酸以及甘露醇(一种多元醇)的水性溶液),得到以下试验组合物:

[0743] 制剂1(F1)

[0744]

试验剂	试验制剂中的 亚硝酸钠浓度 (M)	试验制剂中的 柠檬酸浓度 (M) pH 5.8	试验制剂中的 多元醇浓度 (M)
F1 试验浓度 1 (F1C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇
F1 试验浓度 2 (F1C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇
F1 试验浓度 3 (F1C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 甘露醇
F1 试验浓度 4 (F1C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 甘露醇
F1 试验浓度 5 (F1C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 甘露醇
F1 试验浓度 6 (F1C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇

[0745] 与F1一起使用的对照

[0746] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH为5.8的对照制剂。

[0747] 阴性对照是测定缓冲液+细胞。

[0748] 阳性对照是氯喹+细胞。

[0749] 试验制剂F2 (pH 5.4)

[0750] 通过下述方法,由储备溶液1.5M亚硝酸钠、pH为5.4的0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液、以及0.5M甘露醇溶液,制备六种试验浓度的制剂2 (F2) (为亚硝酸钠、pH为5.4的柠檬酸以及甘露醇(一种多元醇)的水性溶液),得到以下试验组合物:

[0751] 制剂2 (F2)

[0752]

试验剂	试验制剂中的 亚硝酸钠浓度 (M)	试验制剂中的 柠檬酸浓度 (M) pH 5.4	试验制剂中的 多元醇浓度 (M)
F2 试验浓度 1 (F2C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇
F2 试验浓度 2 (F2C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇
F2 试验浓度 3 (F2C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 甘露醇
F2 试验浓度 4 (F2C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 甘露醇
F2 试验浓度 5 (F2C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 甘露醇
F2 试验浓度 6 (F2C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露醇

[0753] 与F2一起使用的对照

[0754] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH为5.4的对照制剂。

[0755] 阴性对照是测定缓冲液+细胞。

[0756] 阳性对照是氯喹+细胞。

[0757] 化学试剂

[0758] 亚硝酸钠：

[0759] 等级：亚硝酸钠超纯Ph Eur, USP。亚硝酸钠CAS编号7632-00-0, EC编号231-555-9, 超纯Ph Eur, USP, 来自Sigma Aldrich, 产品代码1.065441000。

[0760] 柠檬酸：

[0761] 等级：无水柠檬酸粉末EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JP, USP, E 330, FCC, 来自Sigma Aldrich, 产品代码1.002425000。

[0762] D-甘露醇：

[0763] 等级：符合EP、FCC、USP试验规范的D-甘露醇, 来自Sigma Aldrich, 产品代码M8429-100G。

[0764] 磷酸氯喹：

[0765] 等级:药品二级标准,来自Sigma Aldrich,产品代码PHR1258-1G。

[0766] 储备溶液的制备

[0767] 为了制备柠檬酸溶液,将90ml蒸馏水加入到19.2g柠檬酸中,然后加入10ml 3M氢氧化钠,然后用蒸馏水稀释以调节pH(对于pH 5.4为160ml,或对于pH 5.8为190ml)。在一种可替代方法中,将20ml蒸馏水加入到19.2g柠檬酸中,然后加入1.2g固体氢氧化钠,然后用10M氢氧化钠和蒸馏水来调节pH值直至100ml。使用0.22 μ m过滤器通过注射器过滤对溶液进行灭菌。

[0768] 为了制备1.0M亚硝酸钠溶液,将100mL蒸馏水加入到6.9g亚硝酸钠中。为了制备1.5M亚硝酸钠溶液,将100mL蒸馏水加入到10.35g亚硝酸钠中。

[0769] 指定时,加入9.1g甘露醇,使其浓度为0.5M。使用0.22 μ m过滤器通过注射器过滤对溶液进行灭菌。

[0770] 制剂的制备

[0771] 在与亚硝酸盐和甘露醇溶液混合之前,将缓冲柠檬酸溶液的pH值控制到所需值。制剂规定的pH值是在与亚硝酸盐和甘露醇溶液混合之前配制的缓冲柠檬酸溶液的pH值。

[0772] 配制制剂的一种合适方法如下:将含有0.5M甘露醇的亚硝酸钠(1.5M)加入混合容器中,然后立即加入1:1混合(亚硝酸盐+多元醇:柠檬酸)的pH控制的柠檬酸溶液)。通过轻轻倒转混合溶液。混合后,将混合物在密封容器(例如50ml离心管)中在环境温度下保持5分钟。然后将含有0.75M亚硝酸盐、0.25M甘露醇和柠檬酸的所得溶液在测定缓冲液(浓缩1.2倍)中稀释5倍,得到在测定中亚硝酸盐0.15M、0.05M甘露醇和例如0.1M柠檬酸的最终试验浓度。用蒸馏水和/或测定缓冲介质制成1:1混合物的连续稀释(例如:作为亚硝酸盐0.75M、甘露醇0.25M、柠檬酸0.5M开始的混合物)。所有制剂浓度均可在环境温度下储存。每一轮都会制作新鲜溶液。

[0773] 附加的对照

[0774] 作为附加的对照,使用已知适合其目的的一系列浓度的S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(SNAP),并表示为SNAP50、SNAP100、SNAP200、SNAP300和SNAP400。SNAP是一种已知的NO供体,在这些试验中用作阳性NO供体对照,以验证NO在体外没有细胞毒性。为了控制对SNAP分子的N-乙酰青霉胺(NAP)部分的测定的任何潜在影响,相应浓度的NAP用作NO空白对照并表示为NAP50、NAP100、NAP200、NAP300和NAP400。

[0775] 病毒

[0776] SARS-CoV-2临床分离株。

[0777] 细胞系

[0778] Vero E6。

[0779] 测定

[0780] LDH测定(细胞毒性):

[0781] CyQUANTTM LDH细胞毒性检测试剂盒,Invitrogen;货号C20300和C20301。使用细胞病变效应(CPE)评分作为读数来确定(病毒滴定)组织培养感染剂量(TCID50)。

[0782] 在加入亚硝酸盐/对照后2小时和24小时,在Vero E6细胞上检测了亚硝酸盐制剂(所有浓度)、pH 5.8或pH 5.4柠檬酸盐对照、阴性对照和阳性对照(氯喹,如Keyaerts, E, Biochem Biophys Res Commun, 323, 264-268 (2004)所述,其内容在此引入作为参考)。LDH

释放被测定为在2小时和24小时时间点的读数。每一轮对每种化合物/制剂检测3次。

[0783] SARS-CoV-2抑制:

[0784] 在时间0小时,在制剂或对照存在的情况下,用病毒感染Vero E6细胞,并温育1小时。在此温育期后,移除接种物并洗涤细胞。然后将新鲜制剂或对照加入洗涤过的细胞中。在感染后24小时,收集并滴定Vero E6细胞上清液,在读数前将病毒滴定液温育6天,以确定任何病毒产量的降低。在包括3.0和0.3在内的四个MOI下进行了分开的试验,尽管仅滴定了这两个MOI。读数通过结晶紫(细胞单层)染色,然后是CPE评分。

[0785] 结果

[0786] 结果如图32至图34所示。

[0787] 图32示出了LDH细胞毒性测定的结果(第1轮和第2轮的组合图,分别使用试验制剂1和2)。数据表示为两个实验的平均值+标准偏差(SD)。SD显示为灰色误差条。最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设置为100%,所有样品结果均与此值相关。LDH阳性对照是试剂盒的阳性对照。黑色条(2小时温育)是每种情况下每对条的左侧条,红色条(24小时温育)是每种情况下每对条的右侧条。

[0788] 图33示出了在MOI 3.0下第1轮的针对SARS-CoV-2的抗病毒试验结果。在第1轮中,使用SARS-CoV-2在四种感染复制数(MOI)下进行了一项病毒产量降低测定,并使用接种病毒的反滴定进行了确认。对于以3MOI接种的细胞,滴定后在病毒对照中发现 $2.11 \log_{10}$ TCID₅₀/ml。在一些试验条件下,可能会观察到SARS-CoV-2产量减少。温育24小时后,在最低的三个MOI(即0.3、0.03和0.003)中几乎没有检测到任何病毒。可能,在Vero E6细胞上复制24小时不足以获得高水平的子代病毒。数据表示为两次滴定的平均值+标准偏差(SD)。SD显示为误差条。具有氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值的水平虚线水平是该测定的检测限(LOD)。

[0789] 图34示出了第2轮(a)在MOI 3.0和(b)在MOI 0.3时针对SARS-CoV-2的抗病毒试验结果。该方法对应于这些MOI的第1轮的各部分,不同之处在于制剂是第2轮制剂(不同浓度的试验制剂2)并且温育进行48小时而不是24小时,以增加子代病毒的水平。数据表示为两次滴定的平均值+标准偏差(SD)。SD显示为误差条。具有氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值的水平虚线水平是该测定的检测限(LOD)。

[0790] 讨论

[0791] 生成NO的水性制剂在LDH测定中没有细胞毒性(图32)。特别是在较高浓度的亚硝酸盐、酸和多元醇下,针对SARS-Cov-2的体外抗病毒作用令人印象深刻,可与氯喹相媲美(图33和图34)。

[0792] 生成NO的水性制剂在惊人的高pH值下是有效的。检测了pH 5.4和5.8,但将pH降低至5.2或甚至更低也有望具有功效。

[0793] 此外,数据显示,有机羧酸(诸如缓冲至pH 5.4或5.8的柠檬酸)在没有用于生成NO的制剂的情况下,对SARS-CoV-2具有惊人的低细胞毒性和高体外抗病毒作用(图32至图34;“柠檬酸pH 5.8”和“柠檬酸pH 5.4”条)。羧酸制剂的相对高的pH使得此类制剂作为肺内活性剂具有吸引力,因为他们预计对气道和肺组织表面无毒。由于SARS-Cov-2与SARS-Cov属于同一冠状病毒家族,并且病毒之间存在相似之处,因此可以合理地预测,此类有机羧酸对SARS-CoV病毒也将显示出相应的功效,冠状病毒是有据可查的2002年和2003年爆发的严重

急性呼吸系统综合症 (SARS) 的原因。

[0794] 实施例9

[0795] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对冠状病毒SARS-CoV的抗病毒活性

[0796] 为了研究本发明提供的抗SARS-CoV-2的抗病毒活性与本发明提供的抗SARS-CoV的抗病毒活性之间的相似性,进行以下实验。

[0797] 在MOI 3.0下检测了制剂F1C1、F1C2、F1C3和F1C4对SARS-CoV的抗病毒活性。该方法类似于实施例8中描述的抗病毒试验。在用结晶紫对细胞单层染色之前,用显微镜检查2个板并对细胞病变效应 (CPE) 进行评分。发现在这些板中存在CPE,其形式为下层单层顶部的细胞碎片。

[0798] 用显微镜检查的两个板的结果显示在图35中。数据是每个条件的单次滴定。对于剩余的板,由于细胞单层太密,在结晶紫染色后无法对CPE进行评分。具有细胞对照log10 TCID50/ml值的水平虚线水平是测定的检测限 (LOD)。

[0799] 如图35所示,至少制剂F1C1和F1C2对SARS-CoV具有良好的体外抗病毒活性。

[0800] 实施例10

[0801] 人用吸入剂

[0802] 使用根据本发明的液体组合物的人用吸入剂的实施方案示意性地显示在图30和图31中。

[0803] 吸入剂适当地由压缩气体提供动力,并且被配置为响应于吸入剂的一次手动启动以通常常规的方式从吸入剂中的储液器输送一剂亚硝酸盐/酸/多元醇制剂的夹带液滴。受试者通常在启动吸入剂的同时吸气,正如哮喘患者在使用吸入剂时通常所做的那样。如图30所示,每剂约3分钟的治疗时间应当是合适的,使用合适剂量的活性组合物产生至多约2小时的作用持续时间。

[0804] 空气中的飞沫进入受试者受感染的肺部,在那里他们接触受感染(例如病毒感染)的肺膜。图31在右侧示出了本发明将生成一氧化氮(NO)的组合物水溶液(“一氧化氮水溶液”)的多个液滴沉积在肺内膜上的效果。图31在左侧示出了如果受试者吸入气态一氧化氮(“吸入的一氧化氮”)——而非生成一氧化氮(NO)的组合物水溶液——的相应效果。

[0805] 如图所示,如果使用吸入一氧化氮,功效可能会大大降低。不仅一部分吸入的一氧化氮在通过肺膜进入血流之前被受试者呼出,而且另一部分吸入的一氧化氮被吸入空气中的氧气氧化成有毒的二氧化氮(NO₂)。除了消耗用于治疗受试者的气态一氧化氮的可用性之外,二氧化氮对受试者的肺有不利影响。

[0806] 因此,通过使用根据本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂,实现了将一氧化氮更高效且有效地输送到患者的肺并经由肺进入患者的血流中。

[0807] 结论

[0808] 前述内容广泛地描述了本发明而不对其进行限制。对本领域技术人员而言,显而易见的变化和修改旨在包括在所附权利要求的范围内。如果授予发明专利的任何特定司法管辖区的法律规定实施本专利以防止未经授权使用与所附权利要求等效的技术,则所有者意图本专利覆盖此类等效技术。

[0809] 在适用法律允许的范围内,所附权利要求保护范围的等效物也包括在权利要求中。例如,通常而言,本文所述的NO_x生成反应的组分或部分组分的混合顺序并不重要,只要

NO_x生成反应没有过早引发即可。旨在覆盖本发明的任何组合、试剂盒或组合物的必需和非必需组分的任何混合顺序。与一种或多种组分以不同体积或浓度以固体形式或液体形式使用的情况相比,如果一种或多种成分以液体形式使用,例如作为溶液,则该组分或那些组分的混合物对反应混合物或反应混合物的任何组分部分中的溶质(包括但不限于该组分或那些组分)浓度的影响可能不同。使用组分的所有等效浓度和/或物理形式(固体、液体、溶液)来形成本发明的组合、试剂盒和组合物,以及制备所述组合、试剂盒和组合物的所有等效步骤和步骤顺序,即使未在此处描述或特别声明,在适用法律允许的范围内也处于本权利要求的范围内。

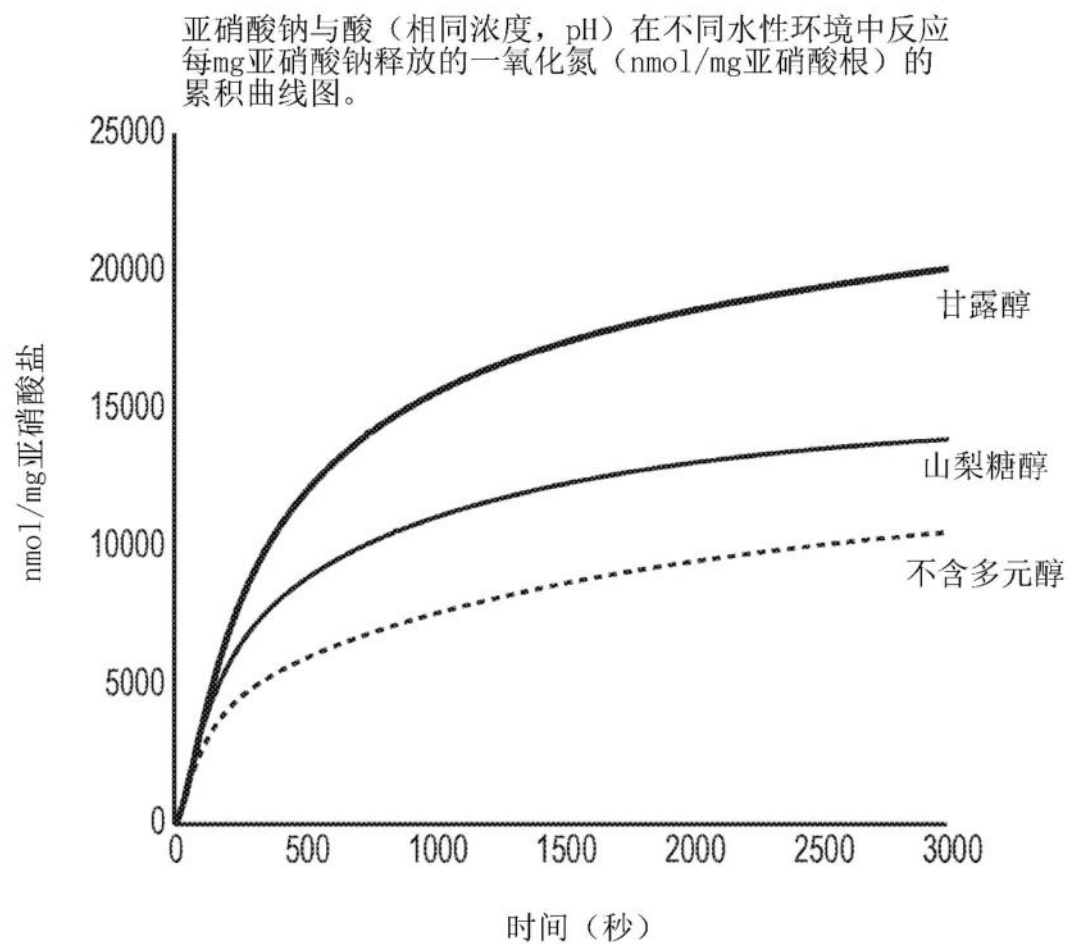


图1

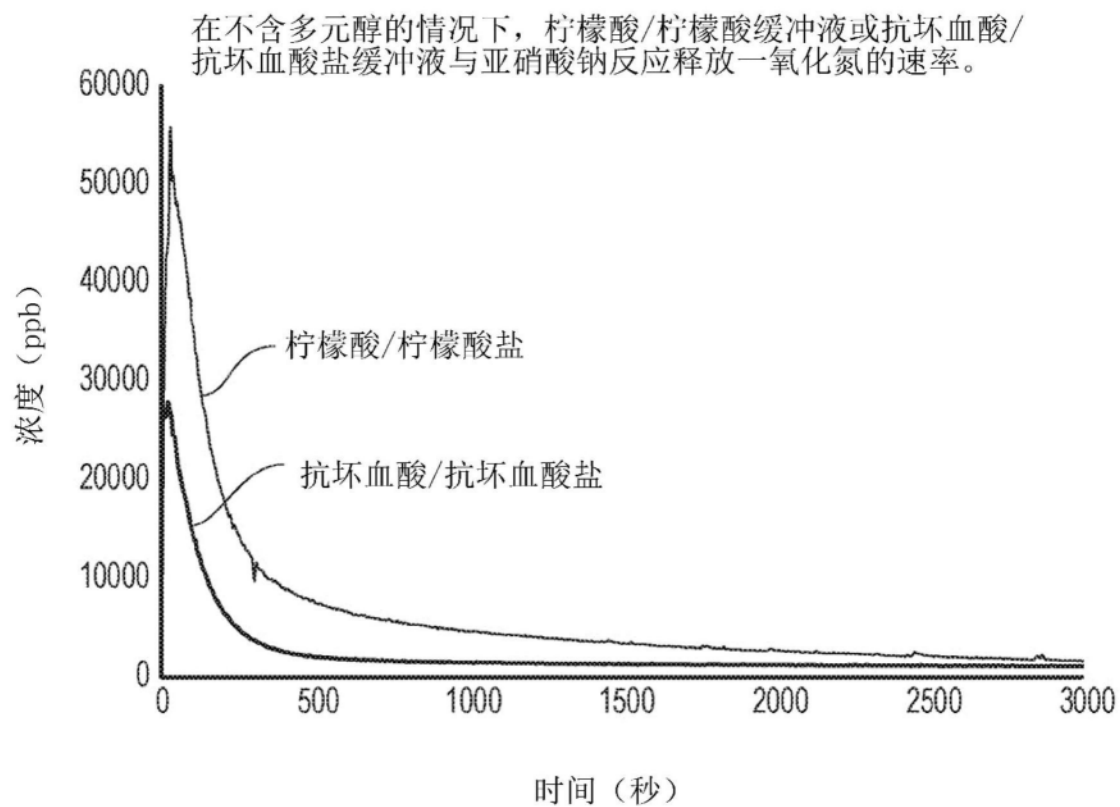


图2

在多元醇存在下，柠檬酸与亚硝酸钠反应释放一氧化氮的速率。

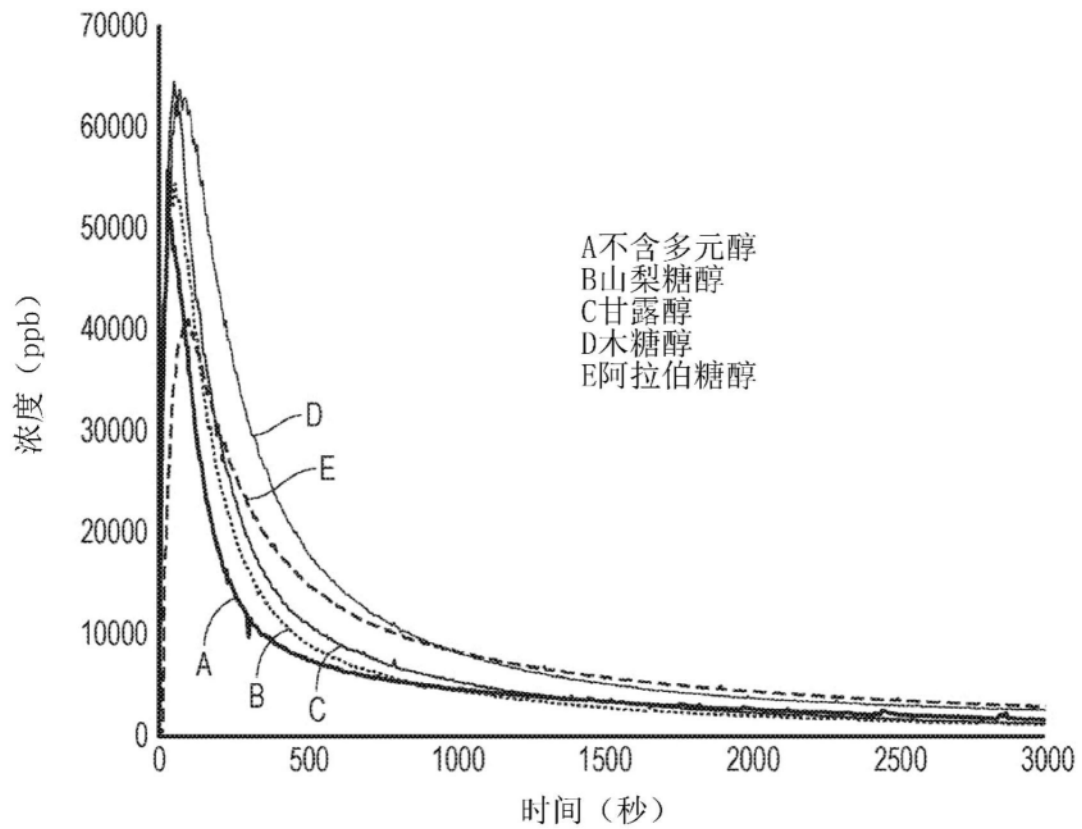


图3

在多元醇 (1 M) 存在下, 抗坏血酸与亚硝酸钠反应释放一氧化氮的速率。

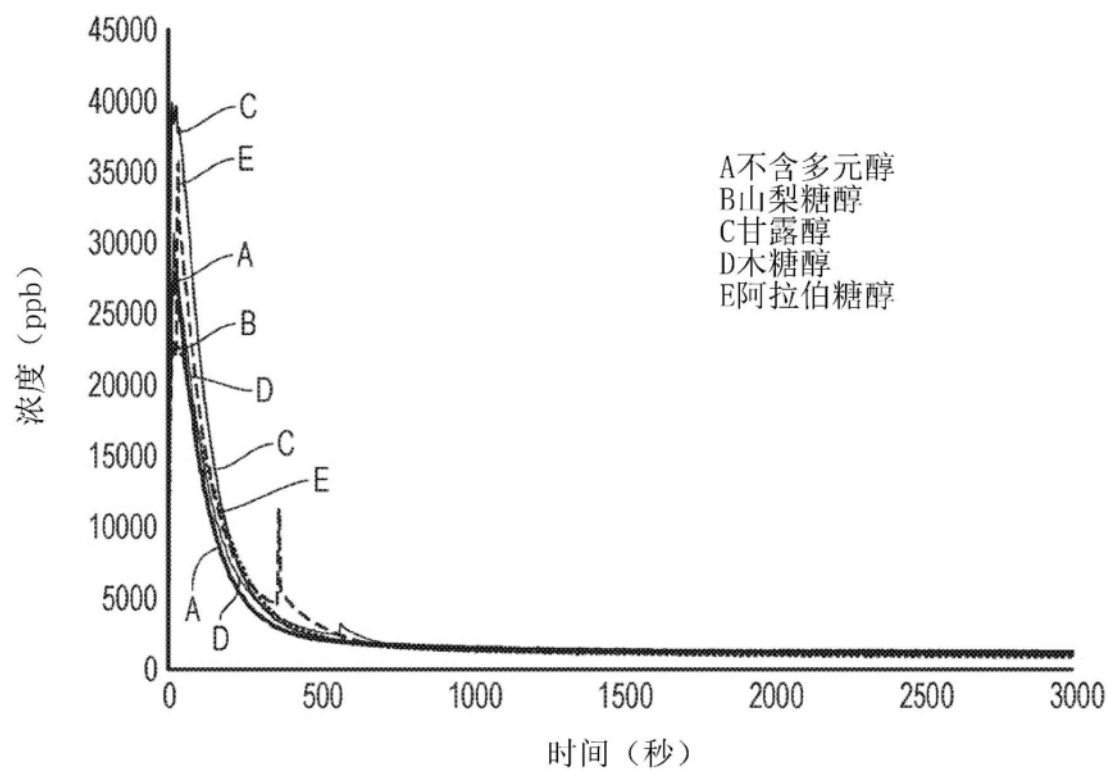


图4

在多元醇 (0.5 M) 存在下, 柠檬酸与亚硝酸钠
反应释放一氧化氮的速率。

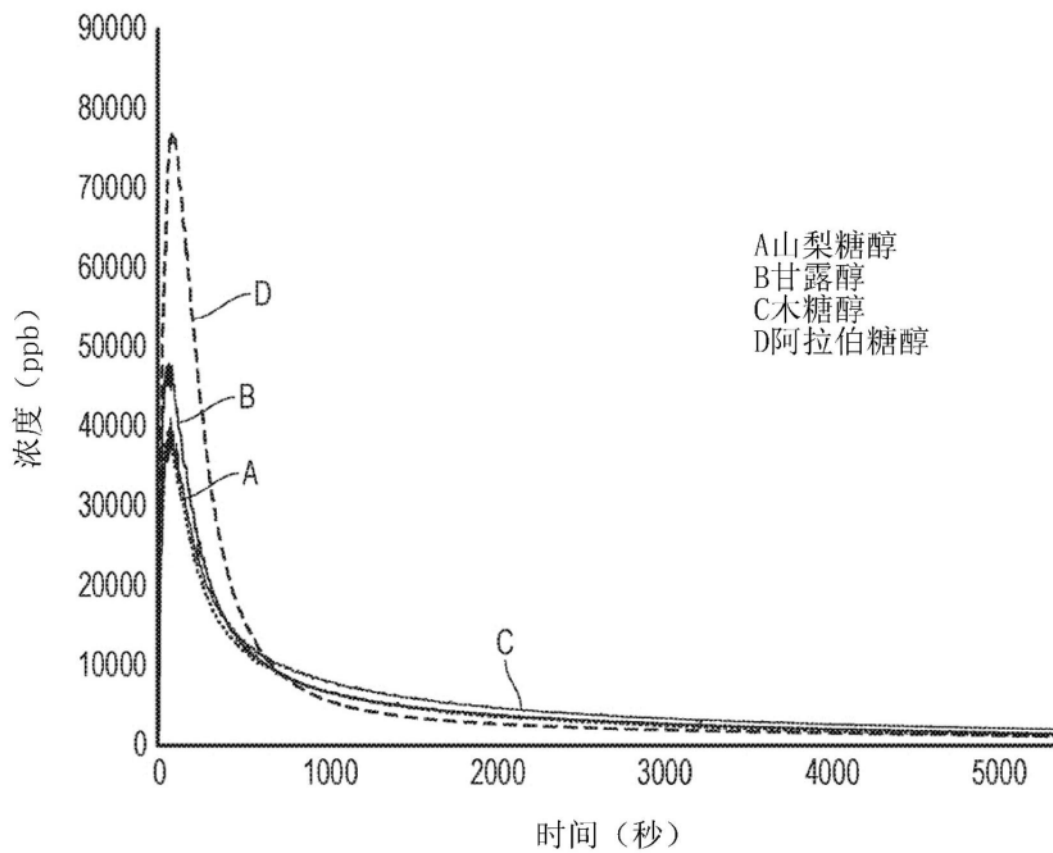


图5

在多元醇 (0.5 M) 存在下, 抗坏血酸与亚硝酸钠反应释放一氧化氮的速率。

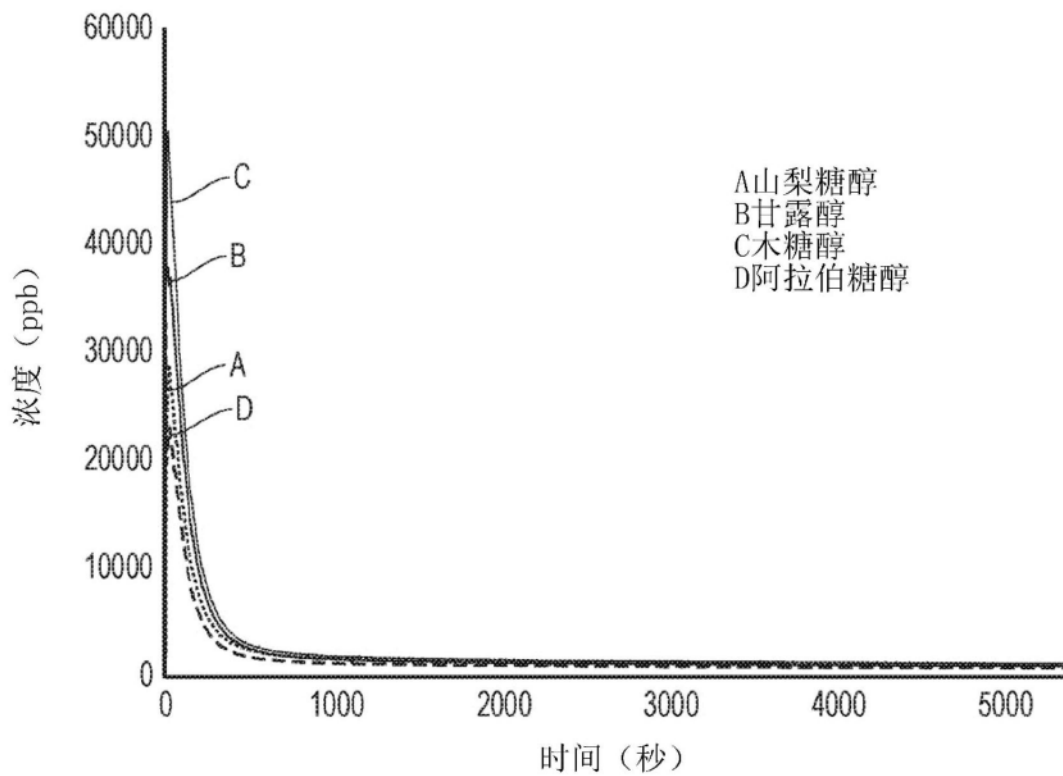


图6

在多元醇存在下，柠檬酸或抗坏血酸与亚硝酸钠反应释放一氧化氮的速率。

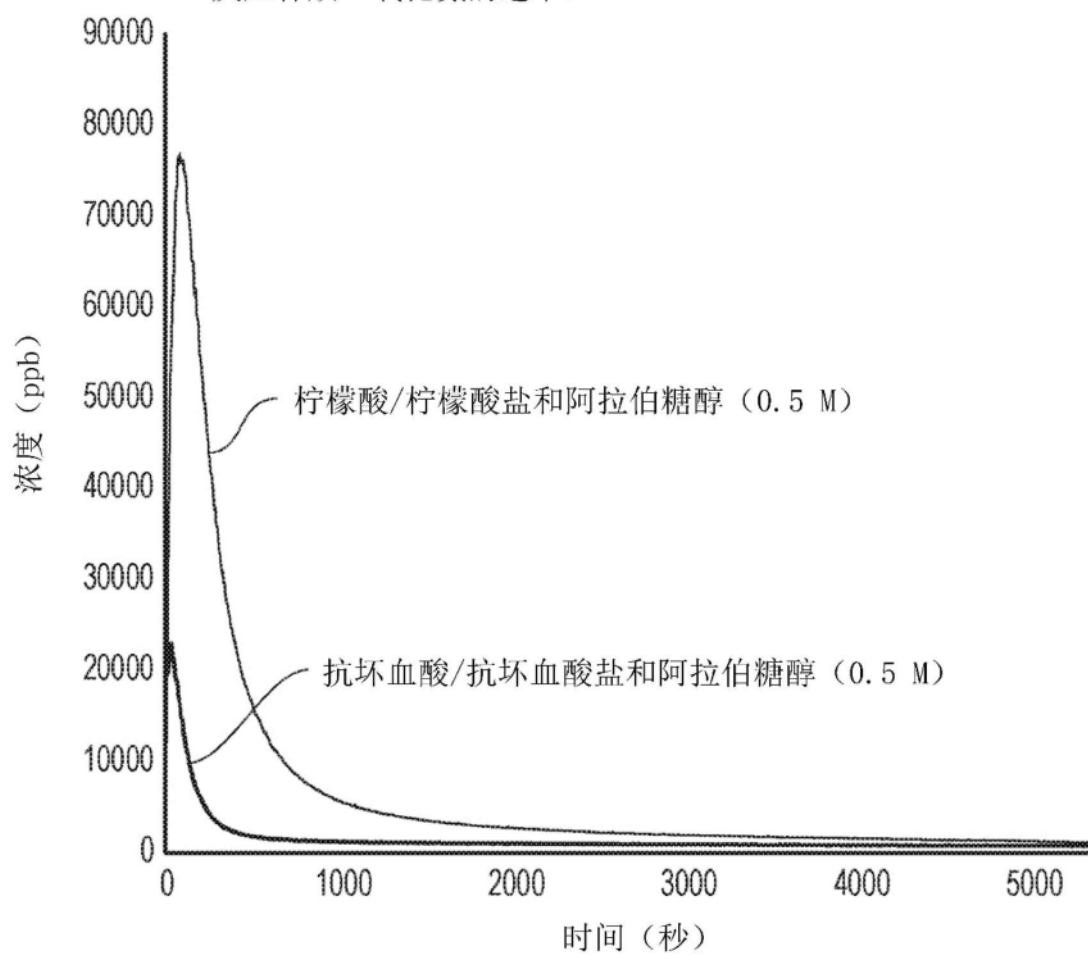


图7

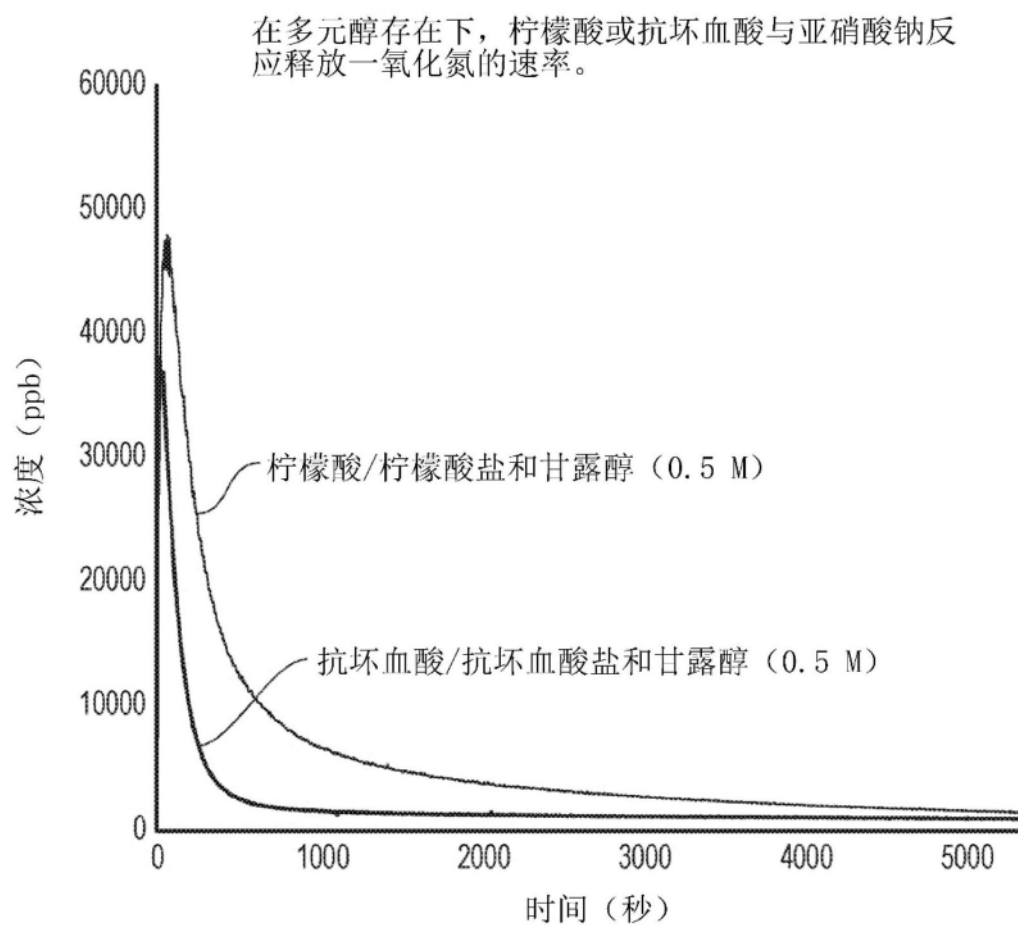
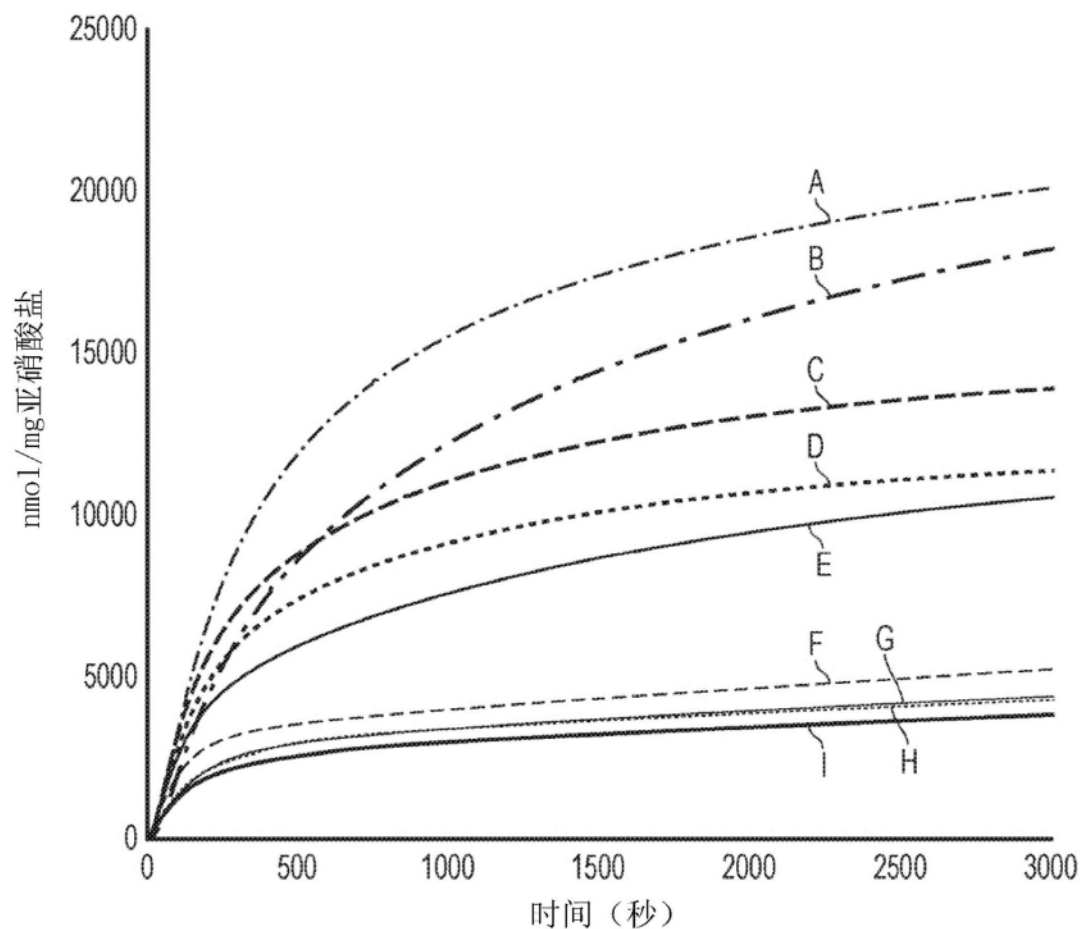


图8

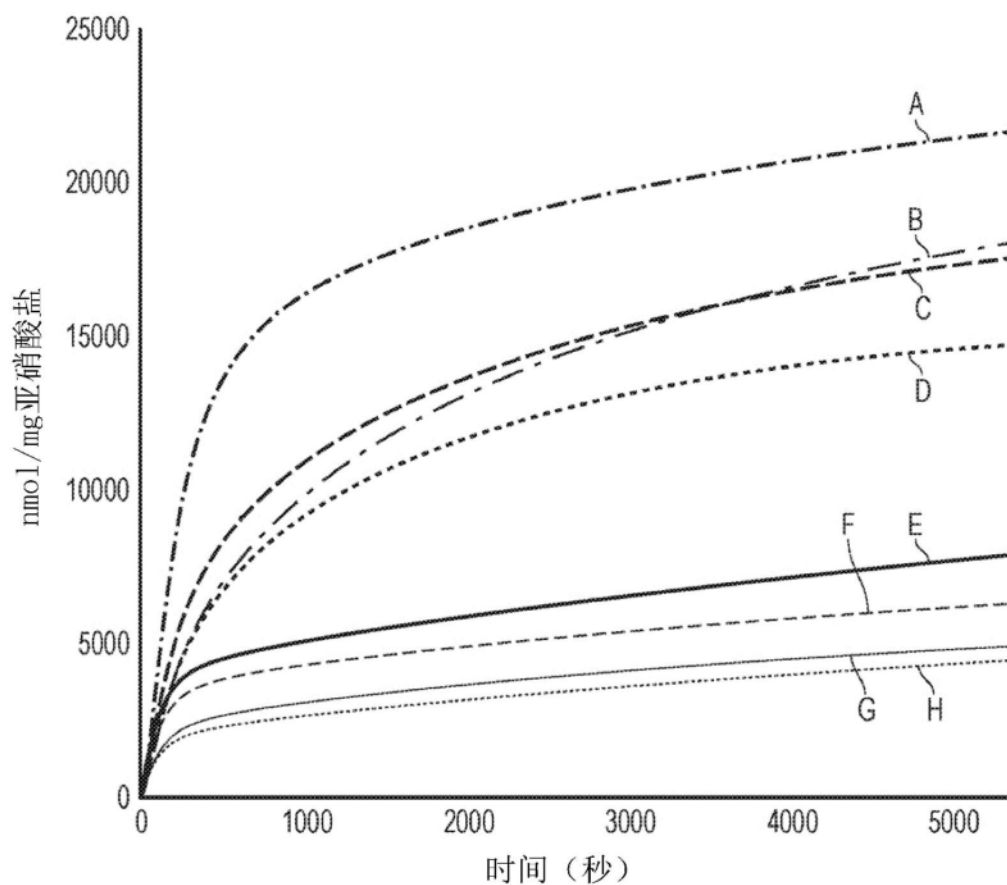
在多元醇 (1.0 M) 存在下, 亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗坏血酸盐反应每mg亚硝酸钠释放的一氧化氮的累积曲线图。



- A含木糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
 B含阿拉伯糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
 C含甘露醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
 D含山梨糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
 E不含多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
 F含甘露醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
 G含山梨糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
 H含阿拉伯糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
 I含木糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液

图9

在多元醇存在下，亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗坏血酸盐反应释放的一氧化氮的累积曲线图。



- A含0.5 M阿拉伯糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- B含0.5 M木糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- C含0.5 M甘露醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- D含0.5 M山梨糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- E含0.5 M木糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- F含0.5 M甘露醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- G含0.5 M山梨糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- H含0.5 M阿拉伯糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液

图10

在存在和不存在甘露醇的情况下，亚硝酸钠与柠檬酸（pH 3）反应释放的一氧化氮（nmol NO/mg亚硝酸钠）的累积曲线图

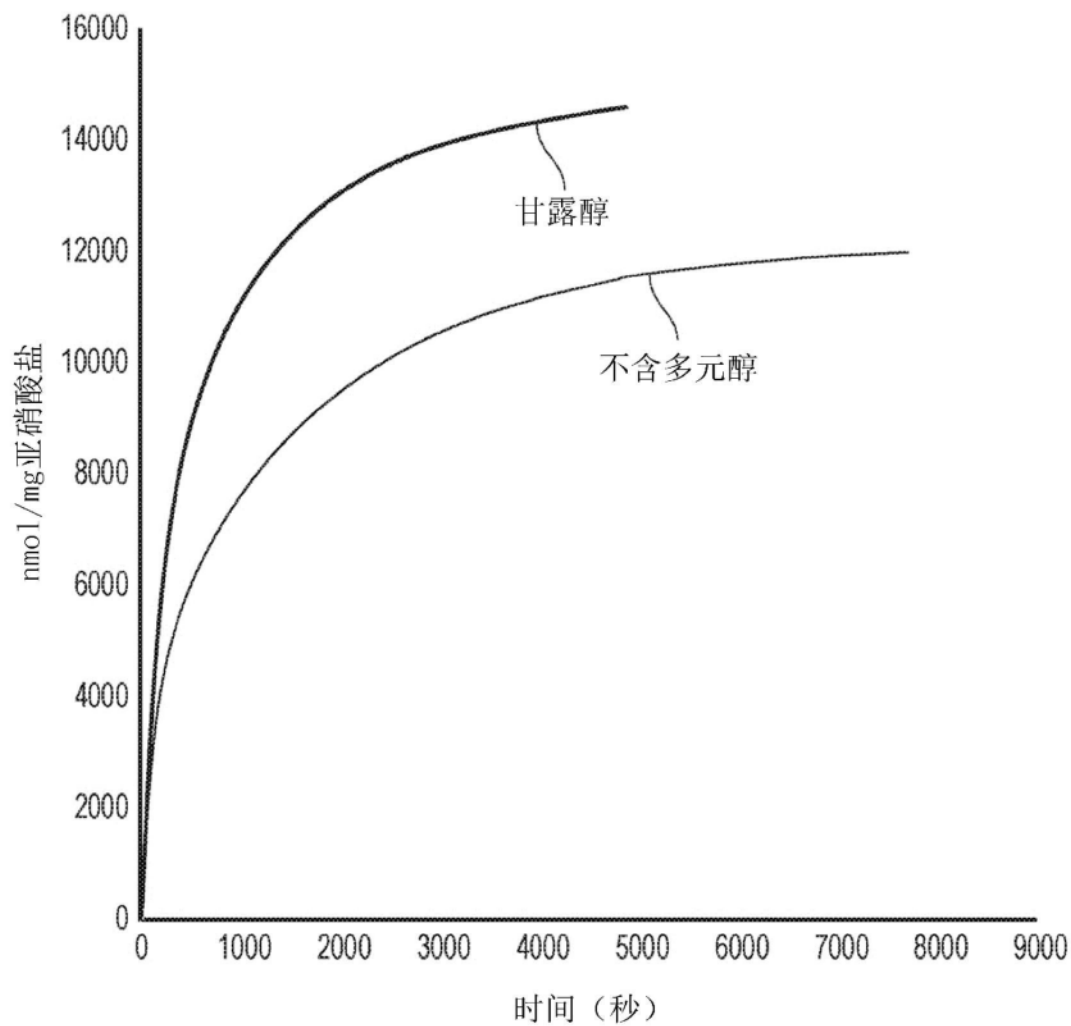


图11

pH 4.8时一氧化氮释放的累积曲线图

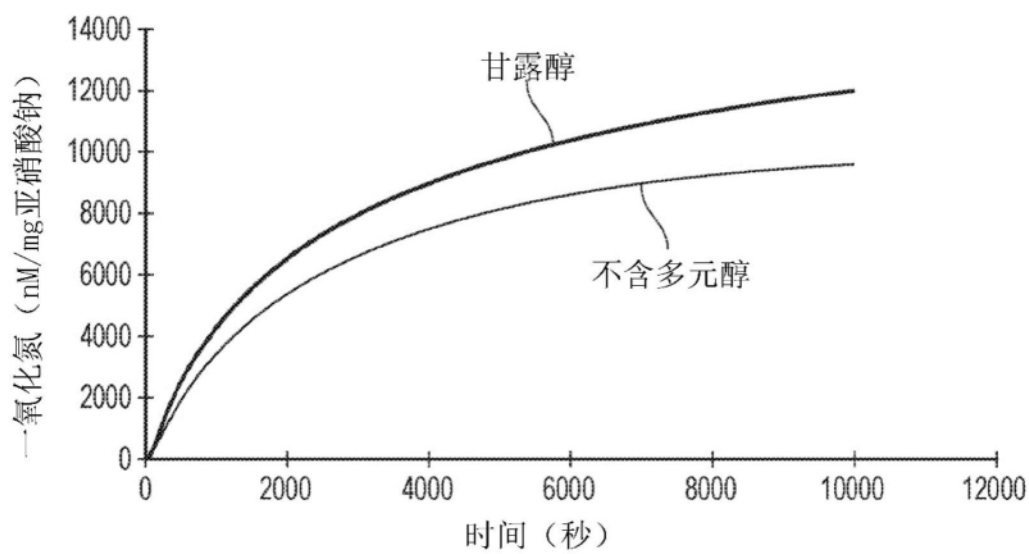


图12

pH 6.2时一氧化氮释放的累积曲线图

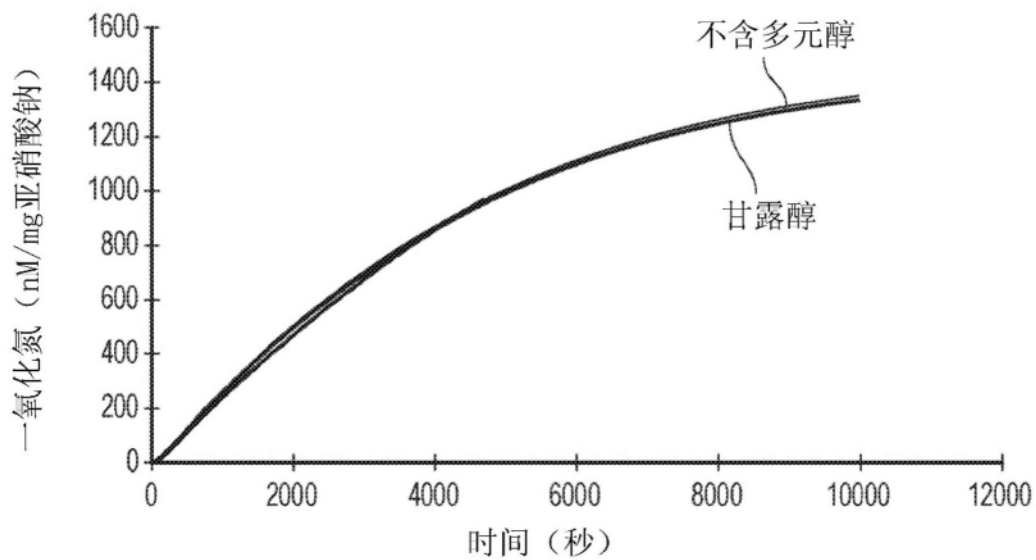


图13

在每 cm^2 网中存在多元醇的情况下，亚硝酸钠与柠檬酸反应释放的一氧化氮的累积曲线图。

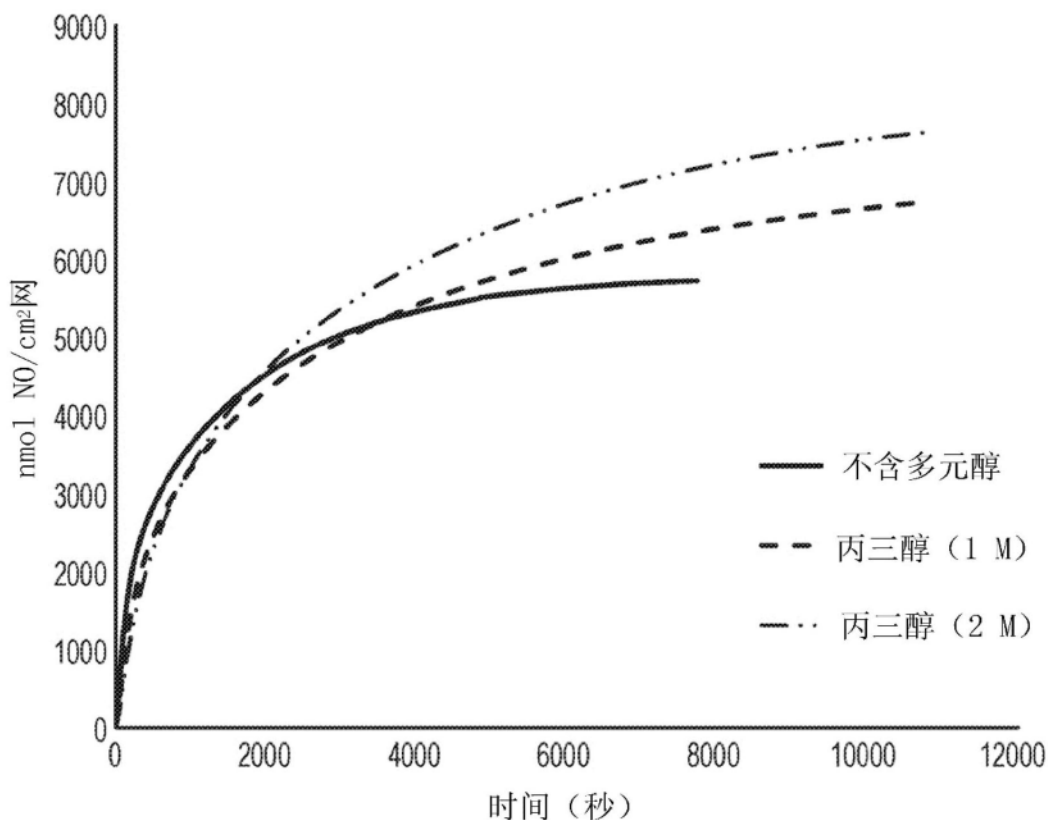


图14

在每 cm^2 网中存在多元醇的情况下，亚硝酸钠与柠檬酸反应释放的一氧化氮的累积曲线图。

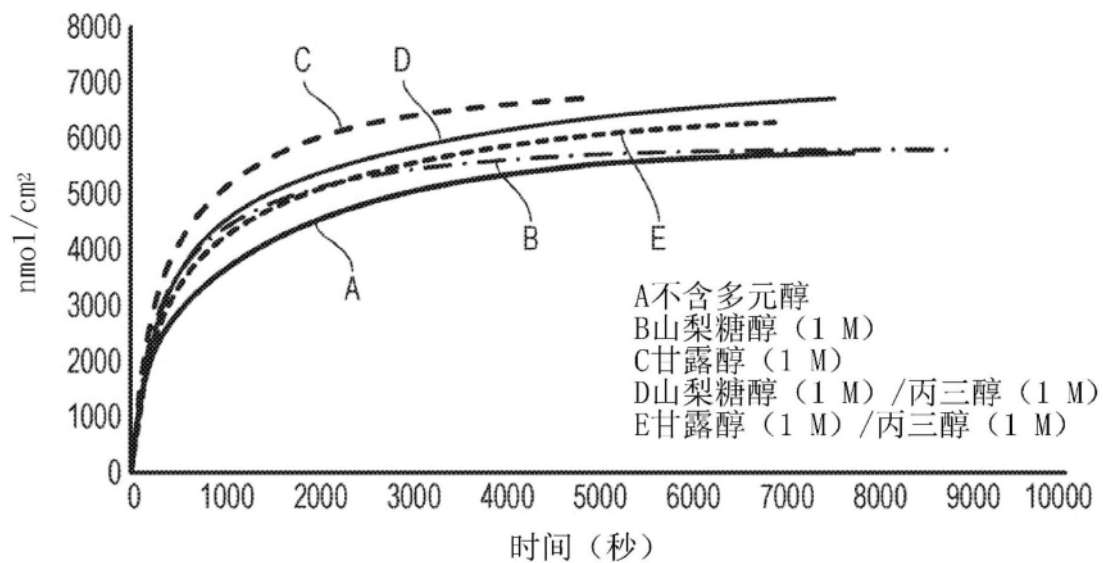


图15

每mg亚硝酸盐释放的一氧化氮 (nmol) 的平均 (n=3) 累积曲线图,
柠檬酸/柠檬酸盐 pH 5.8

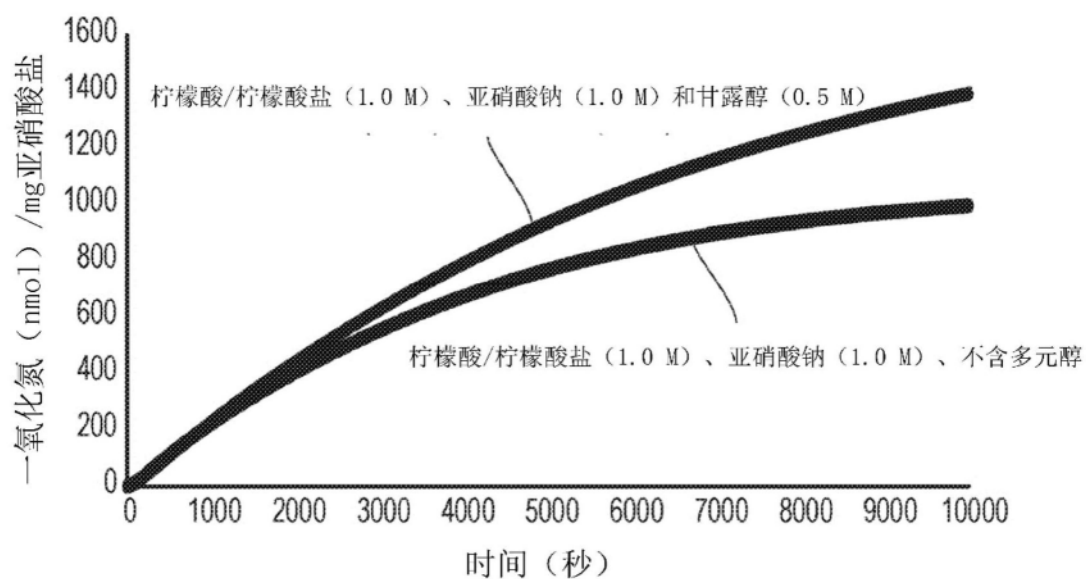


图16

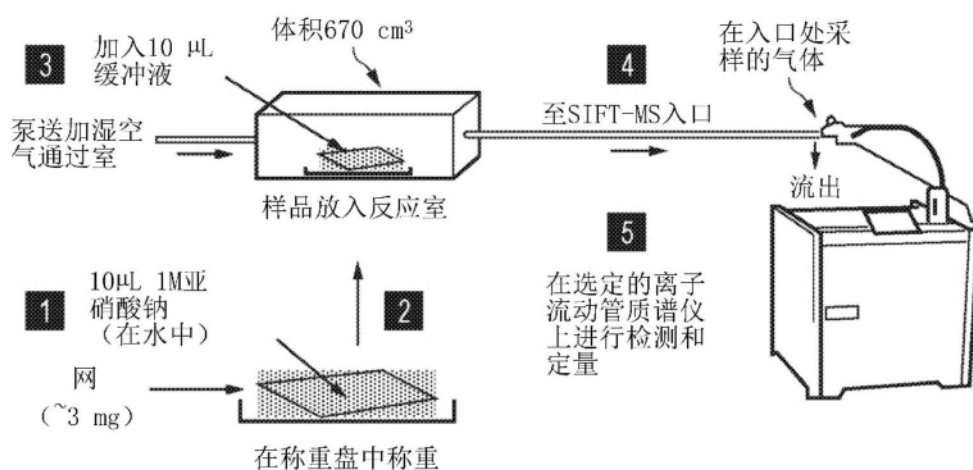


图17

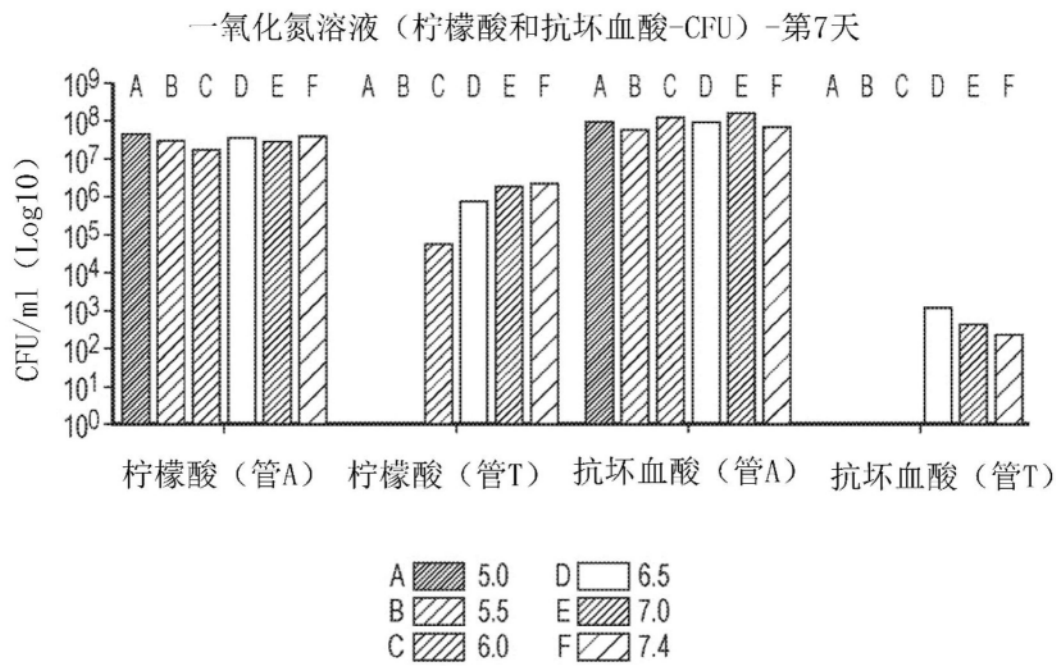


图18

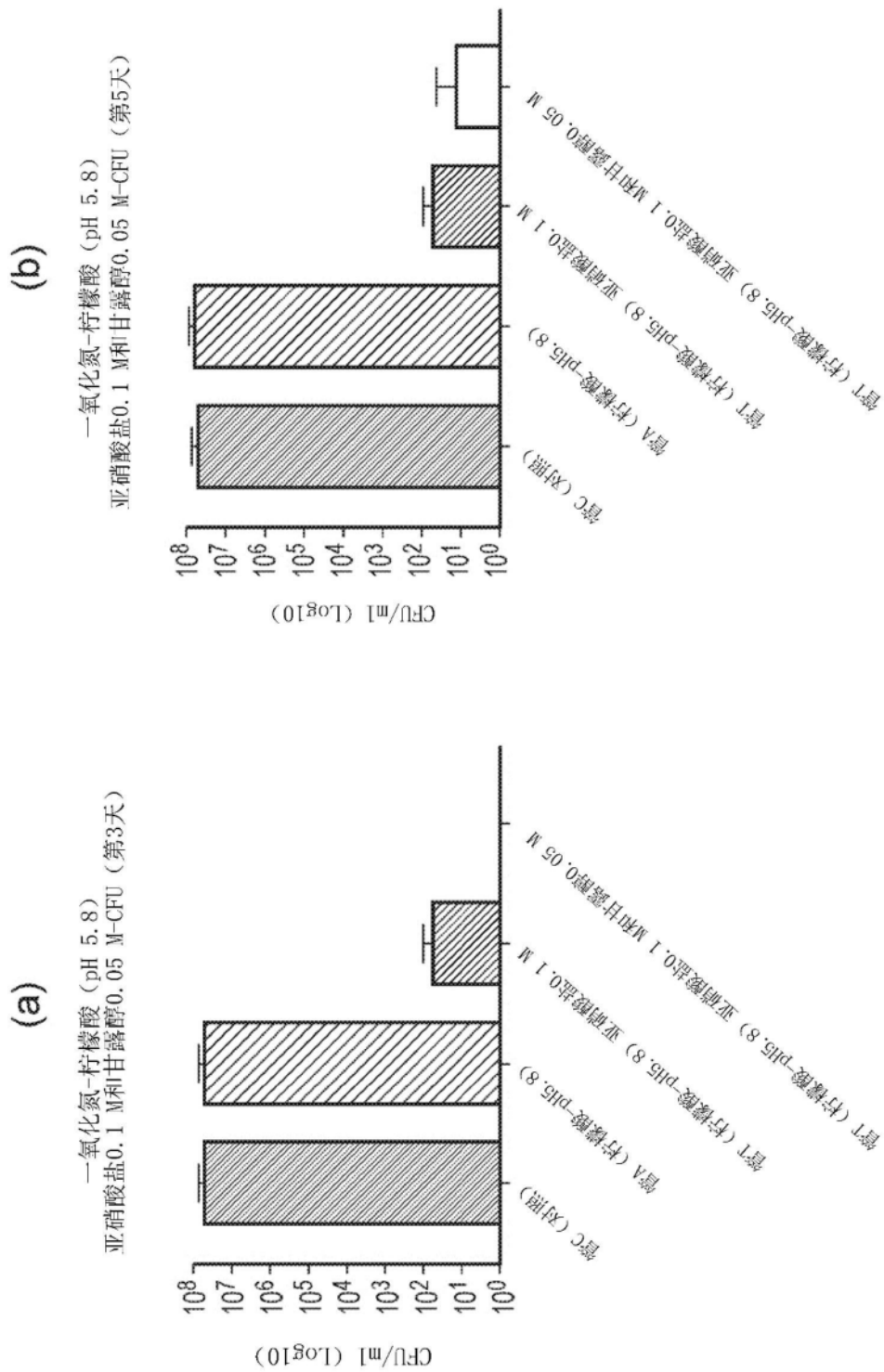


图19

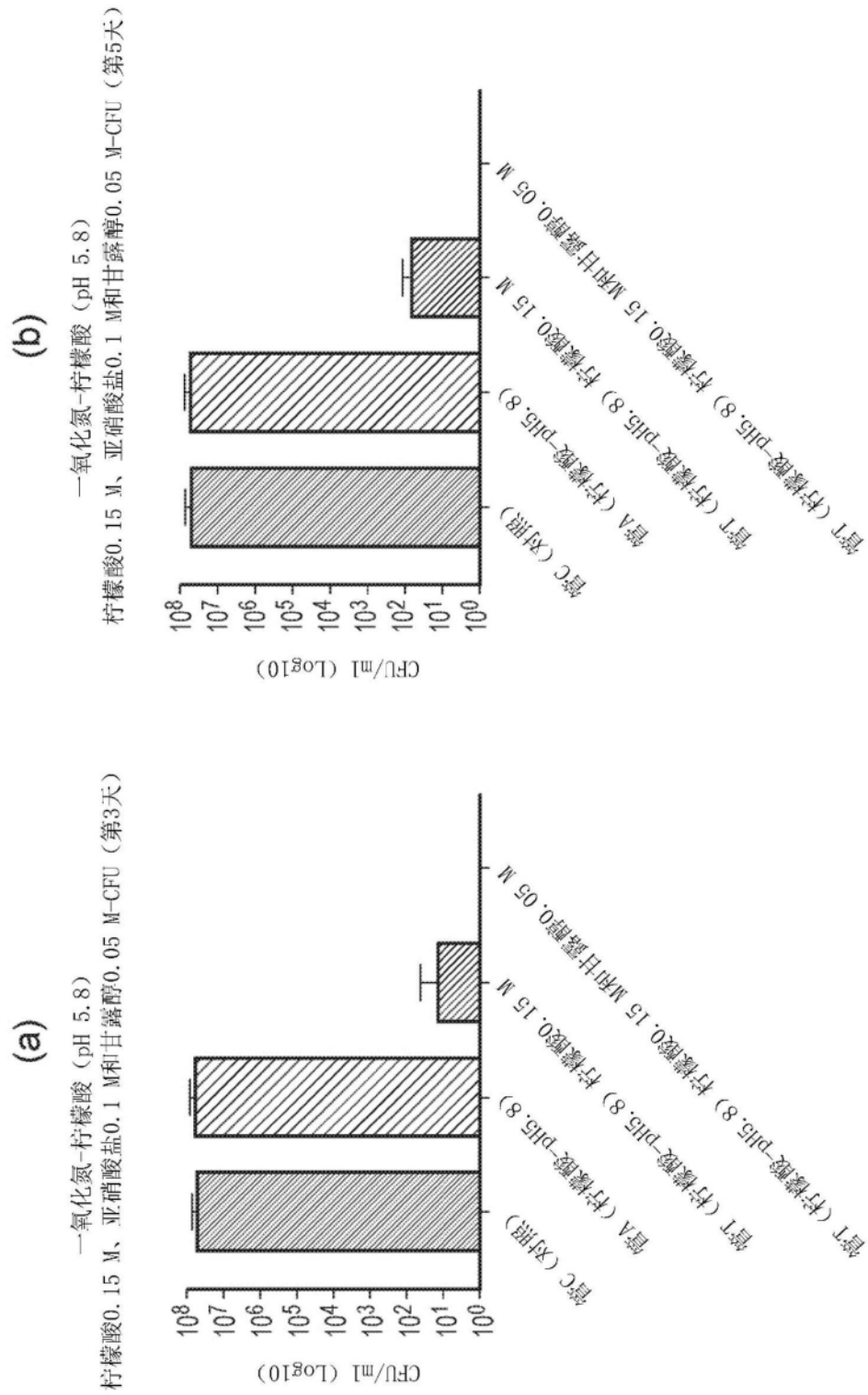


图20

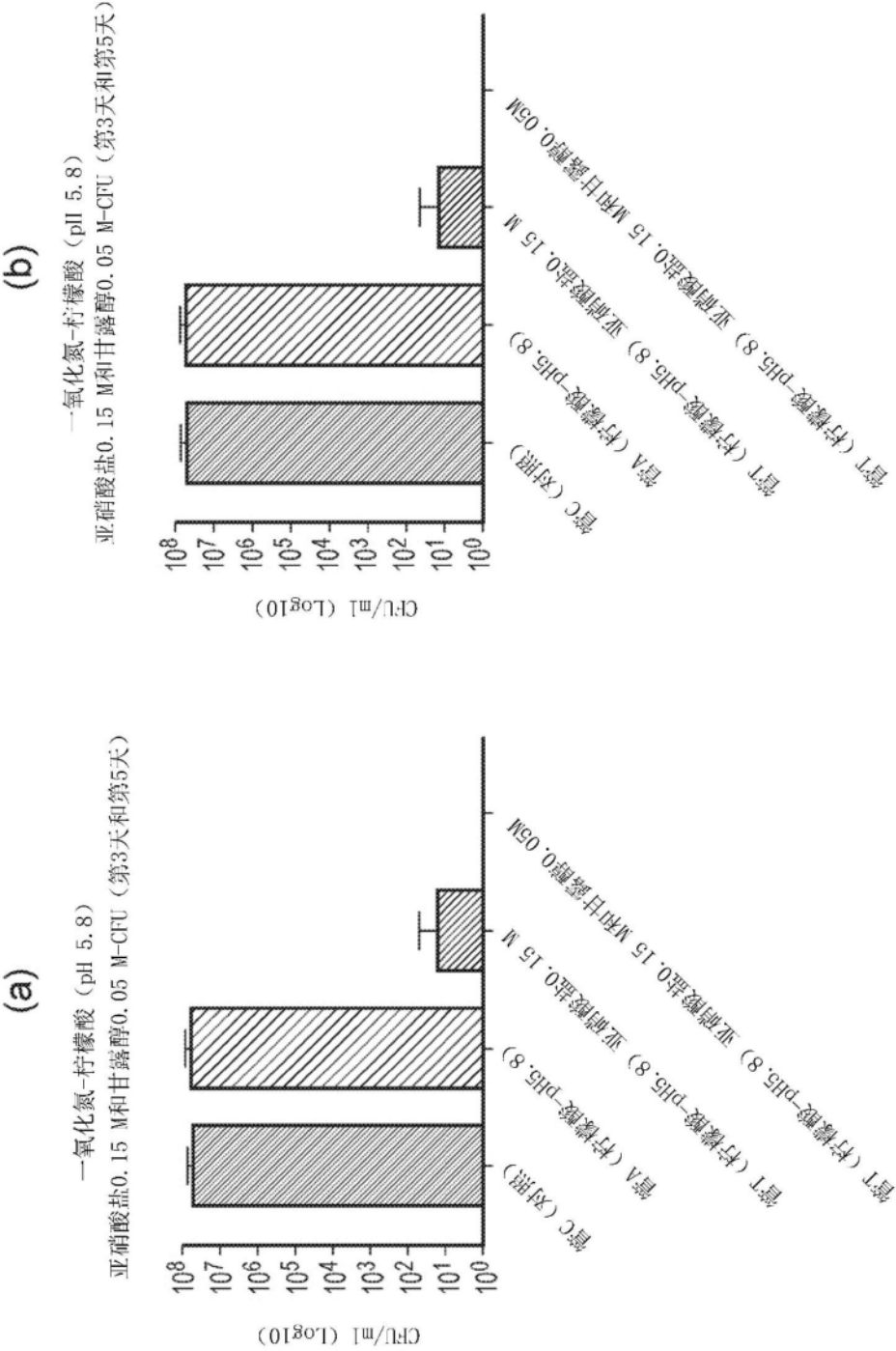


图21

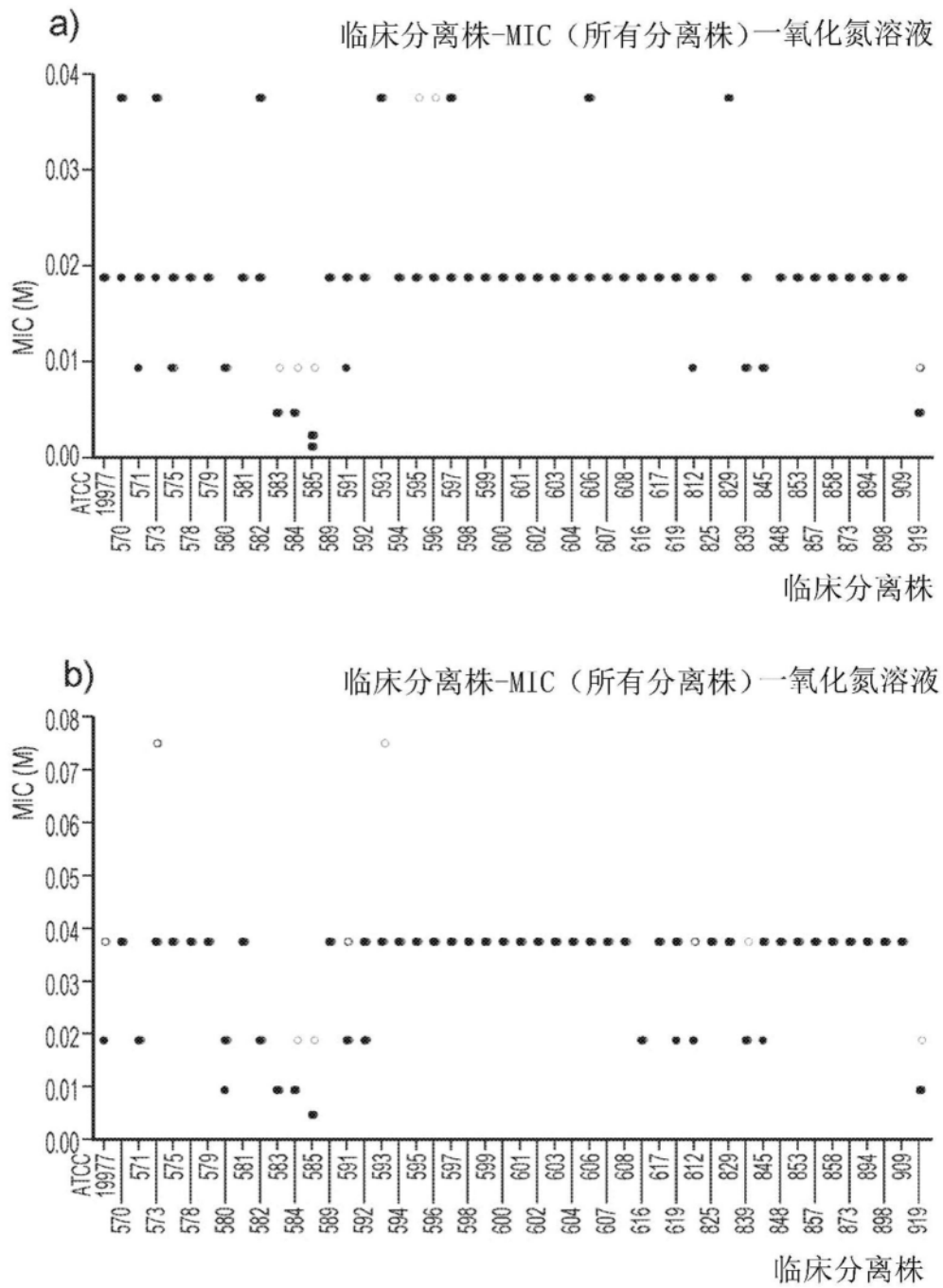
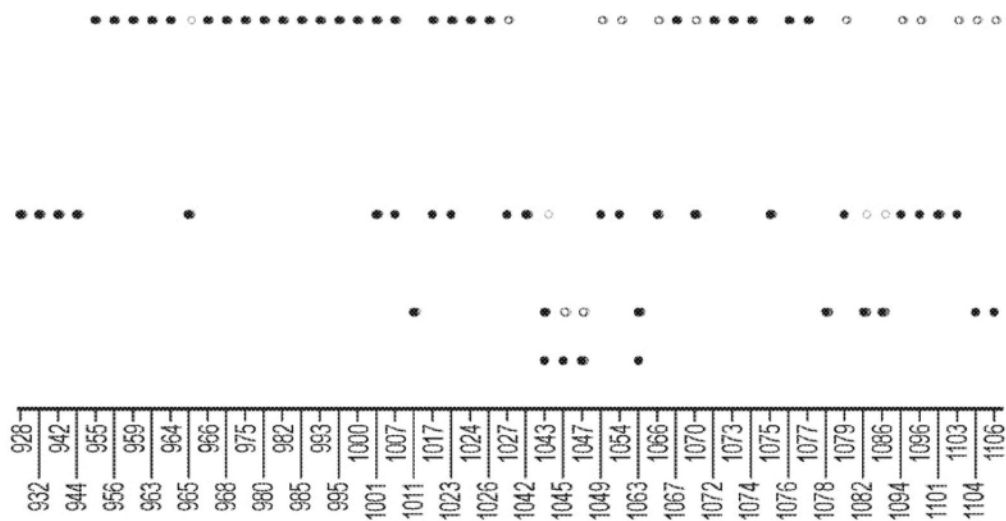


图22

-柠檬酸0.1M、亚硝酸盐0.15M和甘露醇0.05M



-柠檬酸0.15M、亚硝酸盐0.1M和甘露醇0.05M

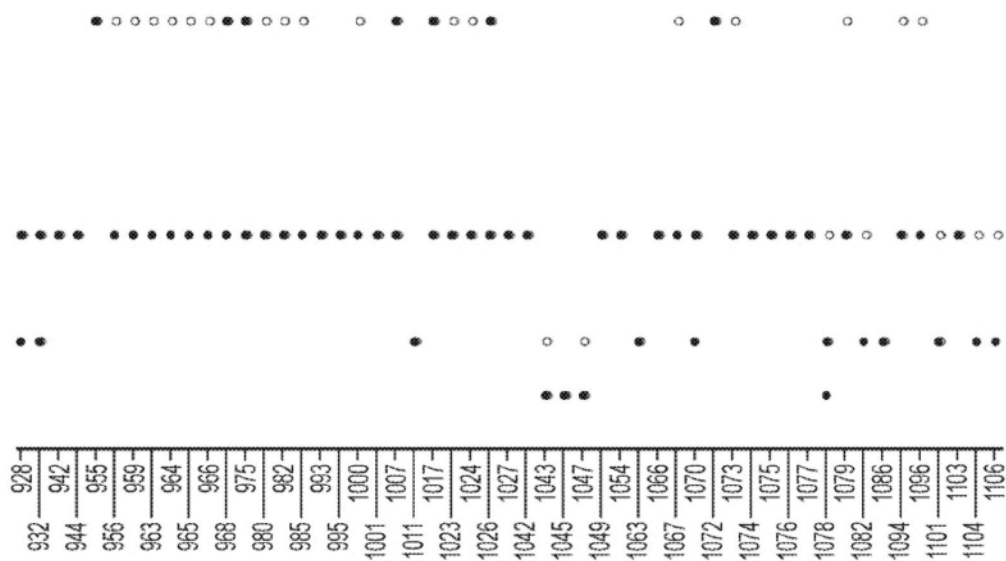


图22(续)

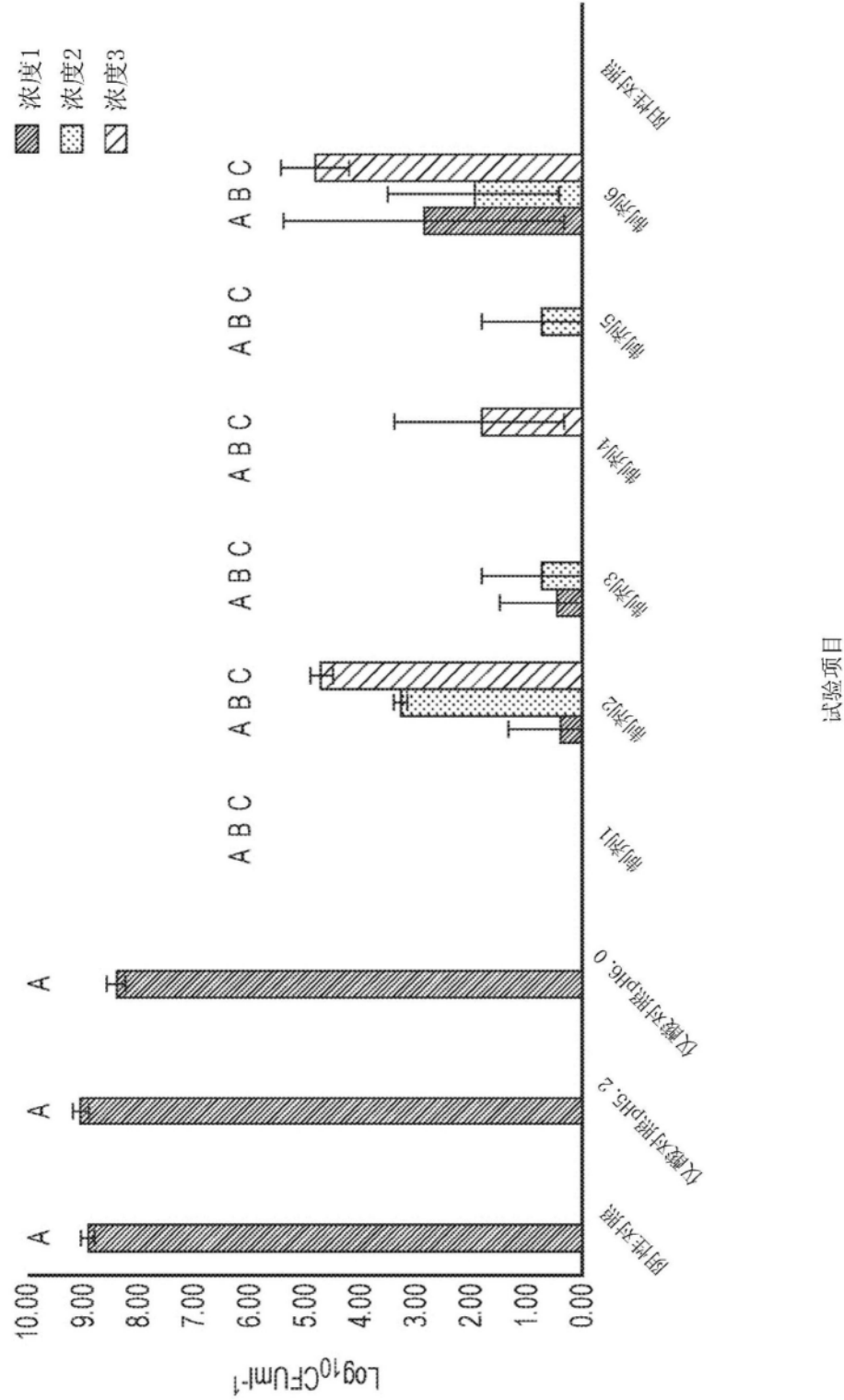


图23

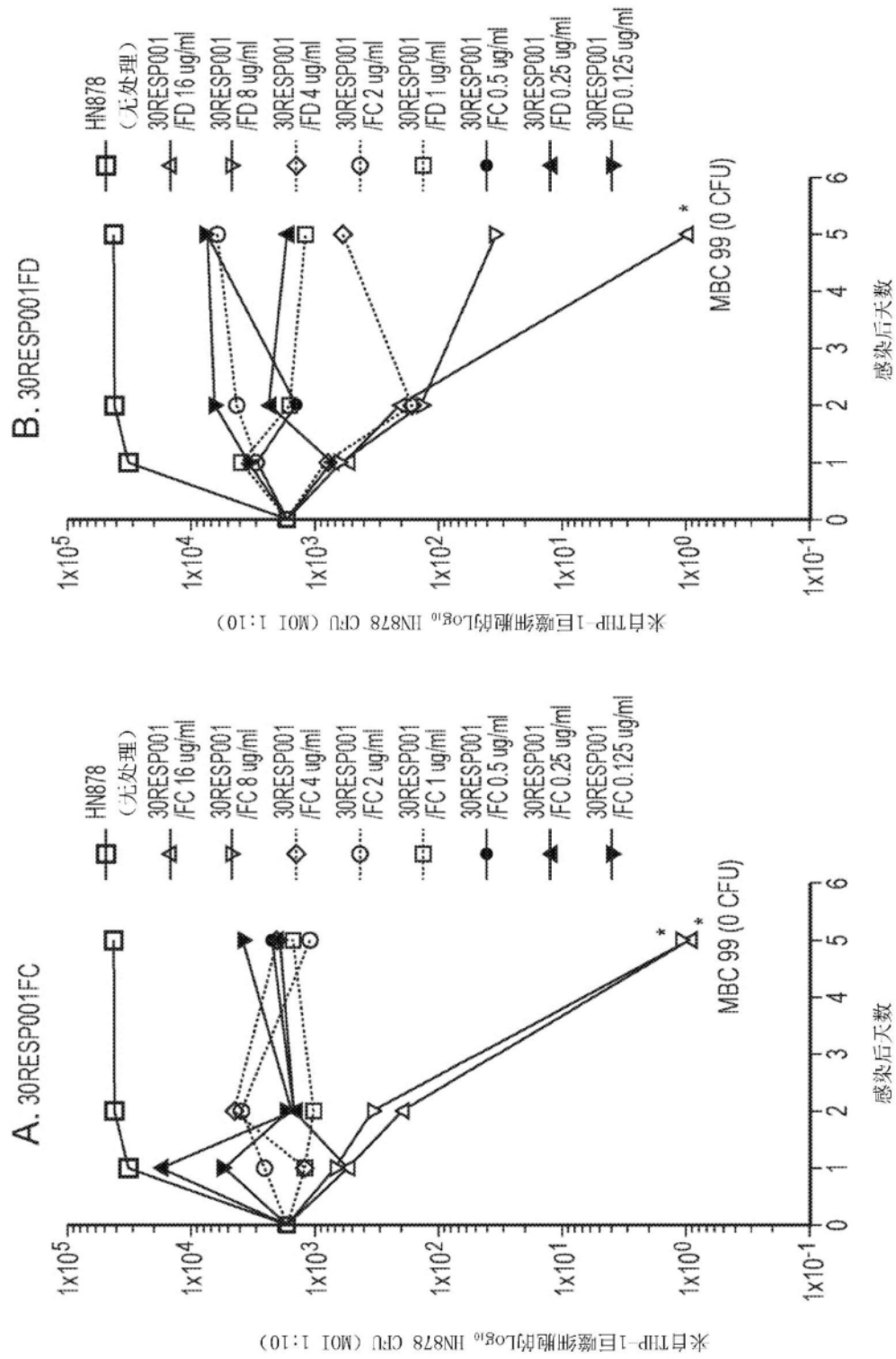


图24

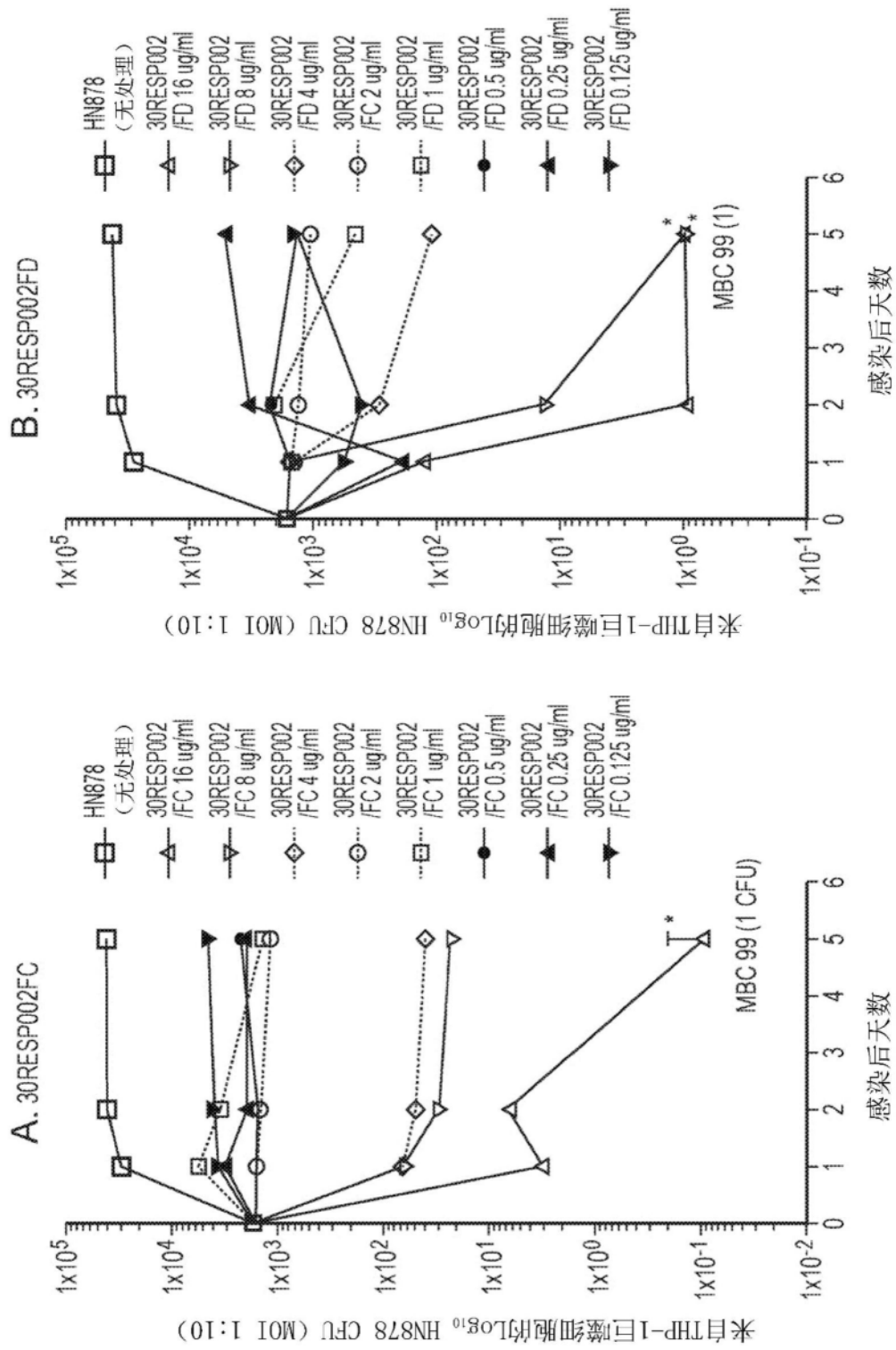


图25

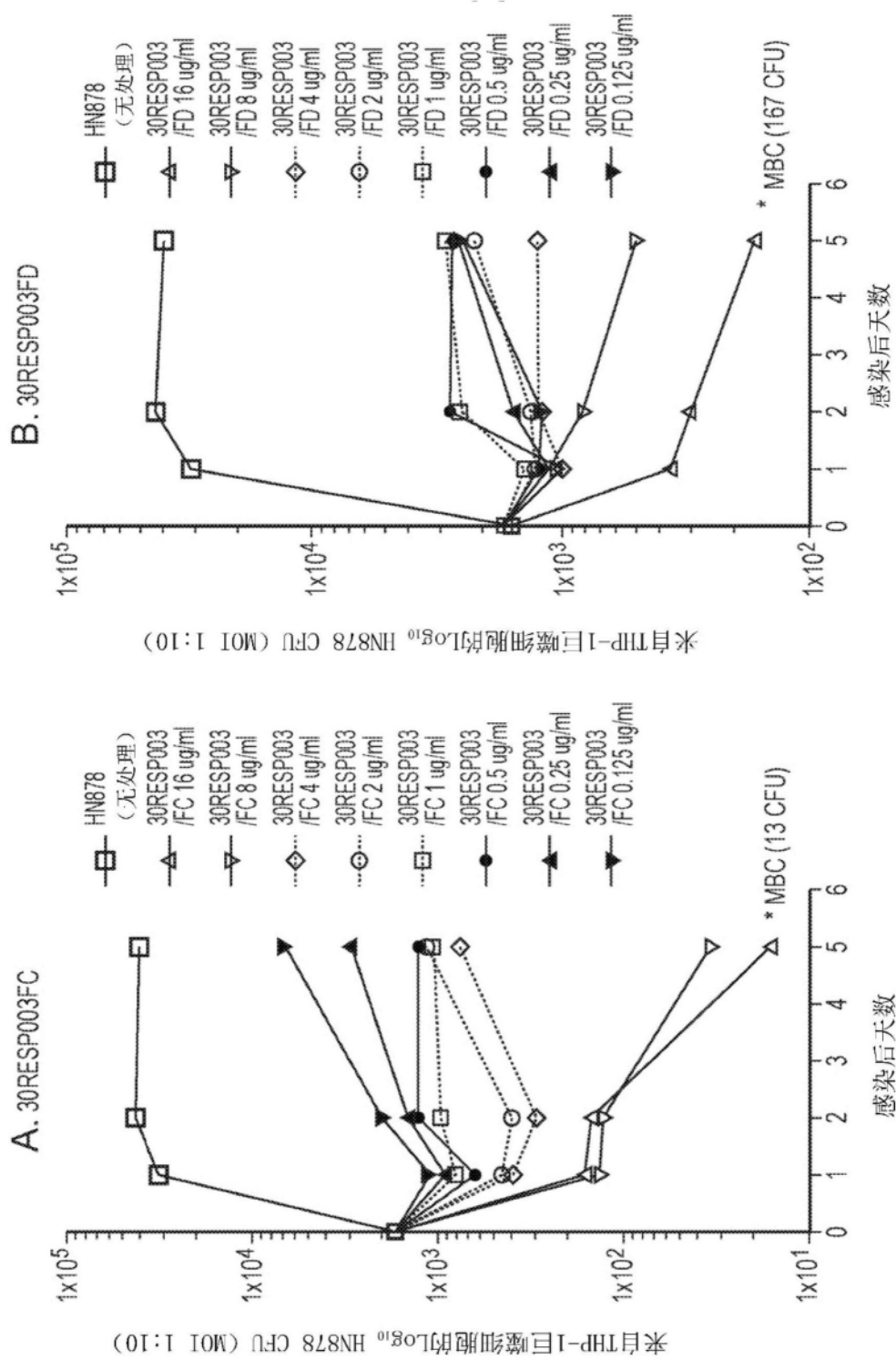
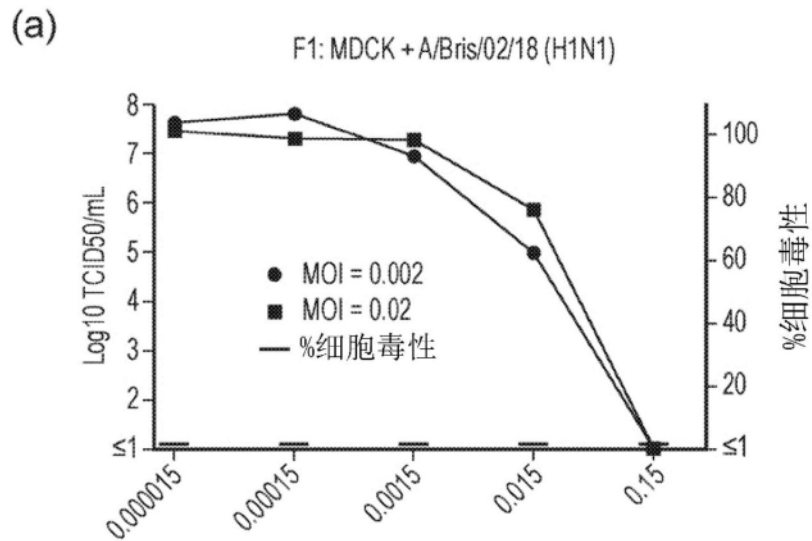


图26



(b)

亚硝酸盐 柠檬酸盐 甘露醇	0.15 0.1 0.05 F1C1	0.015 0.01 0.005 F1C2	0.0015 0.001 0.0005 F1C3	奥司他韦 (1 μ M)	病毒对照
MOI = 0.002 ~30 PFU/ 30000 细胞					
细胞毒性, LDH阳性 对照的百分比 (3次 LDH测定的平均值, 24小时)	16%	0%	0%	0%	无

图28

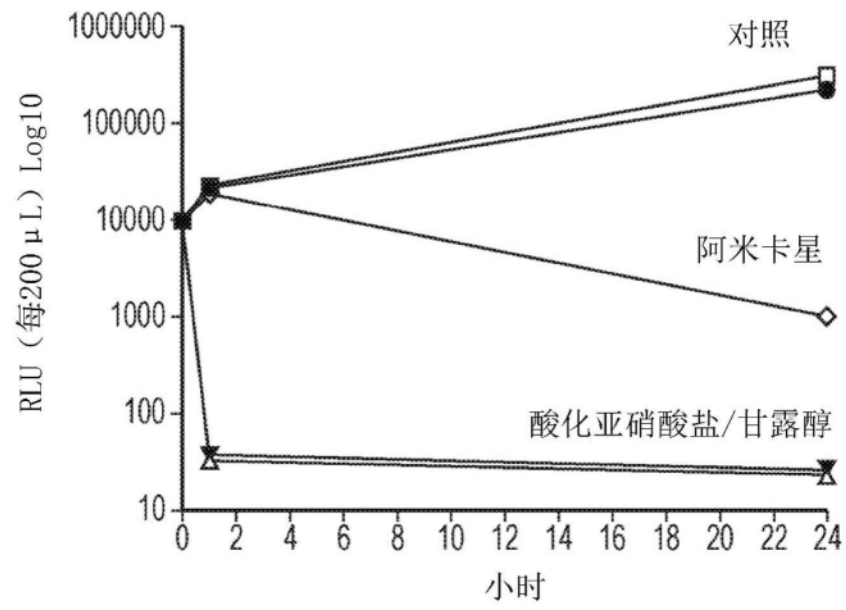


图29

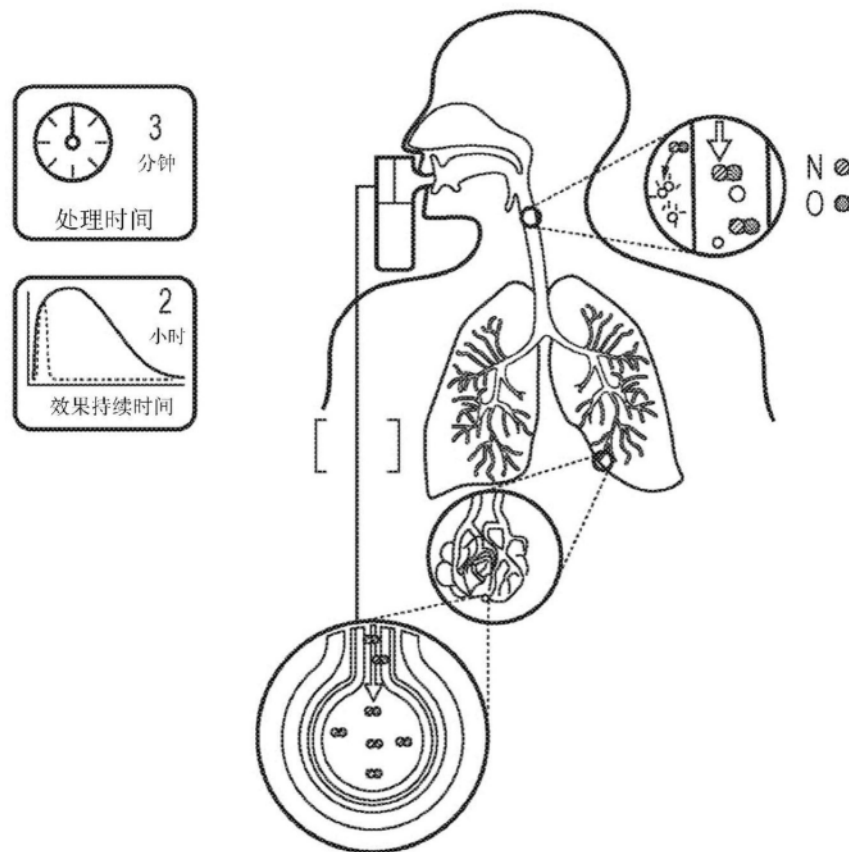


图30

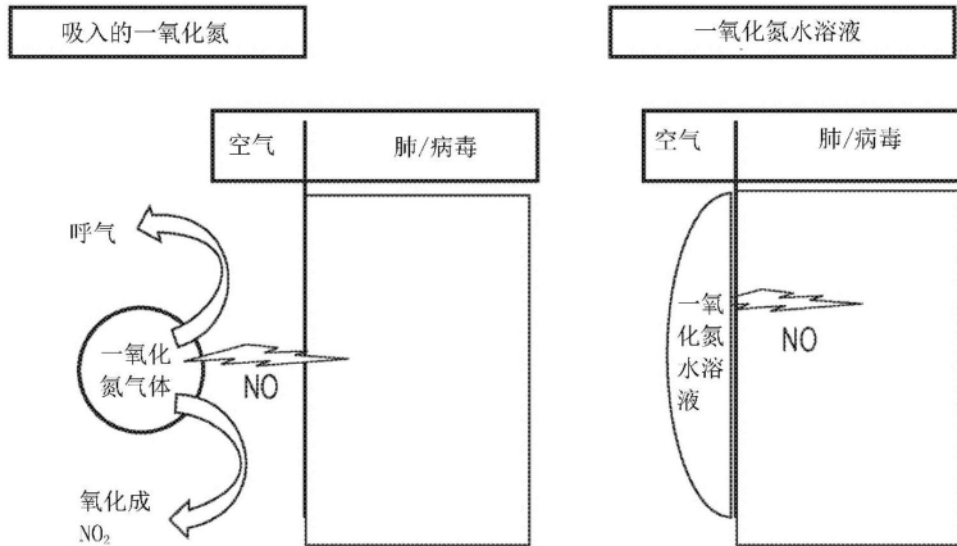


图31

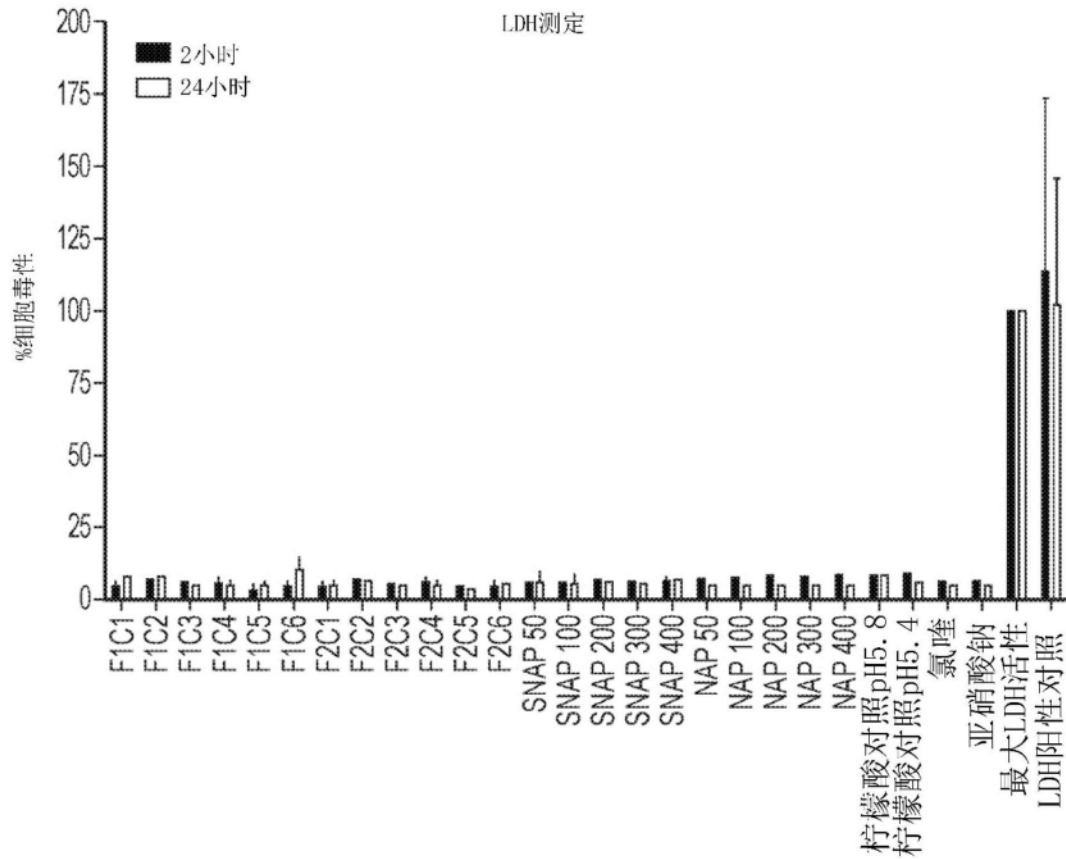


图32

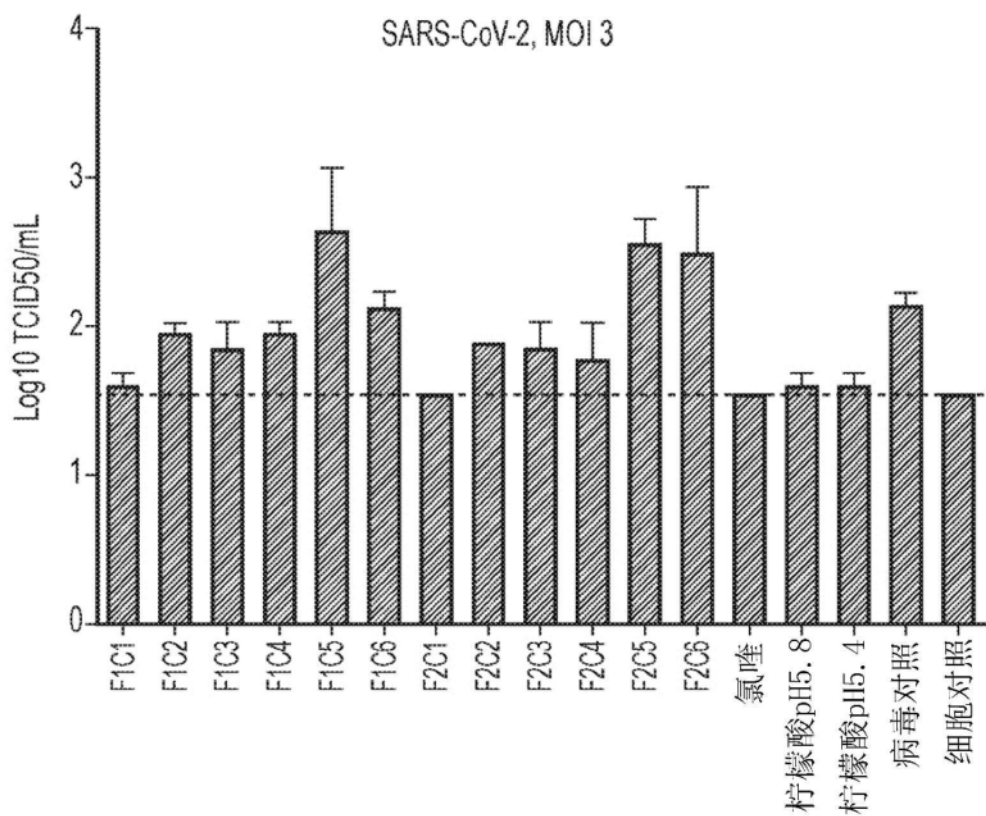


图33

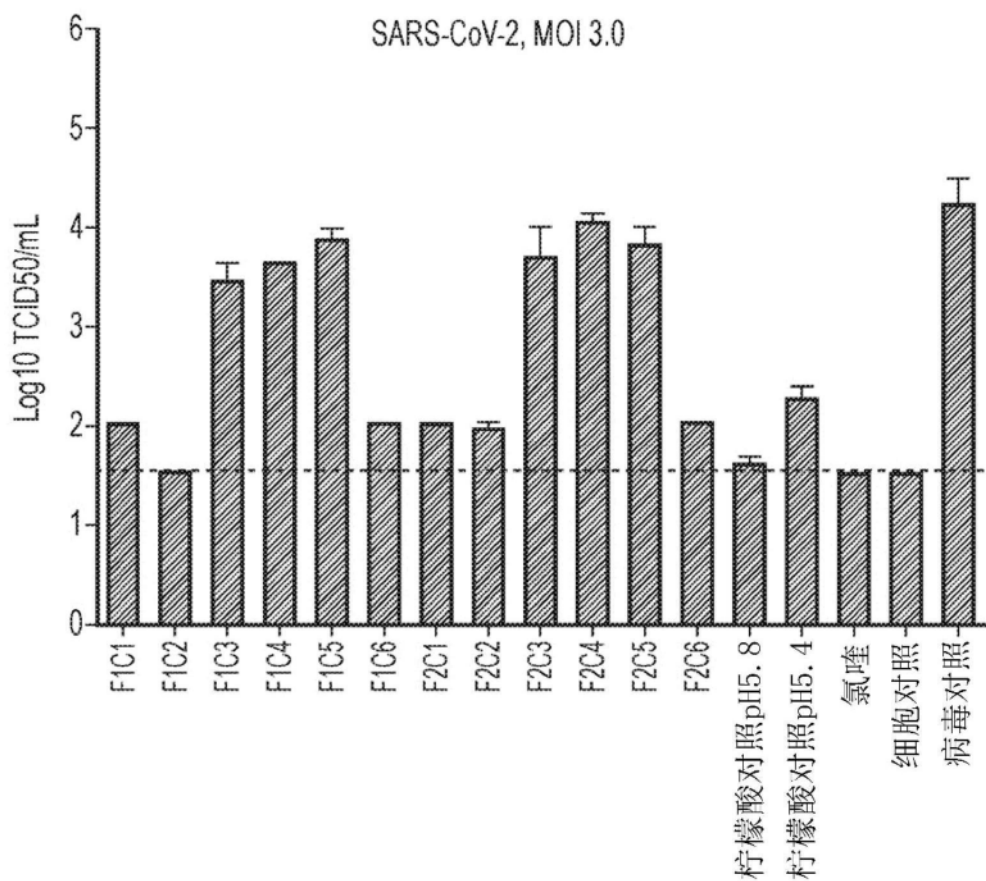


图34(a)

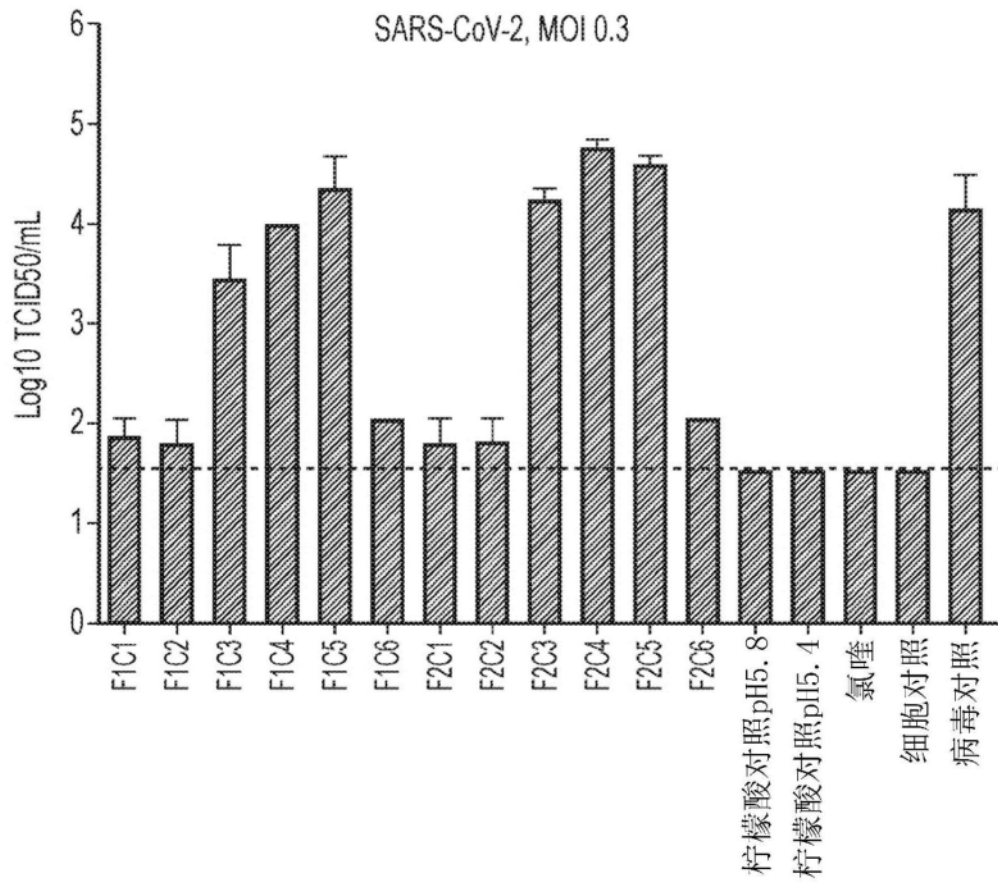


图34(b)

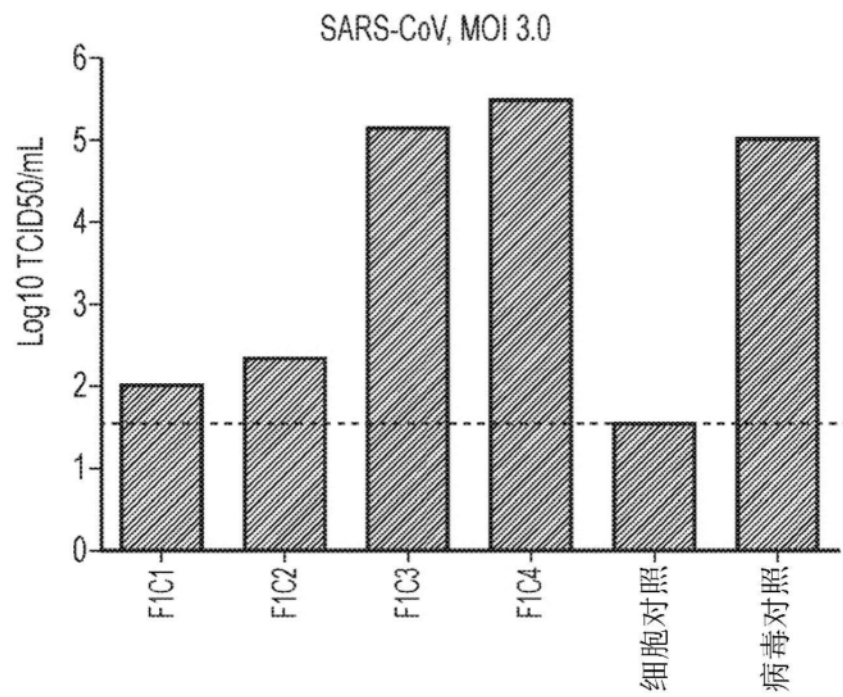


图35