(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 4 月 30 日 (30.04.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/082840 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 33/40 (2006.01) *A61P 1/04* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/098129

(22) 国际申请日: 2019 年 7 月 29 日 (29.07.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811230316.4 2018年10月22日 (22.10.2018) CN

(71) 申请人: 西 安 交 通 大 学 (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。

(72) 发明人: 曹永孝(CAO, Yongxiao); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 狄佳(DI, Jia); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 曹蕾(CAO, Lei); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 刘静(LIU, Jing); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 米燕妮(MI, Yanni); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 姚彤(YAO, Tong); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 肖雪(XIAO, Xue); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。 黄婷婷(HUANG, Tingting); 中国陕西省西安市咸宁西路28号, Shaanxi 710049 (CN)。

(74) 代理人: 西安通大专利代理有限责任公司(XI'AN TONG DA PATENT AGENCY CO., LTD.); 中国陕西省西安市高新区锦业路32号, Shaanxi 710075 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) **Title:** USE OF HYDROGEN PEROXIDE IN PREPARATION OF DRUGS FOR ERADICATION OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND PREPARED DRUGS

(54) **发明名称:** 过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用及制备的药物

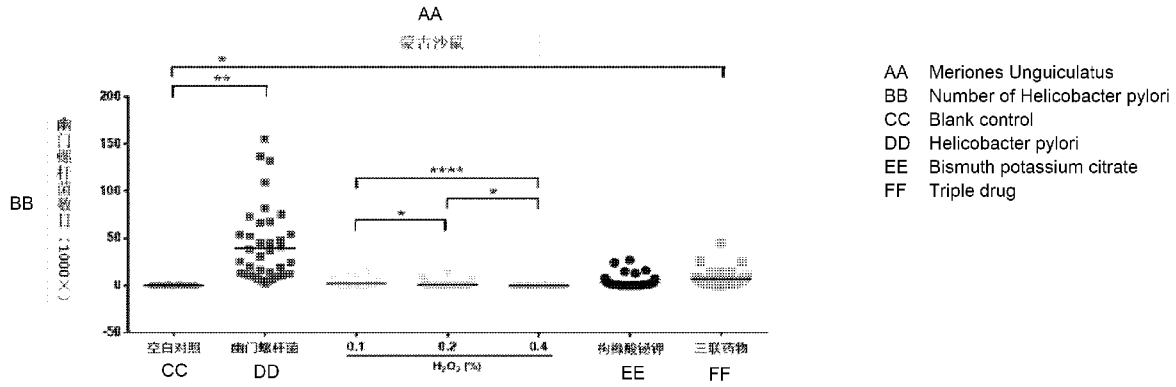


图 5

(57) **Abstract:** Disclosed are the use of hydrogen peroxide in preparation of drugs for eradication of Helicobacter pylori infection and the prepared drugs. The appropriate concentration of hydrogen peroxide quickly decomposes in the stomach and releases a large amount of oxygen, which significantly increases the oxygen concentration in the stomach, and enables effective eradication of Helicobacter pylori infection. The experiments show that the appropriate concentration of hydrogen peroxide has better killing effects on both Helicobacter pylori international standard strain and Helicobacter pylori wild type strain. The Helicobacter pylori infection model in mice shows no recurrence after treatment with hydrogen peroxide.

(57) **摘要:** 过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用及制备的药物。适宜浓度的过氧化氢在胃内迅速分解释放大量氧，显著提高胃内氧浓度，使幽门螺杆菌感染得以有效根除。实验证明，适宜浓度的过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株和幽门螺杆菌野生型菌株均具有较好的杀灭作用。小鼠幽门螺杆菌感染模型经过氧化氢治疗后无复发。

WO 2020/082840 A1

[见续页]

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国**(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用及制备的药物

技术领域

本发明属于医药学领域，涉及过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用及制备的药物。

背景技术

幽门螺杆菌（Helicobacter pylori, Hp）是一种革兰氏阴性、微需氧、对生长条件要求苛刻的弯曲棒状杆菌。从 1983 年澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 发现它至今，幽门螺杆菌在全球范围内已被证实是慢性胃炎、消化性溃疡和胃粘膜相关淋巴瘤的主要致病因子，尤其与胃癌的发生关系密切。1994 年世界卫生组织将幽门螺杆菌列为 I 类致癌因子（1.Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(8):1698-1709； 2.Grad YH, Lipsitch M, Aiello AE. Secular trends in Helicobacter pylori seroprevalence in adults in the United States: evidence for sustained race/ethnic disparities [J]. Am J Epidemiol, 2012, 175(1):54-59；3.张万岱，胡伏莲，萧树东，等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5):265-270； 4.Moeller H, Correa P. Carcinogenicity of some biological agents [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994, 3(7):627）。目前资料显示，全球各个国家和地区均有不同程度的幽门螺杆菌感染，范围超过 50%，其中拉丁美洲与拉脱维亚的感染率高达 79%。根据中国幽门螺杆菌科研协作组的调查结果（刘力生, 王文, 姚崇华. 中国高血压防治指南(2009) [J]. 中国高血压杂志, 2010, 18(1): 1-30），我国幽门螺杆菌自然人群中的平均感染率 64%，西藏自治区的平均感染率 85%（胡伏莲. 幽门螺杆菌研究聚焦和进展[J]. 胃肠病学, 2015(12):705-707）。

上世纪 90 年代，标准三联方案（质子泵抑制剂＋克拉霉素＋阿莫西林/

甲硝唑）是根除幽门螺杆菌最常用的方案，疗效好（Lind T, et al. Eradication of Helicobacter pylori using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study[J]. Helicobacter, 1996; 1(3):138-44），但随着细菌耐药率的显著升高，幽门螺杆菌的根除效果发生了显著变化。美国、欧洲、韩国幽门螺杆菌的根除率低于 80%，近年我国报道的根除率低至 60%（Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier J C. Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial (vol 377, pg 905, 2011)[J]. LANCET, 2011, 378(9805): 1778-1778）。为提高幽门螺杆菌的根除率，采取的策略主要集中在：三联疗法的改进与加强、中药抗菌与幽门螺杆菌疫苗三个方面。第一，针对三联疗法采取改进与加强措施，将疗程从 7 天增加到 14 天，同时增加抗菌药剂量，药物种类由 3 种增加到 4 种；第二，采用中药代替抗菌药发挥抗菌作用，避免耐药率升高，例如半夏泻心汤、胃复散、荆花胃康胶丸以及三九胃泰；第三，幽门螺杆菌疫苗，如幽门螺杆菌重组疫苗、幽门螺杆菌全菌疫苗等。根除幽门螺杆菌的方法虽多，但要达到有效根除却并不容易。第一，在三联疗法基础上增加药物种类、延长疗程的缺点：随着抗菌药的长时间大剂量应用，导致幽门螺杆菌的耐药率上升，成为影响幽门螺杆菌根除治疗效果的主要因素；第二，中成药代替抗菌素的缺点：药物成分复杂，抗菌效果不稳定；第三，幽门螺杆菌疫苗的缺点：疫苗的研发尚处在初级阶段，疫苗作用易受佐剂等因素影响，疫苗引发的免疫反应对人体的安全性尚不明确。

过氧化氢是一种氧化剂，水溶液俗称双氧水，为无色透明液体，其水溶液广泛应用于医用伤口、食品、环境等消毒，关于过氧化氢能够治疗幽门螺杆菌感染还未见报道。

发明内容

针对现有技术中存在的问题，本发明提供过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用及制备的药物。

本发明是通过以下技术方案来实现：

过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用。

优选的，所述幽门螺杆菌包括幽门螺杆菌国际标准菌株和幽门螺杆菌野生型菌株。

进一步的，所述幽门螺杆菌野生型菌株包括幽门螺杆菌野生型菌株Ⅰ、幽门螺杆菌野生型Ⅱ和幽门螺杆菌野生型Ⅲ。

优选的，所述幽门螺杆菌感染的部位为消化道。

进一步的，所述消化道包括胃和十二指肠。

过氧化氢在制备根除治疗幽门螺杆菌感染性疾病药物中的应用，所述幽门螺杆菌感染性疾病包括慢性胃炎、消化性溃疡、胃粘膜相关淋巴瘤和胃癌。

一种根除治疗幽门螺杆菌感染的药物，将过氧化氢制成口服液、片剂、胶囊剂、粉剂或颗粒剂得到。

优选的，过氧化氢的质量浓度为0.2%～1%。

与现有技术相比，本发明具有以下有益的技术效果：

幽门螺杆菌作为一种专性微需氧菌，其生长环境最适宜的氧浓度为5%-6%，提高氧浓度（如大气环境氧浓度）则导致幽门螺杆菌迅速死亡。因此，适宜浓度的过氧化氢在胃内迅速分解释放大量氧，显著提高胃内氧浓度，使幽门螺杆菌感染得以有效根除。实验证明，适宜浓度的过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株和幽门螺杆菌野生型菌株均具有较好的杀灭作用，特别是能够有效防止幽门螺杆菌产生耐药及复发感染。小鼠幽门螺杆菌感染模型经过氧化氢治疗后无复发，能达到根除的作用，为根除幽门螺杆菌药物提供了新选择。过氧化氢溶液受到胃内过氧化氢酶催化迅速分解生成大量氧和水，二

者均对人体无害，而由于浓度低，氧化作用弱，不足以造成人体胃粘膜损伤。因此本发明采用“氧环境”策略，将“幽门螺杆菌根除难题”转化为“剥夺幽门螺杆菌生长必须条件”的问题，有效避免了现有疗法的缺陷，为临床防治幽门螺杆菌感染提供新的思路。

附图说明

图 1A 为过氧化氢对液体培养幽门螺杆菌国际标准菌株的最小抑菌浓度；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01；

图 1B 为四组不同浓度幽门螺杆菌国际标准菌株的生长曲线；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01；

图 2 为过氧化氢对固体培养幽门螺杆菌国际标准菌株的最小抑菌浓度；CBS 为铋剂组，NS 为生理盐水；均数±标准差，n=5，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3A 为不同浓度过氧化氢对幽门螺杆菌野生型菌株 I 的作用；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3B 为不同浓度过氧化氢对幽门螺杆菌野生型菌株 II 的作用；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3C 为不同浓度过氧化氢对幽门螺杆菌野生型菌株III的作用；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3D 为过氧化氢对不同浓度幽门螺杆菌野生型菌株 I 的作用；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3E 为过氧化氢对不同浓度幽门螺杆菌野生型菌株 II 的作用；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 3F 为过氧化氢对不同浓度幽门螺杆菌野生型菌株III的作用；均数±

标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 4 为过氧化氢对固体培养幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的最小抑菌浓度；均数±标准差，n=6，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 5 为过氧化氢给药 14 天对沙鼠幽门螺杆菌感染的作用；吉姆萨染色，1000×，PBC 为枸橼酸铋钾组，均数，n=8，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 6 为过氧化氢给药 4、7、14 天对小鼠幽门螺杆菌感染的作用；吉姆萨染色，1000×，均数，n=12，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

图 7 为过氧化氢清除小鼠幽门螺杆菌感染后的复发情况；吉姆萨染色，1000×，n=12，与对照组比较*p<0.05，**p<0.01。

具体实施方式

下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实验 1：过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株的作用

（1）液体培养基测定过氧化氢的最小抑菌浓度

将幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 配制成为 1.0×10^{8}CFU/mL 菌悬液，同时配制含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基。吸取 0.12mL 菌悬液加入 11.88mL 含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基，使整个液体培养基体积为 12mL（菌液:液体培养基=1:100）。置 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 5 天，观察幽门螺杆菌生长情况，测定液体培养基 OD_{600} 并绘制生长曲线。

将幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 分别配制成为 1.0×10^{6}CFU/mL、1.0×10^{7}CFU/mL、1.0×10^{8}CFU/mL、1.0×10^{9}CFU/mL 菌悬液，分别吸取

0.12mL 接种于含 0.21%过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基，使培养基体积为 12mL（菌液:培养基=1:100）。置 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 5 天，观察幽门螺杆菌生长情况，测定培养基 OD_{600} 并绘制生长曲线。

图 1A 结果显示，过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 的最小抑菌浓度为 0.21%，当过氧化氢浓度大于 0.21%时，幽门螺杆菌标准菌株均不生长。图 1B 结果显示，将浓度分别为 10^6、10^7、10^8、10^9CFU/mL 的幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 分别接种于含 0.21%过氧化氢的液体培养基时，四组菌株的生长曲线出现差异，接种浓度最高的 10^9CFU/mL 组率先生长，随后分别为 10^8、10^7、10^6CFU/mL 组。

（2）固体培养基测定过氧化氢的最小抑菌浓度

将幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 配制成为 1.0×10^8CFU/mL 菌悬液，分别浇筑含浓度梯度过氧化氢、铋剂的幽门螺杆菌固体培养基。吸取 0.1mL 菌悬液加入含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌固体培养基，无菌接种环涂抹均匀。置 37℃恒温培养箱，在微需氧环境下培养 5 天后，将全部菌落洗脱于 2mL 无菌生理盐水中，测定菌落洗脱液 OD_{600}。图 2 结果显示，与空白对照组相比，幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 在含 0.1%过氧化氢的固体培养基中生长受限，在含 0.2%过氧化氢的固体培养基中生长抑制，在含 0.8%过氧化氢的固体培养基中生长显著抑制。随着固体培养基中过氧化氢浓度的增加，标准菌株生长量显著降低。

（3）过氧化氢最小杀菌浓度的测定

将幽门螺杆菌际标准菌株 ATCC43504 制成为 1.0×10^8CFU/mL 菌悬液，同时配制含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基（浓度高于最小抑菌

浓度）、空白的幽门螺杆菌固体培养基。将 0.12mL 菌悬液加入 11.88mL 含浓度梯度过氧化氢的液体培养基，放置于 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 3 天。吸取 0.1mL 培养 3 天的菌悬液，分别加入空白固体培养基，无菌接种环涂抹均匀。放置于 37℃恒温培养箱，在微需氧环境下培养 5 天后，观察标准菌株的生长情况。表 1 结果显示，幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 经含 2.28%过氧化氢的液体培养基培养后，转种至空白幽门螺杆菌固体培养基，无菌落生长。

表 1 过氧化氢对幽门螺杆菌 ATCC43504 的最小杀菌浓度

药物	最小杀菌浓度（%）
过氧化氢	2.28

实验 2：过氧化氢对幽门螺杆菌野生型菌株的作用

（1）液体培养基测定过氧化氢的最小抑菌浓度

将幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别配制成为 1.0×10^8CFU/mL 菌悬液，同时配制含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基。分别吸取 0.12mL 三种菌悬液加入 11.88mL 含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基，使整个液体培养基体积为 12mL（菌液:培养基=1:100）。放置于 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 5 天，观察幽门螺杆菌生长情况，测定整个液体培养基 OD_{600} 并绘制生长曲线。

将幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别配制成为 1.0×10^6、10^7、10^8、10^9CFU/mL 菌悬液，分别吸取 0.12mL 接种于含 0.04%、0.08%、0.04%过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基，使培养基体积为 12mL（菌液:培养基=1:100）。放置于 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 5 天，观察幽门螺杆菌生长情况，测定整个液体培养基 OD_{600} 并绘制生长曲线。

图 3 中 A、B、C 结果显示，幽门螺杆菌野生型菌株Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的最小抑菌浓度分别为 0.08%、0.16%、0.05%。图 3 中 D、E、F 结果显示，将浓度分别为 10^6、10^7、10^8、10^9CFU/mL 的幽门螺杆菌野生型菌株Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别接种于含 0.04%、0.08%、0.04%过氧化氢的液体培养基时，各组菌株的生长曲线出现差异，接种浓度最高的 10^9CFU/mL 组先生长，随后大致为 10^8、10^7、10^6CFU/mL 组。

（2）固体培养基测定过氧化氢的最小抑菌浓度

将幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别配制成为 1.0×10^8CFU/mL 菌悬液，分别浇筑含浓度梯度过氧化氢、铋剂的幽门螺杆菌固体培养基。吸取 0.1mL 菌悬液加入含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌固体培养基，无菌接种环涂抹均匀。放置于 37℃恒温培养箱，在微需氧环境下培养 5 天后，将全部菌落洗脱于 2mL 无菌生理盐水中，测定菌落洗脱液 OD_{600}。图 4 结果显示，与空白对照组相比，幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ在含 1.6%、0.8%、0.2%过氧化氢的固体培养基中生长受限，在含 3.2%、1.6%、0.4%过氧化氢的固体培养基中生长显著抑制。随着固体培养基中过氧化氢浓度的增加，三种野生型菌株生长量显著降低。

（3）过氧化氢最小杀菌浓度的测定

将幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ制成为 1.0×10^8CFU/mL 菌悬液，同时配制含浓度梯度过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基（浓度高于最小抑菌浓度）、空白的幽门螺杆菌固体培养基。将 0.12mL 菌悬液加入 11.88mL 含浓度梯度过氧化氢的液体培养基，放置于 37℃恒温震荡培养箱，以 150r/min 在微需氧环境下培养 3 天。吸取 0.1mL 培养 3 天的菌悬液，分别加入空白固体培养基，无菌接种环涂抹均匀。放置于 37℃恒温培养箱，在微

需氧环境下培养 5 天后，观察三种野生型菌株的生长情况。表 2 结果显示，幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别在含有 0.24%、0.32%、0.32%过氧化氢的液体培养基培养后，转种至空白幽门螺杆菌固体培养基，无菌落生长。

表 2 过氧化氢对 3 种幽门螺杆菌野生型菌株的最小杀菌浓度

菌株	过氧化氢的最小杀菌浓度（%）
菌株Ⅰ	0.24
菌株Ⅱ	0.32
菌株Ⅲ	0.32

实验 3：过氧化氢筛选压力下幽门螺杆菌国际标准菌株的最小抑菌浓度变化

上述实验证实，过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株的最小抑菌浓度为 0.21%，为使幽门螺杆菌国际标准菌株在过氧化氢筛选压力下继续生长，选取低于最小抑菌浓度的过氧化氢浓度 0.20%作为幽门螺杆菌国际标准菌株的诱导浓度。配制含 0.20%过氧化氢的幽门螺杆菌液体培养基 50mL，分别吸取 3.6mL 培养基于 50mL 无菌试管，每管等量添加 1×10^{8}CFU/mL 幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 菌液 0.4mL，重复 5 管，每管放置于恒温震荡培养箱，在 37℃、150r/min 条件下培养 24 小时记为诱导 1 次，当分别诱导 10、20、30 次时，测定过氧化氢诱导后幽门螺杆菌国际标准菌株的 MIC_{10}、MIC_{20}、MIC_{30}。表 3 结果显示，0.20%过氧化氢诱导幽门螺杆菌国际标准菌株 10、20、30 代后，最小抑菌浓度分别为 0.25%、0.29%、0.37%。

表 3 过氧化氢筛选压力下幽门螺杆菌 ATCC 43504 的最小抑菌浓度（MIC）变化

诱导数（次）	MIC(%)
0	0.21
10	0.25
20	0.29
30	0.37

实验 4：过氧化氢筛选压力下幽门螺杆菌野生型菌株的最小抑菌浓度变化

上述实验证实，过氧化氢对幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的最小抑菌浓度分别为：0.08%、0.16%、0.05%，为使三种野生型菌株在过氧化氢筛选压力下继续生长，因此选取稍低于最小抑菌浓度的过氧化氢浓度：0.04%、0.08%、0.04%分别作为幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的诱导浓度。表 4 结果显示，过氧化氢分别诱导幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ生长 10、20、30 代后，幽门螺杆菌野生型菌株-I 的最小抑菌浓度无变化，均为 0.08%；幽门螺杆菌野生型菌株-II 的最小抑菌浓度增加至 0.40%；幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅲ的最小抑菌浓度增加至 0.30%。

表 4 过氧化氢筛选压力下幽门螺杆菌野生型菌株-Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的最小抑菌浓度（MIC）变化

诱导数（次）	MIC（%）		
	野生型菌株 I	野生型菌株 II	野生型菌株III
0	0.08	0.16	0.05
10	0.08	0.18	0.14
20	0.08	0.32	0.28
30	0.08	0.40	0.30

实验 5：过氧化氢对沙鼠和小鼠幽门螺杆菌定植的清除作用

1.**沙鼠**取 4 周龄蒙古沙鼠 80 只，体重 40-50g，适应性饲养 1 周。将幽门螺杆菌国际标准菌株 ATCC43504 制成为 1.0×10^{8}CFU/mL 菌悬液，15mL/kg 灌胃，每日 1 次，连续 2 周。确证幽门螺杆菌模型成功后将蒙古沙鼠分组：①空白对照组，②模型组，③～⑤分别为过氧化氢 0.1%、0.2%、0.4%组，⑥丽珠维三联组（枸橼酸铋钾、甲硝唑、克拉霉素），⑦枸橼酸铋钾组。各组以 15mL/kg 进行灌胃给药，每日 1 次，连续 2 周后处死，进行吉姆萨染色，显微镜下计数幽门螺杆菌数目。图 5 结果显示，与空白对照组

相比，模型组沙鼠感染幽门螺杆菌明显；过氧化氢治疗组与空白对照组相比，二者无显著差异，0.4%过氧化氢组杀菌效果优于0.2%过氧化氢组，同时过氧化氢组杀菌效果优于三联药物组。

2.**小鼠**选取6-8周龄昆明小鼠81只，体重15-22g，适应性饲养1周。将幽门螺杆菌国际标准菌株ATCC43504制成为1.0×10^{8}CFU/mL菌悬液，以20mL/kg进行灌胃，每日1次，连续10天。确证幽门螺杆菌模型成功后将昆明小鼠分组：①空白对照组，②模型组，③过氧化氢组，④丽珠维三联组（枸橼酸铋钾、甲硝唑、克拉霉素）。各组灌胃给药，20mL/kg，每日1次，连续14天。第4、7、14天分别处死三分之一动物，进行吉姆萨染色，显微镜下计数幽门螺杆菌数目。

图6A结果显示，模型组昆明小鼠胃内幽门螺杆菌数目显著高于空白对照组，说明造模成功；过氧化氢组昆明小鼠治疗4天后胃内幽门螺杆菌数目与空白对照组无差别；三联药物组昆明小鼠胃内幽门螺杆菌数目仍高于空白对照组，三联药物杀菌效果弱于过氧化氢组。图6B结果显示，经过7天给药治疗，过氧化氢组的杀菌效果优于三联药物组。图6C结果显示，经过14天给药治疗，过氧化氢组的杀菌效果明显优于三联药物组。

实验6：昆明小鼠幽门螺杆菌清除后复发

选取6-8周龄昆明小鼠105只，体重15-22g，适应性饲养1周。将幽门螺杆菌国际标准菌株ATCC43504制成为1.0×10^{8}CFU/mL菌悬液，以20mL/kg灌胃，每日1次，连续10天。确证幽门螺杆菌模型成功后将昆明小鼠分组：①空白对照组，②模型组，③过氧化氢组，④三联药物组。各组灌胃给药，20mL/kg，每日1次，连续10天。灌胃给药第5、10天各处死三分之一动物，分别检测幽门螺杆菌。剩余动物不给药正常饲喂14天后，观

察幽门螺杆菌是否复发感染。

给药剂量依据：枸橼酸铋钾、甲硝唑和克拉霉素临床日用量分别为：440、1000、500 mg。人体重按 60kg 计算，上述三种药物的给药剂量分别为：7.3、16.7、8.3 mg/kg。昆明小鼠剂量按人剂量 9 倍计算，枸橼酸铋钾、甲硝唑和克拉霉素的给药剂量分别为：65、150、75 mg/kg。

表 5 幽门螺杆菌感染模型昆明小鼠给药方案

给药天数（d）		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
过氧化氢（%）		0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.05	0.07	0.10	0.143	0.200
丽珠维三联（mg/kg）	甲硝唑	7	10	14	20	28	39	55	77	107	150
	克拉霉素	4	5	7	10	14	20	27	38	54	75
	枸橼酸铋钾	3	4	6	9	12	17	24	33	46	65
模型		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
空白		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 7A 结果显示，模型组小鼠胃内幽门螺杆菌数目显著高于空白对照组，说明造模成功；过氧化氢组小鼠治疗 5 天后胃内幽门螺杆菌数目与空白对照组无显著性差别；而三联药物组昆明小鼠胃内幽门螺杆菌数目仍高于空白对照组，三联药物杀菌效果弱于过氧化氢组。图 7B 结果显示，经过 10 天给药治疗，过氧化氢组与空白对照组幽门螺杆菌数目无差别，而三联药物组与空白对照组相比，仍存在幽门螺杆菌感染，过氧化氢组的杀菌效果优于三联药物组。图 7C 结果显示，给药结束后观察 14 天，三联药物组与空白对照组相比，幽门螺杆菌数目显著增多，而过氧化氢组幽门螺杆菌数目与空白对照组无差别，说明过氧化氢组幽门螺杆菌基本无复发，三联药物组幽门螺杆菌显著复发感染。

实验 7：过氧化氢口服剂型的制备

本发明将过氧化氢制成口服液、粉剂、片剂、胶囊剂，过氧化氢质量浓

度均为0.2%-1%，优选0.4%。

所述口服液包括以下原料：纯净水、30%过氧化氢溶液（药用）、木糖醇、柠檬酸。

（1）按照上述配方量取 30%过氧化氢溶液 13.3mL，称取木糖醇 200g，柠檬酸3g，备用；

（2）将上述 30%过氧化氢溶液加纯净水溶解至 1L，所得 0.4%过氧化氢溶液和木糖醇、柠檬酸一同加入至调配罐中，通过搅拌器充分搅拌混合均匀；

（3）经过滤、杀菌、灌装至 50mL 的瓶中并自动封口，最后经贴标签装箱，即得成品口服液。

与上述口服液制备方法相同，只是将30%过氧化氢溶液的量改为6.5mL，使所得口服液中过氧化氢浓度为0.2%。

所述粉剂包括以下原料：淀粉、固体过氧化氢（$2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$）、无水柠檬酸。

（1）按照上述配方称取淀粉 4g、固体过氧化氢（$2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$）0.06g，无水柠檬酸0.9g，备用；

（2）将上述原料混合，粉碎至200目

（3）经杀菌后包装至5g的袋中并封口、贴标签，即得成品粉剂。

与上述粉剂制备方法相同，只是将固体过氧化氢的量改为 0.15g，使所得粉剂中过氧化氢浓度为1%。

所述片剂包括以下原料：乳糖、碳酸氢钠、硬脂酸镁、固体过氧化氢（$2Na_2CO_3 \cdot 3H_2O_2$）、枸橼酸。

（1）按照上述配方称取乳糖73.8g、碳酸氢钠18g、硬脂酸镁5g、固体

过氧化氢（$2Na_2CO_3·3H_2O_2$）1.2g、枸橼酸 2g，备用；

（2）将上述原料混合，粉碎至 100 目，混匀、杀菌；

（3）20 目筛制粒，加硬脂酸镁，压片制成 100 片，包薄膜衣即得成品片剂。

所述胶囊剂包括以下原料：淀粉、固体过氧化氢（$2Na_2CO_3·3H_2O_2$）、无水柠檬酸。

（1）按照上述配方称取淀粉 96g、固体过氧化氢（$2Na_2CO_3·3H_2O_2$）1.2g，无水柠檬酸 2.8g，备用；

（2）将上述原料混合，粉碎至 200 目；

（3）经杀菌后灌装胶囊，每粒重 0.3g，即得成品胶囊剂。

本发明涉及过氧化氢在根除幽门螺杆菌中的新用途。所述的过氧化氢对幽门螺杆菌有良好杀灭作用，特别是能够有效防止幽门螺杆菌产生耐药及复发感染。过氧化氢对幽门螺杆菌国际标准菌株及临床野生型菌株的最小抑菌浓度范围为 0.05%-0.21%。过氧化氢作用幽门螺杆菌 30 代后，其最小抑菌浓度范围为 0.08%-0.40%。小鼠幽门螺杆菌感染模型经过氧化氢治疗后无复发。所述过氧化氢的新用途为根除幽门螺杆菌药物提供了新选择，可以用治疗幽门螺杆菌感染引起的疾病，包括慢性胃炎、消化性溃疡、胃粘膜相关淋巴瘤和胃癌。

权 利 要 求 书

1.过氧化氢在制备幽门螺杆菌感染根除治疗药物中的应用。

2.根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述幽门螺杆菌包括幽门螺杆菌国际标准菌株和幽门螺杆菌野生型菌株。

3. 根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述幽门螺杆菌野生型菌株包括幽门螺杆菌野生型菌株Ⅰ、幽门螺杆菌野生型Ⅱ和幽门螺杆菌野生型Ⅲ。

4. 根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述幽门螺杆菌感染的部位为消化道。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述消化道包括胃和十二指肠。

6. 过氧化氢在制备根除治疗幽门螺杆菌感染性疾病药物中的应用，其特征在于，所述幽门螺杆菌感染性疾病包括慢性胃炎、消化性溃疡、胃粘膜相关淋巴瘤和胃癌。

7.一种根除治疗幽门螺杆菌感染的药物，其特征在于，将过氧化氢制成口服液、片剂、胶囊剂、粉剂或颗粒剂得到。

8. 根据权利要求 7 所述的根除治疗幽门螺杆菌感染的药物，其特征在于，过氧化氢的质量浓度为 0.2%～1%。

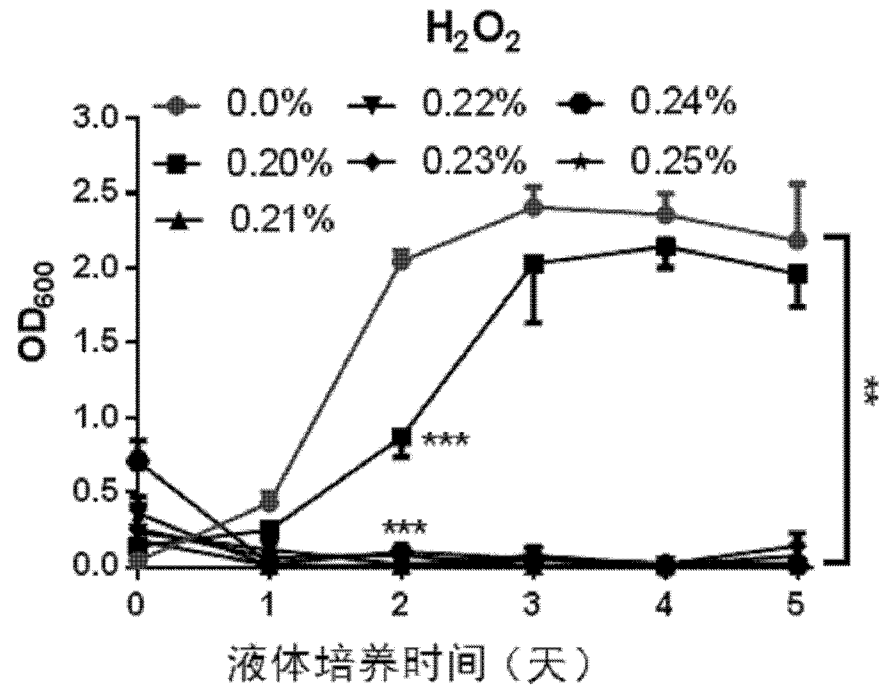

H2O2
0.0%
0.22%
0.24%
0.20%
0.23%
0.25%
0.21%
OD600
液体培养时间（天）

图 1A

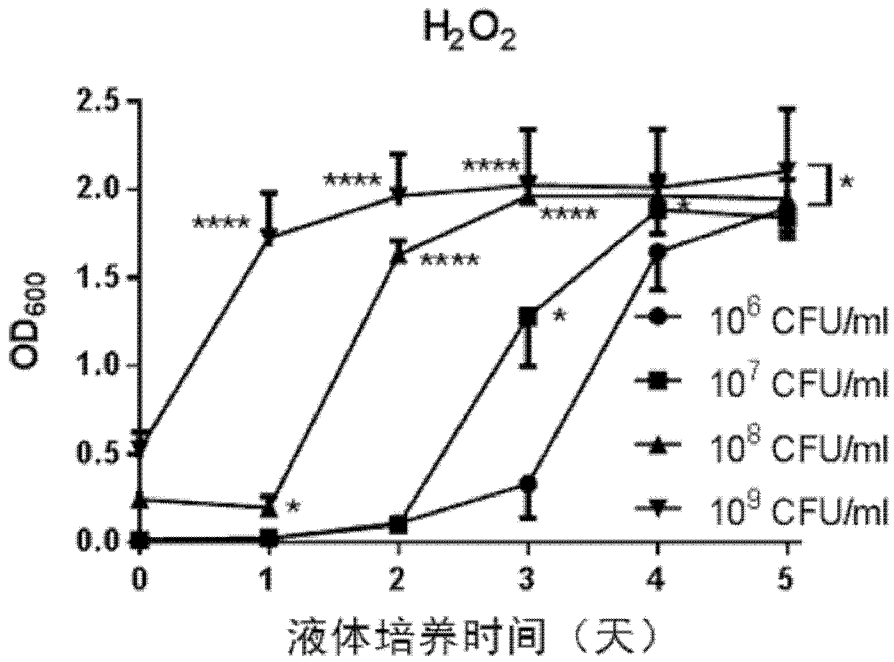

H2O2
OD600
10^6 CFU/ml
10^7 CFU/ml
10^8 CFU/ml
10^9 CFU/ml
液体培养时间（天）

图 1B

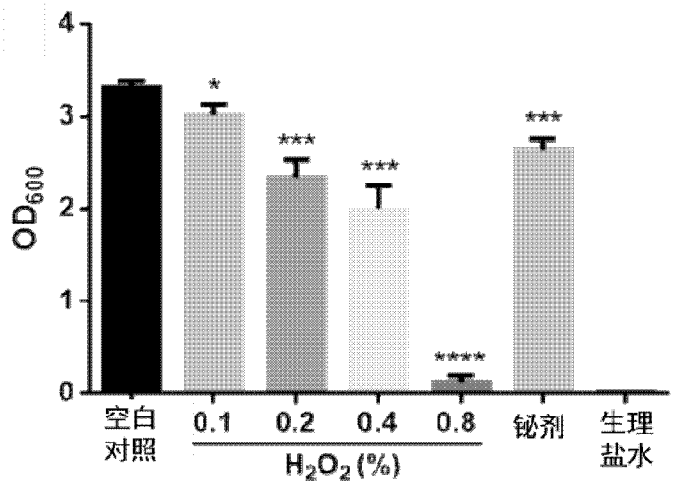

OD600
4
3
2
1
0
*
***
***
****
***
空白对照
0.1
0.2
0.4
0.8
铋剂
生理盐水
H2O2 (%)

图 2

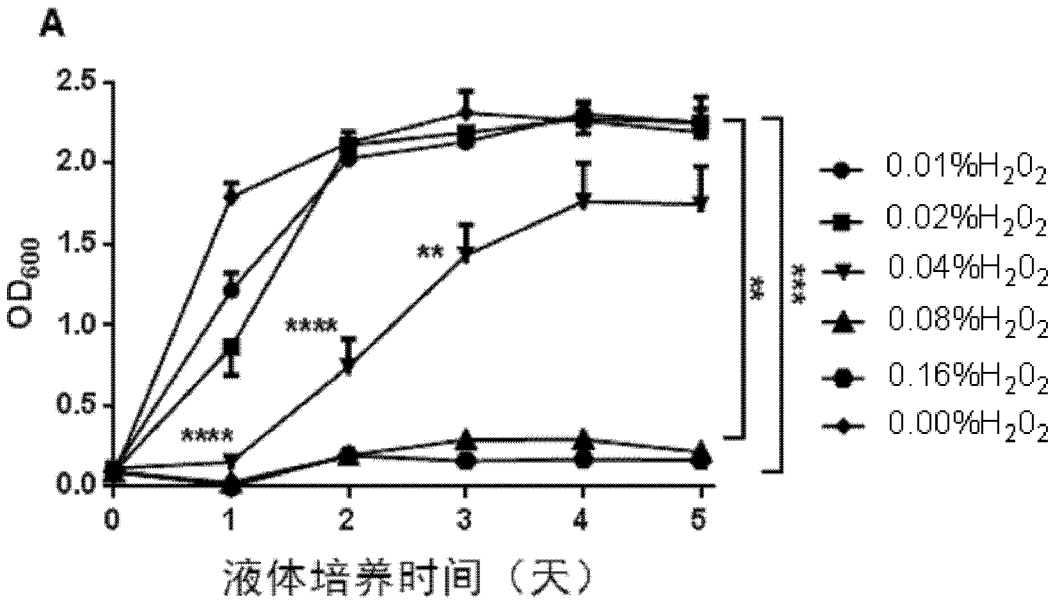

A
OD600
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
液体培养时间（天）
****
**
****
**
***
0.01%H2O2
0.02%H2O2
0.04%H2O2
0.08%H2O2
0.16%H2O2
0.00%H2O2

图 3A

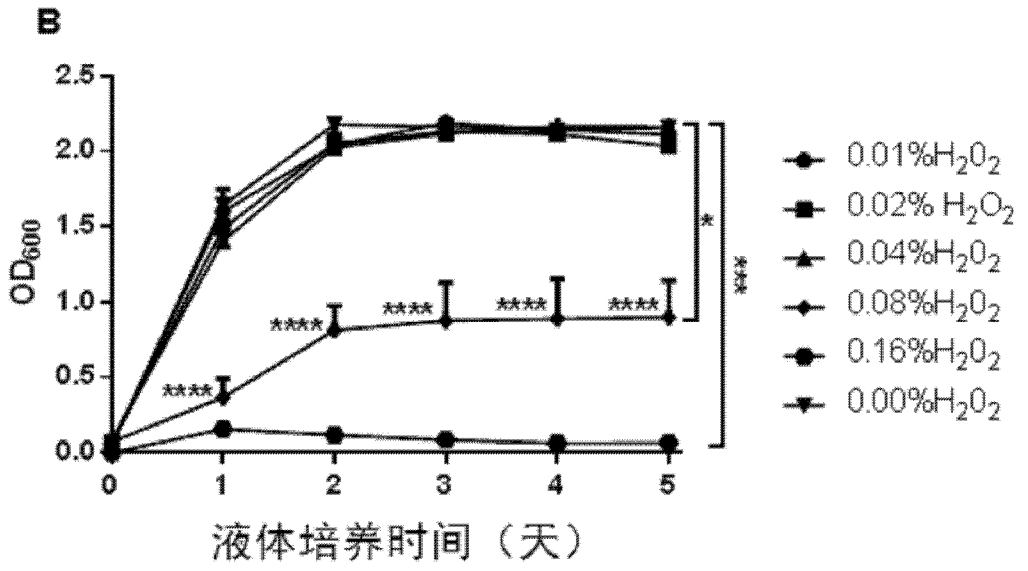

B
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD600
0
1
2
3
4
5
液体培养时间（天）
0.01%H2O2
0.02% H2O2
0.04%H2O2
0.08%H2O2
0.16%H2O2
0.00%H2O2

图 3B

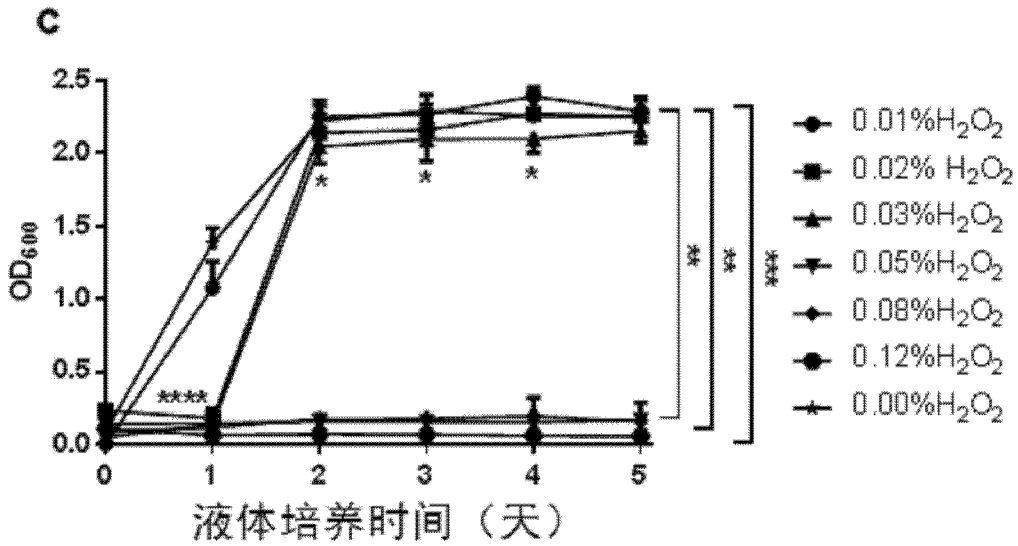

C
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD600
0
1
2
3
4
5
液体培养时间（天）
0.01%H2O2
0.02% H2O2
0.03%H2O2
0.05%H2O2
0.08%H2O2
0.12%H2O2
0.00%H2O2

图 3C

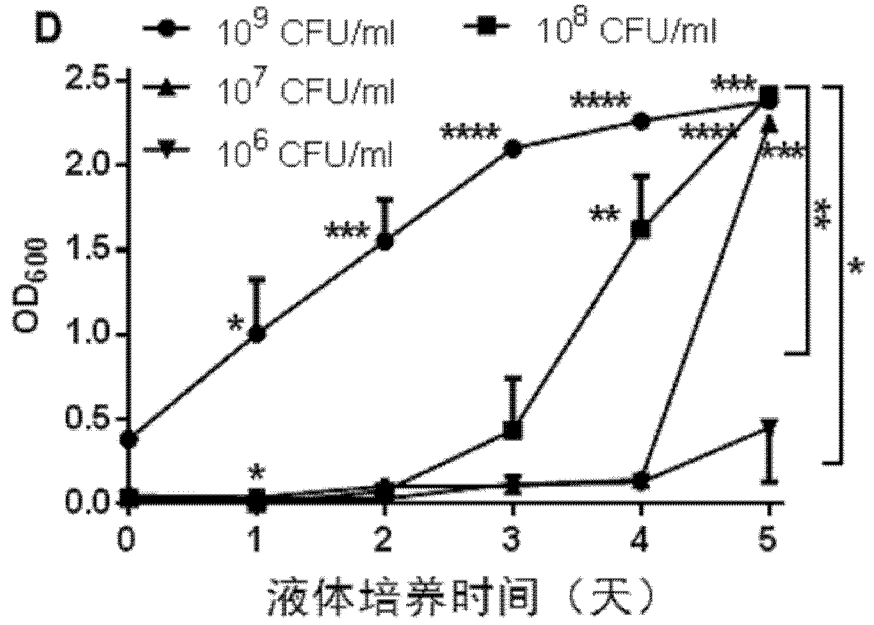

D
10^9 CFU/ml
10^8 CFU/ml
10^7 CFU/ml
10^6 CFU/ml
OD600
液体培养时间（天）

图 3D

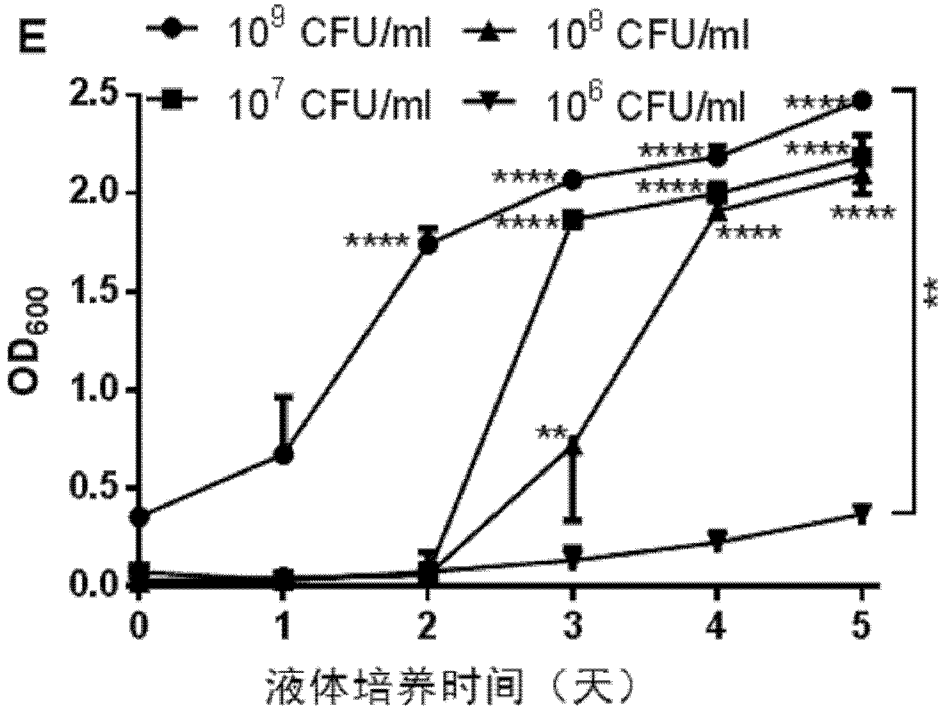

E
10^9 CFU/ml
10^8 CFU/ml
10^7 CFU/ml
10^6 CFU/ml
OD600
液体培养时间（天）

图 3E

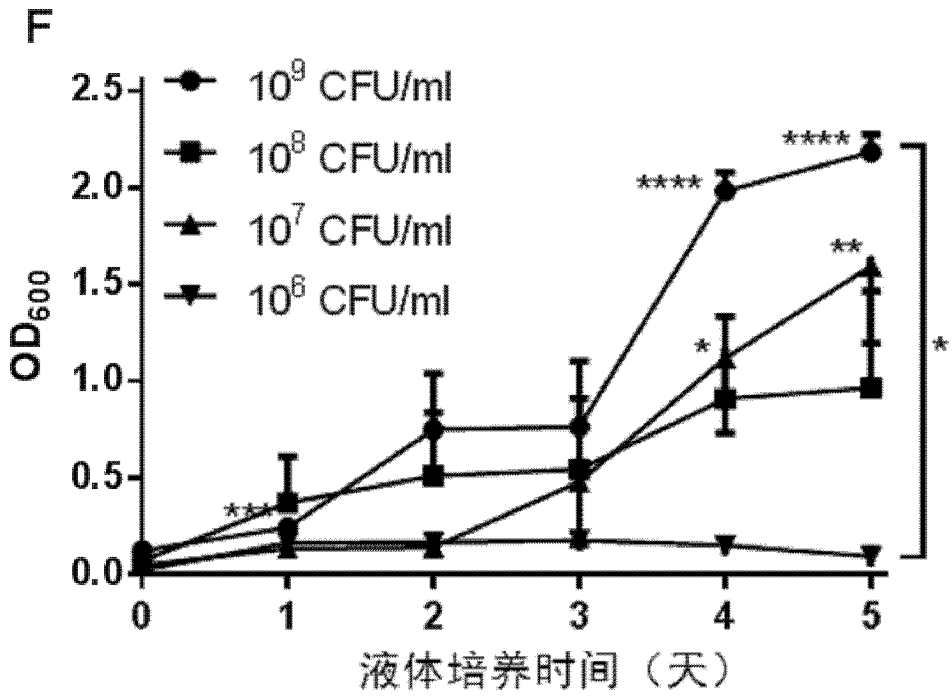

F
10^9 CFU/ml
10^8 CFU/ml
10^7 CFU/ml
10^6 CFU/ml
OD_{600}
液体培养时间（天）

图 3F

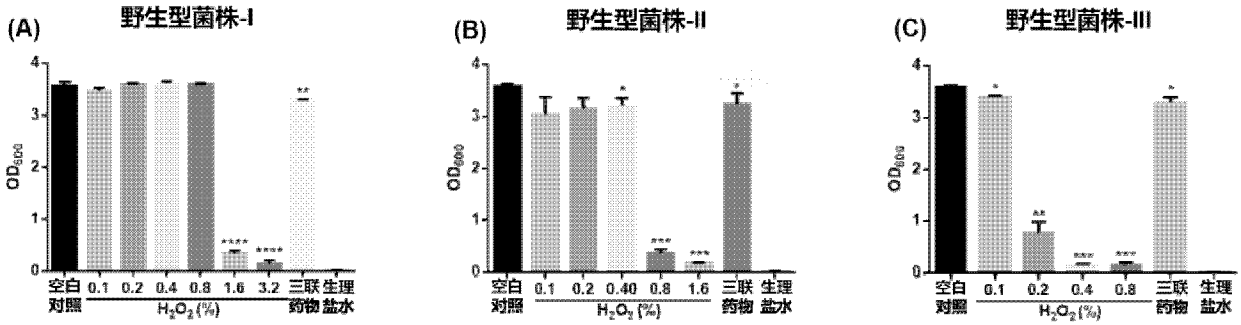

(A)
野生型菌株-I
(B)
野生型菌株-II
(C)
野生型菌株-III
空白对照
三联药物
生理盐水
H_2O_2(%)

图 4

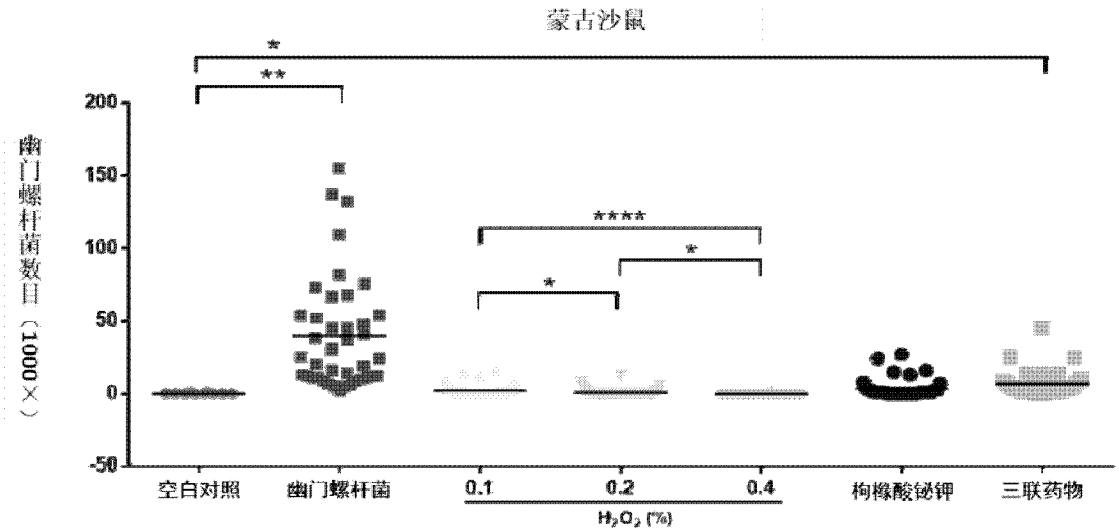

蒙古沙鼠
幽门螺杆菌数目（1000×）
空白对照
幽门螺杆菌
枸橼酸铋钾
三联药物
H_2O_2 (%)

图 5

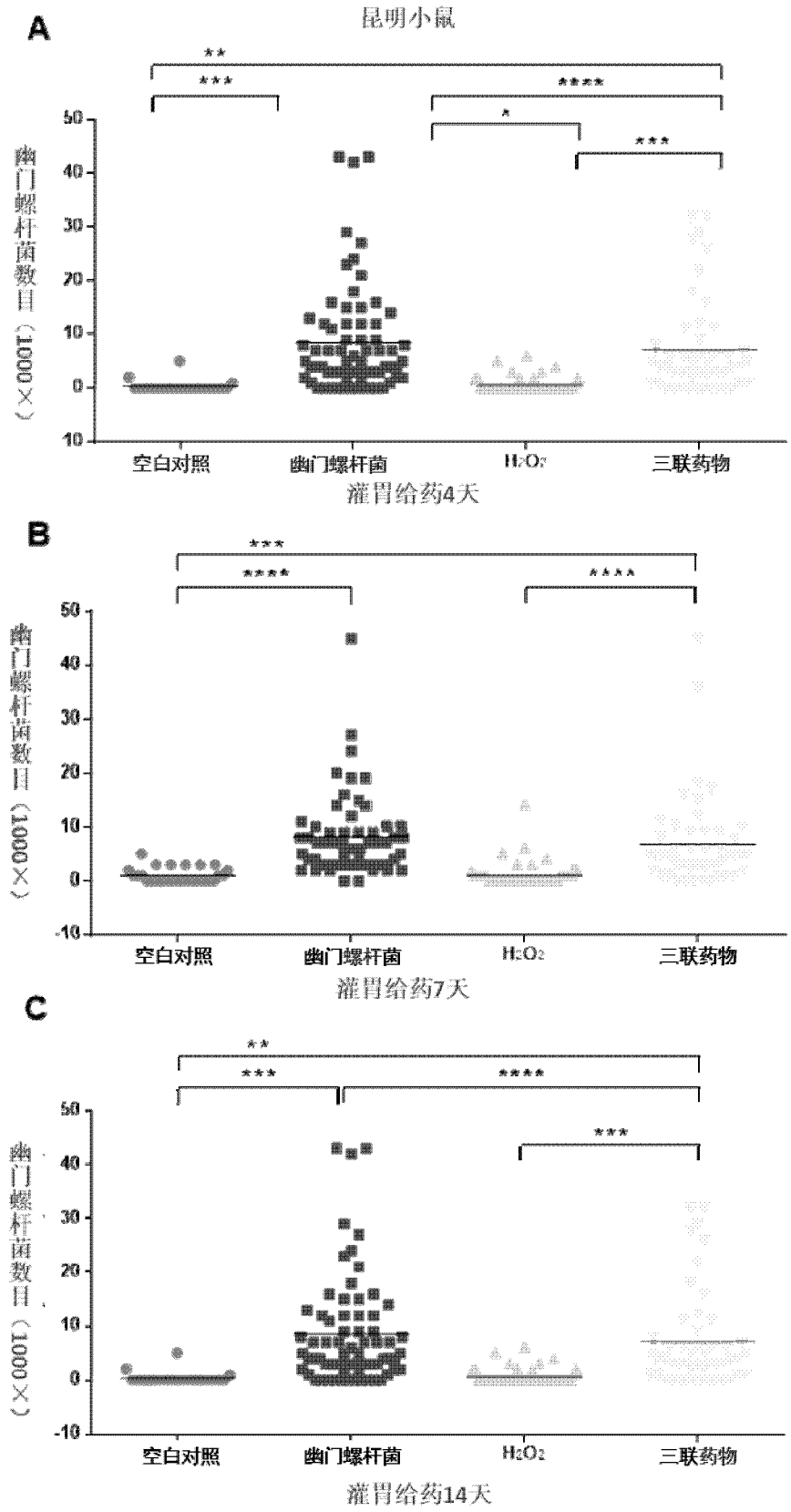

A
昆明小鼠
幽门螺杆菌数目（1000×）
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
灌胃给药4天
B
幽门螺杆菌数目（1000×）
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
灌胃给药7天
C
幽门螺杆菌数目（1000×）
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
灌胃给药14天

图 6

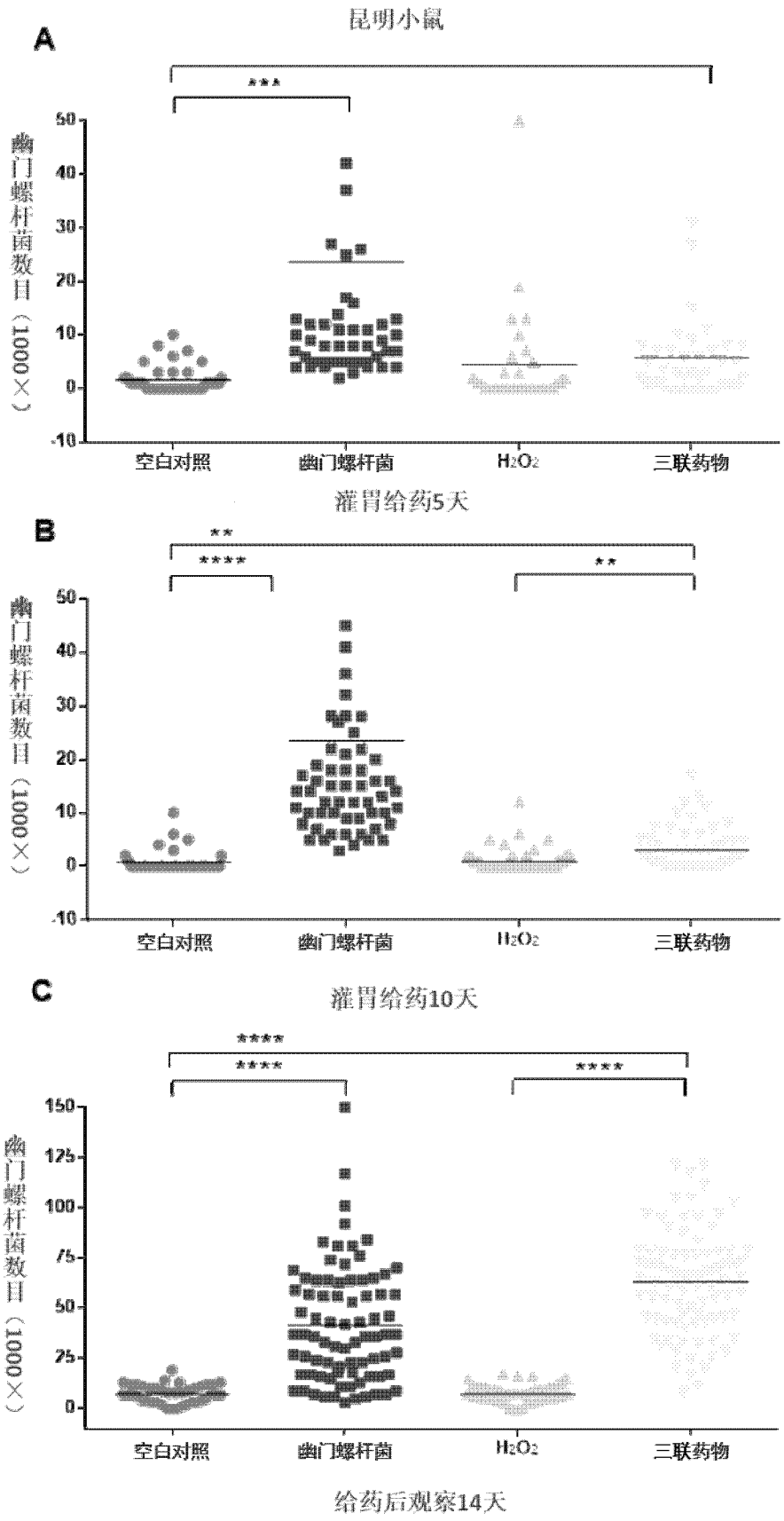

昆明小鼠
A
***
幽门螺杆菌数目（1000×）
50
40
30
20
10
0
-10
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
灌胃给药5天
B
**
****
**
幽门螺杆菌数目（1000×）
50
40
30
20
10
0
-10
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
灌胃给药10天
C
****
****
****
幽门螺杆菌数目（1000×）
150
125
100
75
50
25
0
空白对照
幽门螺杆菌
H2O2
三联药物
给药后观察14天

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/098129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/40(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, VEN, ISI-WEB OF SCIENCE: 过氧化氢, 双氧水, 幽门螺杆菌, 胃炎, 消化性溃疡, 胃粘膜, 胃癌, H2O2, hydrogen dioxide, hydrogen peroxide, dioxogen, oxydol, oxysol, perhydrol, Hp, Helicobacter pylori, Gastritis, peptic ulcer, PU, carcinoma of stomach, gastric cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109223825 A (XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY) 18 January 2019 (2019-01-18) entire document	1-8
X	任滨成等 (REN, Bincheng et al.). "双氧水治疗消化性溃疡21例 (Non-official translation: Treatment of 21 Cases of Peptic Ulcer with Hydrogen Peroxide)" *实用内科杂志 (Chinese Journal of Practical Internal Medicine),* Vol. 9, No. 7, 31 December 1989 (1989-12-31), pp. 337 and 338	1-8
A	刘玉珠等 (LIU, Yuzhu et al.). "立体化治疗消化性溃疡173例临床分析 (The Effect of Three-dimensional Operation for 173 Patients with Peptic Ucer)" *中国医学创新 (Medical Innovation of China),* Vol. 6, No. 35, 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 24 and 25	1-8
A	CN 107519201 A (CHEN, JIALIANG) 29 December 2017 (2017-12-29) entire document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 October 2019	**30 October 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/098129

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 109223825 A	18 January 2019	None	
CN 107519201 A	29 December 2017	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/098129

A. 主题的分类

A61K 33/40(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNTXT, CNKI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, VEN, ISI-WEB OF SCIENCE, 过氧化氢，双氧水，幽门螺杆菌, 胃炎，消化性溃疡，胃粘膜，胃癌，H202，hydrogen dioxide，hydrogen peroxide，dioxogen，、oxydol，oxysol，perhydrol，Hp，Helicobacter pylori, Gastritis，peptic ulcer，PU，carcinoma of stomach，gastric cancer

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109223825 A (西安交通大学) 2019年 1月 18日 (2019-01-18) 全文	1-8
X	任滨成等. "双氧水治疗消化性溃疡21例" 实用内科杂志, 第9卷，第7期，1989年 12月 31日 (1989-12-31)， 337-338页	1-8
A	刘玉珠等. "立体化治疗消化性溃疡173例临床分析" 中国医学创新, 第6卷，第35期，2009年 12月 31日 (2009-12-31)， 24-25页	1-8
A	CN 107519201 A (陈加良) 2017年 12月 29日 (2017-12-29) 全文	1-8

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 10月 16日	2019年 10月 30日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李钢 电话号码 62411207

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/098129

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 109223825 A	2019年 1月 18日	无	
CN 107519201 A	2017年 12月 29日	无	