



(21) 申请号 202080055856.2

(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 114206325 A

(43) 申请公布日 2022.03.18

(30) 优先权数据
1907969.8 2019.06.04 GB
1915280.0 2019.10.22 GB
2005980.4 2020.04.23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/051328 2020.06.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/245573 EN 2020.12.10

(73) 专利权人 三十控股有限公司
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 9/72 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C01B 21/24 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2013/0089629 A1, 2013.04.11
US 2004/0037897 A1, 2004.02.26

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),

G.F Rimmelzwaan et.al. Inhibition of
Influenza Virus Replication by Nitric
Oxide.《International Congress Series》
.2001, 第1219卷

审查员 武文聪

权利要求书4页 说明书70页 附图30页

(54) 发明名称

用于生成一氧化氮的方法和组合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了组合、试剂盒或组合物, 该组合、试剂盒或组合物包括: (i) 一种或多种亚硝酸盐; (2) 质子源, 该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸; 和 (3) 一种或多种有机多元醇。在存在该一种或多种有机多元醇的情况下, 该一种或多种亚硝酸盐与该质子源反应时, 该组合、试剂盒或组合物提供反应产物, 该反应产物包括一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体, 并且该反应产物可用于例如治疗各种病症。

1. 一种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的组合物,所述组合物包括:

(i) 一种或多种亚硝酸盐;

(ii) 质子源,所述质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸;和

(iii) 一种或多种有机多元醇;

其中一种或多种亚硝酸盐、质子源或有机多元醇以水性载体的溶液形式存在;

其中所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:柠檬酸、其盐及其组合;

其中所述质子源的所述一种或多种非羧酸还原酸选自抗坏血酸;棕榈酸抗坏血酸酯;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;以及它们的组合;

其中所述质子源的pH被缓冲至3至6,

其中所述一种或多种有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、及它们的任何组合;

其中所述一种或多种有机多元醇以水性载体的溶液形式存在,并且其中所述溶液中的总的一种或多种有机多元醇的摩尔浓度在0.01M至2M的范围内。

2. 一种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的试剂盒,所述试剂盒包括:

(i) 一种或多种亚硝酸盐;

(ii) 质子源,所述质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸;和

(iii) 一种或多种有机多元醇;

其中一种或多种亚硝酸盐、质子源或有机多元醇以水性载体的溶液形式存在;

其中所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:柠檬酸、其盐及其组合;

其中所述质子源的所述一种或多种非羧酸还原酸选自抗坏血酸;棕榈酸抗坏血酸酯;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;以及它们的组合;

其中所述质子源的pH被缓冲至3至6,

其中所述一种或多种有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、及它们的任何组合;

其中所述一种或多种有机多元醇以水性载体的溶液形式存在,并且其中所述溶液中的总的一种或多种有机多元醇的摩尔浓度在0.01M至2M的范围内。

3. 一种组合物在制备用于治疗创伤的药物中的用途,所述组合物包括:

(i) 一种或多种亚硝酸盐;

(ii) 质子源,所述质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸;和

(iii) 一种或多种有机多元醇;

其中所述组合物通过使所述一种或多种亚硝酸盐与所述质子源的反应生成一氧化氮;

其中一种或多种亚硝酸盐、质子源或有机多元醇以水性载体的溶液形式存在;

其中所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:柠檬酸、其盐及其组合;

其中所述质子源的所述一种或多种非羧酸还原酸选自抗坏血酸；棕榈酸抗坏血酸酯；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；以及它们的组合；

其中所述质子源的pH被缓冲至3至6，

其中所述一种或多种有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇及它们的任何组合；

其中所述一种或多种有机多元醇以水性载体的溶液形式存在，并且其中所述溶液中的总的一种或多种有机多元醇的摩尔浓度在0.01M至2M的范围内。

4. 根据权利要求3所述的用途，所述用途为在制备用于治疗皮肤损伤的药物中的用途。

5. 根据权利要求3所述的用途，所述用途为在制备用于治疗烧伤的药物中的用途。

6. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其化学物质基本上由所述组分(i)、(ii)和(iii)和水和pH缓冲液组成。

7. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其化学物质由所述组分(i)、(ii)和(iii)以及水和pH缓冲液和/或一种或多种附加组分组成，所述一种或多种附加组分的量为所述组合、所述试剂盒的化学成分或所述组合物的小于20重量%或体积%。

8. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其中所述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 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 及它们的任何混合物。

9. 根据权利要求8所述的组合物、试剂盒或用途，其中所述一种或多种亚硝酸盐是 NaNO_2 、 KNO_2 或它们的混合物。

10. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其中所述一种或多种亚硝酸盐以干燥形式存在。

11. 根据权利要求10所述的组合物、试剂盒或用途，其中所述一种或多种亚硝酸盐以颗粒干燥形式存在。

12. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3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一氧化氮生成反应体系的任何组分以水性载体的溶液形式存在。

13. 根据权利要求12所述的组合物、试剂盒或用途，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一氧化氮生成反应体系的任何组分以水性液体或凝胶的溶液形式存在。

14. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其中所述溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在0.001M至5M的范围内。

15. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3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一氧化氮生成反应体系的任何组分的pH被缓冲至3至6。

16. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途，其中所述质子源包括选自抗坏血酸及其盐的所述有机非羧酸还原酸。

17. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3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一氧化氮生成反应体系的任何组分以水性载体的溶液形式存在。

18. 根据权利要求17所述的组合物、试剂盒或用途,其中所述质子源或其组成部分或含有所述质子源的一氧化氮生成反应体系的任何组分以水性液体或凝胶的溶液形式存在。

19. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途,其中所述溶液中的质子源的摩尔浓度在0.001M至5M的范围内。

20. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途,其中所述水性载体为水性液体或凝胶。

21. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途,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、赋形剂、甜味剂、掩味剂、增稠剂、稠化剂、润湿剂、成膜剂、润滑剂、粘合剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、芳香剂、包衣剂、抗氧化剂、药物活性剂、防腐剂及它们的任何组合。

22. 一种分配器,所述分配器用于分配一氧化氮和/或根据权利要求1、6-21中任一项所述的组合物,所述组合物包括:如所述权利要求中所定义的(i)类、(ii)类和(iii)类的组分化学物质;至少一个用于在使用前容纳所述组分的容器;至少一个用于控制所述组分的混合并将所述反应混合物、其一种或多种组分和/或逸出气体从所述分配器中分配出来并将其引导至靶标的设备或其他装置。

23. 根据权利要求22所述的分配器,其中所述分配器适于重复类似的分配所述反应混合物、其一种或多种组分、包含所述反应混合物的载体、包含所述反应混合物的一种或多种组分的载体和/或所述逸出气体的动作。

24. 根据权利要求22或23所述的分配器,其中所述分配器包括泵或推进剂系统以将包括所述一氧化氮生成反应混合物、其所述组分中的一种或多种组分或所述逸出气体的组合物从所述分配器中排出并将其引导至靶标。

25. 根据权利要求22所述的分配器,其中所述分配器适于将所述反应混合物、其一种或多种组分、包含所述反应混合物的载体、包含所述反应混合物的一种或多种组分的载体和/或所述逸出气体引导至为细胞、器官、受试者或其内部空间的靶标。

26. 根据权利要求1所述的组合物或根据权利要求2所述的试剂盒或根据权利要求3所述的用途或根据权利要求22所述的分配器,以及由此生成或分配的一氧化氮,其中:

- 所述一种或多种亚硝酸盐包括一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐;

- 所述质子源包括抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合;

- 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/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合的分子不与聚合物或大分子共价键合;

- 所述一种或多种有机多元醇包括山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇或它们的两种或更多种的任何组合;

- 在所述一氧化氮生成反应开始时或开始之前,所述多元醇组分或反应液中的所述一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于所述亚硝酸根离子的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间;

-在所述一氧化氮生成反应开始时,所述多元醇组分或所述反应液中的所述一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于所述质子源组分或所述反应液中的所述质子源的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间;

-对于不涉及所述反应混合物与细胞或动物皮肤、器官或其他组织之间的接触的应用,在引发或是即将引发所述一氧化氮生成反应之前,所述质子源的pH在3.0至6.0的范围内;

-对于涉及所述反应混合物与细胞或动物皮肤、器官或其他组织之间的接触的应用,在引发或是即将引发所述一氧化氮生成反应之前,所述质子源的pH在4.0至6.0的范围内;

-对于涉及所述反应混合物与动物受试者的鼻、口、呼吸道或肺之间的接触的应用,在引发或是即将引发所述一氧化氮生成反应引发之前,所述质子源的pH在5.0至6.0的范围内。

27.一种双组分体系,所述双组分体系包括:

a) 一个或多个网,所述一个或多个网吸入、浸渍或涂覆有一种或多种亚硝酸盐;和

b) 水凝胶,所述水凝胶包含质子源,所述质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸,

其中组分(a)与组分(b)分开,并且其中组分(a)和(b)中的一者或多者还包含一种或多种有机多元醇;

其中所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:柠檬酸、其盐及其组合;

其中所述质子源的所述一种或多种非羧酸还原酸选自抗坏血酸;棕榈酸抗坏血酸酯;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;以及它们的组合;

其中所述质子源的pH被缓冲至3至6,

其中所述一种或多种有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、及它们的任何组合;

其中所述一种或多种有机多元醇以水性载体的溶液形式存在,并且其中所述溶液中的总的一种或多种有机多元醇的摩尔浓度在0.01M至2M的范围内。

用于生成一氧化氮的方法和组合物及其用途

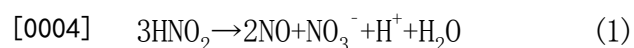
技术领域

[0001] 本发明涉及用于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的方法和组合物及其用途,诸如用于将一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至生物体和微生物,例如以治疗对一氧化氮有响应的病症。

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得到广泛研究。一氧化氮是一种强效血管扩张剂,其由血管内皮细胞合成并释放,并且在调节尤其是血管局部阻力和血流方法方面发挥重要作用。在哺乳动物细胞中,一氧化氮主要与L-瓜氨酸一起通过L-精氨酸的酶促氧化作用产生。一氧化氮还通过一种似乎独立于NO合酶的机制从皮肤释放。一氧化氮还参与血小板和白细胞聚集和粘附的抑制、细胞增殖的抑制、超氧化物自由基的清除和内皮层渗透性的调节。一氧化氮在癌症治疗中的作用在Biochemistry (Moscow),第63卷(第7期),第802-809页(1998年)中进行了讨论,其公开内容通过引用方式并入本文。研究已表明,一氧化氮具有抗微生物特性,如F C Fang在J.Clin.Invest.,第99卷(第12期),第2818-2825页(1997年)中所综述,并且如例如W0 95/22335和W002/20026(阿伯丁大学)中所述,它们的公开内容通过引用方式并入本文。用于生成一氧化氮、其他氮氧化物及其前体的体系的其他已知用途和应用在下文本发明的描述中给出。

[0003] 在一氧化氮、其他氮氧化物及其前体的有效生成和递送至生物体和细胞用于治疗方面仍然存在许多问题。广泛采用的用于生成一氧化氮的体系主要使用无机酸酸化亚硝酸盐初步产生与起始亚硝酸盐等摩尔量的亚硝酸(HNO_2),然后亚硝酸很容易分解为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(1)表示:



[0005] 传统的做法是在pH小于4的条件下酸化亚硝酸盐(通常在此条件下有利于亚硝酸的形成)以设法使NO的产量最大化。然而,pH<4的条件不适合在体内使用,因为酸会在体内与动物组织接触。pH较高对细胞和活体体系更有利,但在pH大于4时,现有体系并未产生令人满意的NO产量。为了增加pH值在4以上时的NO的生成量,需要大量的亚硝酸盐,这在治疗应用中是不现实的,也不经济。此外,由于亚硝酸的半衰期短,由方程(1)表示的转化不易控制,因此难以控制用于治疗用途的一氧化氮的释放。一种或多种亚硝酸盐与质子源生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应在本文中称为“NO_x生成反应”或“生成NO_x的反应”或类似用语,并且“NO_x”用于指亚硝酸盐的酸化产物,特别是一氧化氮、其他氮氧化物和其前体,这些产物既可以是单独形式也可以是任何组合的共同形式。应当理解,所生成的NO_x中的每种组分都可以气体的形式逸出,或可进入反应混合物的溶液中,或可先进入溶液中,随后以气体的形式逸出,或它们的任何组合。

[0006] W0 00/53193描述了一种用于治疗皮肤局部缺血并促进创伤愈合的乳膏或软膏,其中质子源是抗坏血酸,其公开内容通过引用方式并入本文。实施例1描述了基于KY JellyTM的凝胶,并且在实施例7中,该凝胶在与皮肤直接接触和皮肤被膜保护的情况下都

进行了测试。要求保护的是抗坏血酸避免明显的皮肤炎症的用途(WO 00/53193,第2页)。然而实际上,当凝胶直接接触皮肤时,因凝胶的pH较低导致的皮肤炎症其程度不在预期范围内,并且当皮肤保护膜存在时,凝胶的作用被削弱。因此该凝胶并未上市。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的耐药性感染的皮肤制剂,其中质子源是柠檬酸或水杨酸,其公开内容通过引用方式并入本文。由双筒分配器分配含亚硝酸盐的组合物和含酸的组合物,然后将这些组合物混合以使酸与亚硝酸盐反应,然后将其涂抹到皮肤上。提出了丙二醇和聚乙二醇是任选的防腐剂,甘油(丙三醇)是任选的触变剂,与亚硝酸盐组合物一起使用。丙二醇用于一对分别为柠檬酸和亚硝酸盐的乳膏中,这对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)。甘油与鲸蜡硬脂醇一起用于一对分别为柠檬酸和亚硝酸盐的洗剂中,这对洗剂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)。反应混合物的优选pH是5以下,特别是4以下,这可能会引起不良的皮肤炎症。还提出了鼻喷雾剂,其可以使用还原酸诸如抗坏血酸盐或抗坏血酸棕榈酸盐,从而可以使用较高的pH值来避免刺激敏感的鼻粘膜。然而,公认的是(WO 02/20026,第16页,第二段)较高的pH将减慢反应。

[0008] US 6103275(公布日期:2000年8月15日)描述了使用还原剂诸如抗坏血酸和pKa在1和4之间的有机酸诸如马来酸来酸化亚硝酸盐,其公开内容通过引用方式并入本文。粘性(凝胶)组合物用于减缓反应产物的释放以供局部使用。酸和亚硝酸盐在开始生成一氧化氮之前始终是分开的,并规定还原剂包含在第一和第二凝胶中的至少一者中。该方法应使用的pH范围未指明。然而,缓冲液组分被称为酸这一事实可能表明这些化合物主要以质子化形式存在,因此组合物的pH应基本上低于4。pKa在1和4之间的酸的存在确保了制剂在该pH下的良好缓冲能力。虽然掺入此类酸是一种确保将pH保持在一定水平以使亚硝酸盐转化成一氧化氮的持续效率得以保持的简便方法,但是低pH值会在与皮肤接触时引起非常大的不良皮肤刺激。US 6103275的组合物不含多元醇。

[0009] WO 2003/013489提议将3%聚乙烯醇(PA)作为凝胶基质分别用于柠檬酸和亚硝酸盐,后两者再原位混合在一起(WO 2003/013489,实施例7),其公开内容通过引用方式并入本文。然而,试验数据(WO 2003/013489,表11和12)表明,PA无法形成凝胶,并且PA组合物不能混合在一起或一起使用。除了上述提议(未落实到最终组合物)外,WO2003/013489的组合物不含多元醇。

[0010] 美国专利申请2005/0037093描述了基于亚硝酸反应生成一氧化氮的组合物,并提及了任选的赋形剂,包括聚乙烯醇、丙二醇和聚乙二醇,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0011] 中国专利申请CN 101028229描述了通过亚硝酸盐与酸反应生成一氧化氮的化妆品,其公开内容通过引用方式并入本文。提出了任选使用除其他物质之外的甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为附加成分。在一个具体的实施例中进一步提及羟乙基胺作为成分。

[0012] 中国专利申请CN 101062050描述了通过亚硝酸盐与酸反应生成一氧化氮的促毛发生长产品,其公开内容通过引用方式并入本文。提出了任选使用除其他物质之外的甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为附加成分。在具体的实施例中提及D-泛醇以及泛醇和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,其任选地含有例如选自多元醇和聚乙二醇的极性溶剂(第[0055]和[0056]段),其公开内容通过引用方式并入本文。规定了具体的多元醇为丙二醇、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。提及有关许多聚合剂的列表中的聚乙烯醇、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]段中还提及多元醇诸如甘油(丙三醇)、丙二醇、己二醇、二甘醇和丙二醇,以及乙二醇、己二醇、其他二醇,以及聚乙二醇作为任选的渗透增强剂。

[0014] WO 2009/019498描述了pKa不在1和4之间的非硫醇还原剂作为除亚硝酸盐和质子源之外的组分的用途,其公开内容通过引用方式并入本文。规定了非硫醇还原剂的示例是碘阴离子、丁基化氢醌、生育酚、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯和 β -胡萝卜素。除了丁基化氢醌之外,WO 2009/019498的组合物不含多元醇。

[0015] WO 2014/188174和WO 2014/188175描述了一种用于皮肤损伤的敷料系统体系和透皮递送体系,其中质子源是包含共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸和磺酸基团的水凝胶,其公开内容通过引用方式并入本文。与皮肤接触的初层是吸入了亚硝酸盐的聚丙烯网。当将网置于皮肤上并将水凝胶覆盖在网上作为顶层时,发现酸和亚硝酸盐的反应产物被很好地递送至皮肤而不会对皮肤造成不可接受的刺激。在WO 2014/188175中公开了另一种接触皮肤的初层,其例如由聚乙烯醇形成并含有亚硝酸盐的可溶解薄膜。在这两篇参考文献中都提出了水凝胶可以包含甘油,其目的没有说明。然而,众所周知,甘油是作为增塑剂加入到这类水凝胶中的(参见例如,WO 00/06215,第14页,其公开内容通过引用方式并入本文)。参考文献公开了不存在某些含羟基的成分,特别是1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、抗坏血酸和丁基化氢醌的优选项。

[0016] 美国专利申请2014/0335207描述了一种局部混合物,其在“亚硝酸盐介质”和“酸化介质”混合时产生一氧化氮,其公开内容通过引用方式并入本文。在第[0050]-[0055]段中描述了“亚硝酸盐介质”的具体实施方案,其中亚硝酸盐与一种或多种多元醇组分共同存在。第[0054]和[0055]段中描述的一般亚硝酸盐介质含有选自甘油、硬脂酸甘油酯、辛甘醇、乙基己基甘油和己二醇的多元醇,而其他段落中描述的具体实施方案含有上述一些物质和丁二醇。这些多元醇也是第[0056]-[0062]段中所述的“酸化介质”的实施方案的组分。

[0017] 美国专利申请2015/0030702描述了一种基于亚硝酸盐-酸反应的皮肤敷料,其公开内容通过引用方式并入本文。该皮肤敷料包括一种非硫醇还原剂,诸如氢醌或丁基化氢醌。该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2017/0209485描述了一种用于局部施加泡沫或浆液载体中的一氧化氮的装置和方法,其公开内容通过引用方式并入本文。甘油和(未指明的)“甘油样组分”作为任选添加剂增加表面张力和/或降低蒸气压的用途描述于第[0070]段中。

[0019] 美国专利申请2019/0134080描述了一种用于将一氧化氮生成体系以多部分组合物形成的泡沫的形式局部施用于皮肤的组合物和方法,该多部分组合包括含有至少一种亚硝酸盐反应物的第一溶液和含有至少一种酸性反应物的第二溶液,其公开内容通过引用方式并入本文。还描述了用于容纳、充入和分配泡沫形式组合的组分的设备。提及了甘油作为任选添加剂增加表面张力和/或降低蒸气压的用途(第[0068]段)。

[0020] 本发明基于我们意想不到的发现,即在存在一种或多种有机多元醇的情况下,使用包含选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸作为亚硝酸盐酸化剂的质子源,可以比以往更有效地生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体(统称为NO_x),并具有更高的反应产出量。此外,研究发现使用有机还原酸作为亚硝酸盐酸化剂的这类反应体系的有效抗菌的反应产物可在使用或不使用一种或多种有机多元醇的情况下,在生理上可耐受的pH下,例如介于约5和约8之间的pH下进行递送,使在此类pH值下操作的反应体系可作为具有有益生理活性(诸如体内抗微生物活性)的成分直接传递。研究已发现,作为本发明基础的一氧化氮生成方法任选地在初期大量生成NO_x之后,在较长时间内,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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体,从而可能在医学和其他应用中具有重要用途。如果不需要初期大量生成,则可以在引发NO_x生成反应后的一段时间后,例如引发NO_x生成反应后约10分钟、30分钟或一小时或更长时间,将反应混合物施用给受试者。

发明内容

[0021] 本发明提供了用于生成一氧化氮和任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的体系、方法、组合、试剂盒和组合物。这些体系、方法、组合、试剂盒和组合物包括作为反应物的一种或多种亚硝酸盐和质子源,该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸。这些体系、方法、组合、试剂盒和组合物还包括一种或多种有机多元醇。使用还原酸(即,羧酸还原酸和非羧酸还原酸)可以使一氧化氮和任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体在pH稍高于4,例如5-8的条件下生成。本发明还提供了用于抗微生物用途的体系、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,并且反应在质子源的起始pH为5-8的条件下进行。

[0022] 根据第一方面,本发明提供了一种用于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的方法,该方法包括使一种或多种亚硝酸盐与质子源在适于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应条件下反应,该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸,其中该反应在存在一种或多种有机多元醇的情况下进行;

[0023] 其特征在于以下一项或多项:

[0024] (a) 该一种或多种有机多元醇以反应产出提高量存在;

[0025] (b) 该质子源不仅仅是包含共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸基团的水凝胶;

[0026] (c) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0027] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0028] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0029] (f) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0030] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0031] (h) 上述(b)至(g)中的任何一项或多项,其中“不仅仅”一词替换为“不包括”;

[0032] (i) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0033] (j) 该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(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0034] 通过根据本发明第一方面的方法制备的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体构成了本发明的第二方面。

[0035] 根据第三方面,本发明提供了一种提高一种或多种亚硝酸盐与质子源生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应产出的方法,该方法包括使用包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸的质子源,以及在存在反应产出提高量的一种或多种有机多元醇的情况下进行反应。反应产出的提高是与在相同条件下但不含一种或多种有机多元醇的情况下进行的反应相比。

[0036] 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提高一种或多种亚硝酸盐与质子源在该反应混合物中生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应产出的用途,其中该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸中的一种或多种酸。反应产出的提高是与在相同条件下但不含一种或多种有机多元醇的情况下进行的反应相比。

[0037] 根据第五方面,本发明提供了一种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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的组合、试剂盒或组合物,该组合、试剂盒或组合物包括:

[0038] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0039] (ii) 质子源,该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸;和

[0040] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0041] 其特征在于以下一项或多项:

[0042] (a) 该一种或多种有机多元醇以反应产出提高量存在;

[0043] (b) 该质子源不仅仅是包含共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸基团的水凝胶;

[0044] (c) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0045] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0046] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0047] (f) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0048] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0049] (h) 上述(b)至(g)中的任何一项或多项,其中“不仅仅”一词替换为“不包括”;

[0050] (i) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0051] (j) 该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(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0052] 当质子源包括含有共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸基团的水凝胶并且组合或试剂盒包括两种或更多种单独的组合物时,优选地,一种或多种多元醇不存在于与该水凝胶直接接触或混合的单独的组合物中。

[0053] 本发明第五方面的组合、试剂盒或组合物的化学物质可以例如基本上由上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选的水和/或pH缓冲液组成。表述“基本上由……组成”可以例如允许少量的一种或多种附加组分存在,前提条件是上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选的水和/或pH缓冲液的作用不受到不利影响。该一种或多种附加组分的总量可以适当地为组合、试剂盒的化学成分或组合物的小于约20重量%或体积%,例如小于约15重量%或体积%,例如小于约10重量%或体积%,例如小于约5重量%或体积%。

[0054] 该组合、试剂盒或组合物的化学物质可以例如由上述组分(i)、(ii)和(iii)以及任选的水和/或pH缓冲液和/或一种或多种附加组分组成,该一种或多种附加组分的量为该组合、该试剂盒的化学成分或该组合物的小于约20重量%或体积%,例如小于约15重量%或体积%,例如小于约10重量%或体积%,例如小于约5重量%或体积%。

[0055] 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,该组合、试剂盒或组合物包括:

[0056] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0057] (ii) 质子源,该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸;和

[0058] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0059] 该方法包括使组分(i)、(ii)和(iii)相互接近以形成该组合或试剂盒,或者混合以形成该组合物;

[0060] 其特征在于以下一项或多项:

[0061] (a) 该一种或多种有机多元醇以反应产出提高量存在;

[0062] (b) 该质子源不仅仅是包含共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸基团的水凝胶;

[0063] (c) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0064] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0065] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0066] (f) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0067] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0068] (h) 上述 (b) 至 (g) 中的任何一项或多项,其中“不仅仅”一词替换为“不包括”;

[0069] (i) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0070] (j) 该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(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0071] 本文所用的表述“组合”是指相互接近并一起使用的单独的物质或组合物(称为“组分”)。可以在多个阶段实现组分的接近,其中先使一些但并非所有组分合在一起形成子组合或者部分组合,随后使其与一种或多种其他组分或者其他子组合或者部分组合接近。“接近”可包括紧密混合物、溶液或悬浮液,或可表示不等于紧密混合物、溶液或悬浮液的紧密物理接近,例如在试剂盒的单独容器中,各组分一起提供以便于以后使用。例如,分别包括一种或多种亚硝酸盐(或它们中的一些)和一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸(或它们中的一些)的亚硝酸盐组分和质子源组分可以单独储存或储存在试剂盒的单独容器中,并通过混合而合在一起使用,以引发NO_x生成反应。一种或多种有机多元醇可以在亚硝酸盐组分和质子源组分之一或两者中提供,或者可以单独在有机多元醇组分中提供,当引发NO_x生成反应时,有机多元醇组分也被混合。这些组分中的任何一种或多种组分本身可以存在于多个部分和多个容器中。该组合可以立即引发NO_x生成反应的方式接近,例如,亚硝酸盐和质子源在同一溶液中,因此能够反应。另选地,该组合可以不立即引发NO_x生成反应,而是在引发之前需要进行一个或多个其他步骤或动作的方式接近,例如亚硝酸盐和质子源是干粉混合物或以包封颗粒形式存在,因此它们在NO_x生成反应开始之前需要水(例如来自与该组合接触的粘膜)。

[0072] 在实施方案中,本发明的第一至第六方面可以彼此独立地仅由上述特征(a)表征,或仅由特征(b)表征,或仅由特征(c)表征,或仅由特征(d)表征,或仅由特征(e)表征,或仅由特征(f)表征,或仅由特征(g)表征,或仅由引用(b)的特征(h)表征,或仅由引用(c)的特征(h)表征,或仅由引用(d)的特征(h)表征,或仅由引用(e)的特征(h)表征,或仅由引用(f)的特征(h)表征,或仅由引用(g)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(b)表征,或由引用特征(a)和(b)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(c)表征,或由引用特征(a)和(c)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(d)表征,或由引用特征(a)和(d)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(e)表征,或由引用特征(a)和(e)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(f)表征,或由引用特征

(a)和(f)的特征(h)表征,或仅由特征(a)和(g)表征,或由引用特征(a)和(g)的特征(h)表征,或仅由特征(b)和(c)表征,或由引用特征(b)和(c)的特征(h)表征,或仅由特征(b)和(d)表征,或由引用特征(b)和(d)的特征(h)表征,或仅由特征(b)和(e)表征,或由引用特征(b)和(e)的特征(h)表征,或仅由特征(b)和(f)表征,或由引用特征(b)和(f)的特征(h)表征,或仅由特征(a)、(b)、(c)和(f)表征,或由引用特征(a)、(b)、(c)和(f)的特征(h)表征,或由特征(a)至(g)的全部特征表征,或由特征(a)和(b)连同引用(c)至(g)的全部特征的特征(h)表征。

[0073] 在其他实施方案中,本发明的第一至第六方面可以彼此独立地仅由上述特征(c)、(f)和(i)表征,或仅由特征(c)、(f)和(j)表征,或由引用特征(c)和(f)的特征(i)和(h)表征,或由引用特征(c)和(f)的特征(j)和(h)表征,或仅由特征(d)、(g)和(i)表征,或仅由特征(d)、(g)和(j)表征,或由引用特征(d)和(g)的特征(i)和(h)表示,或由引用特征(d)和(g)的特征(j)和(h)表示,或仅由特征(e)、(f)和(i)表征,或仅由特征(e)、(f)和(j)表征,或由引用特征(e)和(f)的特征(i)和(h)表征,或由引用特征(e)和(f)的特征(j)和(h)表征。

[0074] 优选地,本发明的第一至第六方面由特征(a)至(g)的全部特征表征,或由特征(a)和(b)连同引用特征(c)至(g)的全部特征的特征(h)表征,或仅由特征(c)、(f)和(i)表征,或仅由特征(c)、(f)和(j)表征,或由引用特征(c)和(f)的特征(i)和(h)表征,或由引用特征(c)和(f)的特征(j)和(h)表征,或仅由特征(d)、(g)和(i)表征,或仅由特征(d)、(g)和(j)表征,或由引用特征(d)和(g)的特征(i)和(h)表征,或由引用特征(d)和(g)的(j)和(h)表征,或仅由特征(e)、(f)和(i)表征,或仅由特征(e)、(f)和(j)表征,或由引用特征(e)和(f)的特征(i)和(h)表征,或由引用特征(e)和(f)的特征(j)和(h)表征。应当注意,当特征(c)和(f)表征本发明时,特征(d)、(e)和(g)是冗余的;在这种情况下,特征(d)、(e)和(g)(或引用特征(d)、(e)和(g)的特征(h))可以从列表中省略,并且认为是表征特征(c)和(f)(或引用特征(c)和(f)的特征(h))的示例。

[0075] 本文所用的表述“反应产出提高量的一种或多种有机多元醇”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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一者的量和/或产出时间段高于在相同条件下但不含一种或多种有机多元醇的情况下进行反应的情况。表述“量”特别是指每克亚硝酸盐在起始反应体系中反应逸出的气态一氧化氮的总质量。作为本发明基础的实验工作已经测量了逸出的气态一氧化氮(任选地还有其他气体)的量,并发现这些气体的逸出量得到了提高。由此,据信本发明提高了生成的 NO_x 的总质量,因此表述“量”也可以理解为包括进入反应混合物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。表述“产出时间段”特别是指反应完成之前至少一种气态一氧化氮(任选地还有其他气体)在反应中逸出的时间长度。出于与上文在短语“反应产出提高量的一种或多种有机多元醇”的讨论中所解释的相同的原因,据信短语“产出时间段”还包括一氧化氮进入反应混合物的溶液中的时间长度以及 NO_x 反应产物生成的时间长度。众所周知,亚硝酸盐最终通过与质子源反应而耗尽,pH(在 NO_x 生成反应期间升高)达到最大值,反应停止。优选地,本发明第一方面的方法将 NO_x 生成反应的产量,特别但不完全是产生的 NO 的量,例如产生的气态 NO 的量,提高了至少约5%,例如至少约10%,例如至少约25%,例如提高程度达约150%,例如提高程度达约125%,例如提高程度达约100%,例如提

高程度达约75%。优选地,本发明第一方面的方法将反应完成之前一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一者,优选一氧化氮在反应中逸出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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一种,优选一氧化氮、最优选气态一氧化氮逸出,特别是以有效量逸出的时间段可以增加至少约2小时,例如至少约5小时,例如最高或超过约10小时。一氧化氮放出的时间增加程度可以表示例如在不使用多元醇组分的情况下,相同数量一氧化氮逸出时间段的约150%的增加程度,例如约125%的增加程度,例如约100%的增加程度,例如约75%的增加程度。

[0076] 一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的前体的生成可以用于任何目的。下面举例说明和讨论治疗和非治疗目的。

[0077] 根据第七方面,本发明提供了一种将一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至靶位置,例如任何细胞、器官、表面、结构、受试者或其内部空间的治疗或非治疗方法,该方法包括(a)向该靶位置或其附近施用根据本发明第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本发明第一或第三方面的方法,或实施根据本发明第四方面的用途,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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至该靶位置或其附近;或(c)将根据本发明第二方面的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至该靶位置或其附近。

[0078] 本发明第七方面的方法可以是例如治疗有此需要的受试者的微生物感染的方法。受试者可以是例如人受试者或其他哺乳动物受试者。微生物感染可以是例如细菌、病毒、真菌、微寄生虫或它们的任何组合。

[0079] 本发明第七方面的方法可以是例如对受试者进行血管舒张的方法。受试者可以是例如人受试者或其他哺乳动物受试者。

[0080] 本发明第七方面的方法可以是例如抗微生物方法。抗微生物方法可以用于减少一个位点处的微生物,例如细菌、病毒、真菌细胞和/或微寄生虫的数量,以防止其增殖或限制其增殖速率。这种方法靶向的微生物可以是例如浮游细胞或颗粒,或者以生物膜或其他菌落的形式存在。本发明靶向的任何浮游或非浮游微生物群可由一种微生物种类或菌株组成,或可包含多于一种的种类或菌株。

[0081] 根据第八方面,本发明提供了一种用于治疗的根据本发明第五方面的组合、试剂盒或组合物,或根据本发明第二方面的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的组合、试剂盒或组合物。

[0082] 根据本发明第八方面的所用组合、试剂盒或组合物或一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体可以例如用于向受试者或其内部空间递送一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的治疗方法,该方法包括(a)向该受试者或内部空间或其附近施用根据本发明第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本发明第一或第三方面的方法,或实施根据本发明第四方面的用途,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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至该受试者或内部空间或其附近;或(c)将根据本发明第二方面的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至该受试者或

内部空间或其附近。

[0083] 根据本发明,我们惊奇地发现,当质子源是初始pH值在5-8的范围内的柠檬酸(有机羧酸)或抗坏血酸(有机非羧酸还原酸)时,还提供了在生物静力和生物杀伤作用方面的良好抗微生物活性,这通过脓肿分枝杆菌3天后达100%的杀灭率和/或结核分枝杆菌、H1N1流感病毒、SARS-CoV病毒和SARS-CoV-2病毒的杀灭率得以证明。本文中表述“初始pH”是指在反应混合物中存在会影响该初始pH的其他组分之前,初始形成的包括任何所需pH缓冲液的质子源水溶液的pH。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,尽管其似乎因一种或多种有机多元醇例如甘露糖醇或山梨糖醇的存在而增强。酸(例如柠檬酸或抗坏血酸)具有在5-8范围内的初始pH的NO_x生成反应产物具有强抗微生物作用,这一发现尤其令人惊奇,并且提供了在呼吸道和肺部感染,包括难以治疗和/或耐抗生素的呼吸道和肺部感染,包括结核病、耐多药结核病和非结核分枝杆菌感染的治疗过程中潜力较大的应用。拟通过吸入含有pH在5-8范围内的反应混合物或其组分或前体的雾化水性组合物来进行此类感染的治疗。本发明也能实现对包括多种病原体,可能包括来自细菌、病毒、真菌和寄生虫中多于一者的病原体的感染的治疗,其称为“广谱”治疗(包括对有生命和无生命的表面和空间的治疗和/或预防治疗以及体外治疗,以防止病原体的传播)。

[0084] 根据第九方面,本发明提供了一种对根据第七方面的抗微生物方法的改进,该改进包括(a)向待靶向的微生物或其附近,或者向感染微生物的受试者或该受试者的内部空间施用根据本发明第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本发明第一或第三方面的方法,或实施根据本发明第四方面的用途,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、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此生成的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至待靶向的微生物或其附近,或递送至感染微生物的受试者或该受试者的内部空间;或(c)将根据本发明第二方面的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体递送至待靶向的微生物或其附近,或递送至感染微生物的受试者或该受试者的内部空间;

[0085] 条件是在该NO_x生成反应混合物中存在会影响pH的其他组分之前,包括任何所需缓冲液的该质子源的水溶液的初始pH,或在与该一种或多种亚硝酸盐的该反应开始时的该反应混合物的pH,在5-8的范围内,并且该一种或多种多元醇是任选的并且可以省略。

[0086] 在实施根据本发明第九方面的方法时,根据本发明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,任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体;

[0087] 条件是在该NO_x生成反应混合物中存在会影响pH的其他组分之前,包括任何所需缓冲液的该质子源的水溶液的初始pH,或在与该一种或多种亚硝酸盐的反应开始时的该反应混合物的pH,在5-8的范围内,并且该一种或多种多元醇是任选的并且可以省略。

[0088] 本发明第九方面的方法可以是例如治疗有此需要的受试者的微生物感染的方法。受试者可以是例如人受试者或其他哺乳动物受试者。微生物感染可以是例如细菌、病毒、真菌、微寄生虫感染或它们的任何组合。微生物感染可以在受试者的皮肤,包括粘膜上。微生物感染可以在受试者的内部空间中,例如在受试者的鼻、口、呼吸道、肺中或肺胸膜的衬里中。

[0089] 用于本发明所有方面的待施用于人体或动物体的组分和混合物,以及待施用于人体或动物体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,以最大程度地

减少施用组织组织的刺激和炎症。

[0090] 根据本发明的组合、试剂盒和组合物可进行储存并与多种合适的装置和设备一起使用,这将在下文进行更详细地描述。如下文将更详细描述的,可以使用此类装置和设备来适当地实施根据本发明的方法。

[0091] 就本发明的任何一个或多个方面具体描述的所有实施方案、实施例和优选项应被理解为适用于本发明的任何一个或多个其他方面。此外,如有需要,根据本发明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、试剂盒或组合物来实施。

具体实施方式

[0092] 现在参考具体的实施方案对本发明的各方面进行详细描述。下文描述的具体实施方案可以应用于本发明的任一方面,除非其明显与该方面不相容。具体实施方案也可与每个其他具体实施方案组合,除非这样组合不相容。

[0093] 亚硝酸盐和亚硝酸盐组分

[0094] 本发明的方面涉及一种或多种亚硝酸盐的使用。在下文中,术语“亚硝酸盐组分”包括一种或多种亚硝酸盐本身和用于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应体系的含有一种或多种亚硝酸盐的任何组分。

[0095] 亚硝酸盐的选择不受特别地限制。可用于本发明组合物的亚硝酸盐的具体示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 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 及它们的任何混合物。

[0096] 在具体实施方案中,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 。

[0097] 在一个实施方案中,亚硝酸盐组分可以干燥形式,任选以颗粒形式诸如粉末提供以用于本发明。如有需要,亚硝酸盐组分可以被包封或微囊包封,例如以控制或延迟一种或多种亚硝酸盐和质子源之间的反应。干燥形式和/或包封可有助于亚硝酸盐组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合以生成根据本发明的一氧化氮)的储存。更进一步地,干燥形式和/或包封可有助于亚硝酸盐组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合以生成根据本发明的一氧化氮)进入小型物体诸如医疗设备中。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、心脏辅助设备、人造瓣膜、电极、矫形螺钉和销,以及其他薄的医疗和/或可植入制品和吸入器(手持式吸入器和雾化器)。更多详细信息请参见下文题为“组分的任选包封(例如微囊包封)”的部分。

[0098] 如有需要,任选地被包封或微囊包封的亚硝酸盐组分可以干粉或晶体的形式存在,也可以与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)结合的形式,例如以水性凝胶或其溶液的形式存在。干燥或粉末形式的亚硝酸盐组分可以在使用前通过加入水方便地配制成溶液。在(例如,即将)加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之前,特别是在(例如,即将)酸化之前,这种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(例如,即将)加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之前,特别是在(例如,即将)酸化之前,亚硝酸盐溶液中的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(例如,即将)加入 NO_x 生成反应混合物的任何其他组分之

前,特别是在(例如,即将)酸化之前,亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更具体的实施方案中,在(例如,即将)加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前,特别是在(例如,即将)酸化之前,亚硝酸盐溶液中的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(例如,即将)加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前,特别是在(例如,即将)酸化之前,亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度可以在0.8M至1.2M的范围内。例如,在(例如,即将)加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前,并且特别是在(例如,即将)与有机羧酸组分组合之前,亚硝酸盐溶液中的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。

[0099] 应当注意,将两种或更多种NO_x生成反应混合物的前体溶液组合的动作将使每种溶质或每种溶液中的溶质组合的浓度被稀释,如本领域的技术人员所熟知的。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,否则本文所述的亚硝酸盐的浓度是其在(例如,即将)加入以液体(例如,溶液)形式添加的NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前在初始溶液中的浓度。通过了解反应混合物的组成和制备方法,可以很容易地得到NO_x生成反应混合物中的实际浓度。

[0100] 如有需要,亚硝酸盐组分,无论是干燥形式还是载液,都可以包括一种或多种多元醇或此类多元醇中的一些多元醇。

[0101] 如果希望将亚硝酸盐组分以凝胶或其他载体体系(例如水性载体),例如以水性凝胶或溶液的形式储存,优选将含有亚硝酸盐的体系缓冲至合适的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。

[0102] 优选地,直到需要生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体时才使亚硝酸盐组分与质子源接触。为此,亚硝酸盐组分优选容纳在试剂盒、装置或设备的储器或容器中。然而,另选地,亚硝酸盐组分、质子源和一种或多种多元醇的干燥组分可以干燥组合,例如颗粒混合物的形式容纳,并且反应可以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。

[0103] 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。换句话说,亚硝酸盐可符合针对亚硝酸盐的一项或多项有效药典专著。例如,亚硝酸盐可符合美国药典(USP)、欧洲药典或日本药典中的一者或多者的亚硝酸盐专著。

[0104] 在具体的实施方案中,所用的亚硝酸盐在其特征上具有以下一个或多个限制:

[0105] (i) 亚硝酸盐含有不超过约0.02重量%、约0.01重量%或约0.001重量%的碳酸钠;

[0106] (ii) 亚硝酸盐含有不超过约10ppm(0.001重量%)的抗结块剂,诸如烷基萘磺酸钠;

[0107] (iii) 亚硝酸盐为白色至灰白色固体;

[0108] (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识别;

[0109] (v) 亚硝酸盐对根据相关USP中的相关方法测定的亚硝酸盐具有阳性识别试验;

[0110] (vi) 亚硝酸盐含有不少于约97重量%或不少于98重量%的亚硝酸盐和/或不超过102重量%或不超过101重量%的亚硝酸盐,任选地如通过相关USP比色测定法所测定的,例如,如通过离子色谱法,诸如与抑制型电导率检测联用的离子色谱法所测定的;

[0111] (vii) 在25℃在10%溶液中测量时,任选地根据相关USP和/或使用pH计测量,亚硝

酸盐具有介于约7和约9之间或介于约8和约9之间的pH;

[0112] (viii) 亚硝酸盐具有不超过约0.25重量%或约0.01重量%的干燥失重;

[0113] (ix) 亚硝酸盐具有不超过约0.5重量%的含水量,任选地如通过卡尔费休(KarlFischer)法测定;

[0114] (x) 亚硝酸盐中的重金属含量不超过重金属的约10ppm,任选地,亚硝酸盐中的重金属含量不超过约10ppm;

[0115] (xi) 亚硝酸盐含有不超过约0.4重量%的硝酸盐,当亚硝酸盐是亚硝酸钠时,任选地含有不超过约0.4重量%的硝酸钠,当亚硝酸盐是亚硝酸钾时,含有不超过约0.4重量%的硝酸钾;

[0116] (xii) 亚硝酸盐含有不超过约0.005重量%或约0.001重量%的不溶性物质;

[0117] (xiii) 亚硝酸盐含有不超过约0.005重量%的氯化物;

[0118] (xiv) 亚硝酸盐含有不超过约0.01重量%的硫酸盐;

[0119] (xv) 亚硝酸盐含有不超过约0.001重量%的铁;

[0120] (xvi) 亚硝酸盐含有不超过约0.01重量%的钙;

[0121] (xvii) 当亚硝酸盐不是亚硝酸钾时,亚硝酸盐含有不超过约0.005重量%或约0.001重量%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约0.005重量%

[0122] 或约0.001重量%的钠;

[0123] (xviii) 亚硝酸盐含有不超过约0.1重量%、不超过约5000ppm、不超过约1000ppm、

[0124] 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;

[0125] (xix) 亚硝酸盐含有不超过约0.1重量%、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;

[0126] (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;

[0127] (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;

[0128] (xxii) 亚硝酸盐含有不超过约0.05ppm的汞;

[0129] (xxiii) 亚硝酸盐含有不超过约2ppm或0.2ppm的铝;

[0130] (xxiv) 亚硝酸盐含有不超过约3ppm或1ppm的砷;

[0131] (xxv) 亚硝酸盐含有不超过约0.003重量%或0.001重量%的硒;

[0132] (xxvi) 亚硝酸盐中微生物负荷的总需氧计数不超过约100CFU/g;

[0133] (xxvii) 硝酸盐中的总酵母和霉菌计数不超过约20CFU/g;

[0134] (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

[0135] (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,优选地,亚硝酸盐不含可检测量的磷酸盐。

[0136] 在某些实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的特征中的两种或更多种特征。在另外的实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的特征中的五种或更多种特征。在另外的实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的特征中的十种或更多种特征。在另外的实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的特征中的十五种或更多种特征。在一些实施方案中,亚硝

酸盐具有(i)至(xxix)的特征中的二十种或更多种特征。在一个具体的实施方案中,亚硝酸盐具有(i)至(xxix)的所有特征。在一个更具体的实施方案中,亚硝酸盐是具有(i)至(xxix)的所有特征的亚硝酸钠。

[0137] 在一些实施方案中,亚硝酸盐含有约97重量%至约101重量%范围内的亚硝酸盐,任选地如通过相关USP比色测定法所测定的,例如,如通过离子色谱法,诸如与抑制型电导率检测联用的离子色谱法所测定的。在另选的实施方案中,亚硝酸盐含有约98重量%至约102重量%范围内的亚硝酸盐,任选地如通过相关USP比色测定法所测定的,例如,如通过离子色谱法,诸如与抑制型电导率检测联用的离子色谱法所测定的。

[0138] 在具体的实施方案中,亚硝酸盐具有以下特征:

[0139] (i) 亚硝酸盐含有不超过约0.02重量%的碳酸钠;

[0140] (ii) 亚硝酸盐含有不超过约10ppm的抗结块剂;

[0141] (vi) 亚硝酸盐含有不低于97重量%的亚硝酸盐和不超过101重量%的亚硝酸盐,如通过USP比色测定法所测定的;

[0142] (viii) 亚硝酸盐具有不超过约0.25重量%的干燥失重;

[0143] (ix) 亚硝酸盐具有不超过约0.5重量%的含水量;

[0144] (x) 亚硝酸盐中重金属含量不超过约10ppm;

[0145] (xi) 亚硝酸盐含有不超过约0.4重量%的硝酸盐;

[0146] (xii) 亚硝酸盐含有不超过约0.005重量%的不溶性物质;

[0147] (xiii) 亚硝酸盐含有不超过约0.005重量%的氯化物;

[0148] (xiv) 亚硝酸盐含有不超过约0.01重量%的硫酸盐;

[0149] (xv) 亚硝酸盐含有不超过约0.001重量%的铁;

[0150] (xvi) 亚硝酸盐含有不超过约0.01重量%的钙;

[0151] (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;

[0152] (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;

[0153] (xxii) 亚硝酸盐含有不超过约0.05ppm的汞;

[0154] (xxiii) 亚硝酸盐含有不超过约2ppm的铝;

[0155] (xxiv) 亚硝酸盐含有不超过约3ppm的砷;

[0156] (xxv) 亚硝酸盐含有不超过约0.003重量%的硒;

[0157] (xxvi) 亚硝酸盐中微生物负荷的总需氧计数不超过约100CFU/g;

[0158] (xxvii) 硝酸盐中的总酵母和霉菌计数不超过约20CFU/g;以及

[0159] (xxviii) 亚硝酸盐含有不超过约0.25EU/mg的细菌内毒素。

[0160] 在这些实施方案中,亚硝酸盐可以是亚硝酸钠,并且含有不超过约0.005重量%的钾。优选地,亚硝酸钠还具有一个或多个以下限制:

[0161] (iii) 亚硝酸钠为白色至灰白色固体;

[0162] (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识别;

[0163] (v) 亚硝酸钠对根据相关USP中的相关方法测定的亚硝酸盐具有阳性识别试验;

[0164] (vii) 在25℃在10%溶液中测量时,任选地根据相关USP和/或使用pH计测量,亚硝酸钠具有介于约7和约9之间或介于约8和约9之间的pH;

[0165] (xix) 亚硝酸钠含有不超过约0.1重量%、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;

[0166] (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

[0167] (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,优选地,亚硝酸盐不含可检测量的磷酸盐。

[0168] (i) 至 (xxix) 的特征可根据USP XXXII (2009) 中的相关方法测定。WO 2010/093746 中提供了用于测定 (i) 至 (xxix) 的特征的方法,其公开内容通过引用方式整体并入本文。WO2010/093746中还描述了制备具有 (i) 至 (xxix) 的特征中的一种或多种特征的亚硝酸钠的方法。

[0169] 包括一种或多种有机羧酸和质子源组分的质子源

[0170] 本发明的方面涉及包括一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸的质子源。在下文中,术语“质子源组分”包括质子源本身和用于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应体系的含有质子源的任何组分。

[0171] 在本节中,将更详细地举例说明有机羧酸。

[0172] 本文中表述“有机羧酸”是指在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。羧酸可以是饱和或不饱和的。羧酸可以是脂族或芳族的。羧酸可以是无环或环状的。羧酸可以是插烯羧酸。

[0173] 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示例包括 α -羟基-羧酸、 β -羟基-羧酸和 γ -羟基-羧酸。

[0174] 一种或多种有机羧酸,如果多于一种,则它们各自应优选具有小于约7,更优选小于7.0的 pK_{a1} 。

[0175] 一种或多种羧酸可以是、包含或由一种或多种还原性羧酸组成。

[0176] 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的侧链-COOH基团。这种含羧酸水凝胶的示例描述于例如WO 2007/007115、WO2008/087411、WO 2008/087408、WO 2014/188174和WO 2014/188175以及其中引用的文献中,它们所有的公开内容通过引用方式并入本文。此类水凝胶通常包含共价键合到三维聚合物基质上的酸或盐形式的侧链羧酸和磺酰基团。有关进一步的讨论,请参见下文“其他用于组分的储器:水凝胶”。

[0177] 然而,通常优选地,选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸中的至少一种酸不与聚合物或大分子,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共价键合。不希望受理论的束缚,证据(例如在下文题为“有机多元醇”的部分中讨论的对多元醇立体异构的作用的依赖性的证据)表明,本发明提高一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应产出的作用至少部分地通过有机多元醇分子与亚硝酸盐和酸化反应时的质子相互作用的作用来实现,这意味着反应物分子在反应过程中在多元醇分子的影响下取向和重新定位的迁移率可能很重要。即使多元醇不一定存在,诸如在本发明的第八方面中,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迁移率相同可能很重要。

[0178] 有机羧酸可以例如选自水杨酸、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、帕莫酸(扑酸)、硬脂酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、葡庚糖酸、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、海藻酸、草酸、它们的盐及它们的组合。在具体的实施方案中,有机羧酸选自柠檬酸、其盐及其组合。在一个具体的实施方案中,有机羧酸是柠檬酸或其盐。羧酸可以是或包括聚合的或聚合化羧酸,诸如聚丙烯酸、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”还包括有机羧酸的部分或全部酯或其部分或全部盐,条件是它们可以在根据本发明的用途中用作质子源。

[0179] 优选地,在质子源即将接触一种或多种亚硝酸盐之前缓冲质子源的pH,以将pH控制在已知的范围内,并限制亚硝酸盐被消耗时pH的增加速率。更多详细信息请参见下文题为“pH控制;任选的缓冲体系”的部分。特别地,设想质子源中的至少一种有机羧酸可以适当地与其共轭碱一起存在。酸及其共轭碱可以在水性载体中适当地形成缓冲液。可以选择缓冲液,以便在NO_x生成反应进行时维持所需的pH,优选在约3至9,例如约4至8范围内的pH,优选用于生理接触或用于与活细胞和生物体接触,在约5至约8范围内的pH。如果存在共轭碱,可以单独加入,也可以通过使用酸和/或碱,优选无机酸和/或无机碱调节pH而由质子源原位生成。

[0180] 在(例如,即将)加入会影响pH的NO_x生成反应混合物的其他组分之前,包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH,或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开始时的反应混合物的pH,适当地在约3至9,例如约4至8,例如约5至8的范围内。本文所用的关于质子源的表述“初始pH”是指在(例如,即将)加入会影响pH的NO_x生成反应混合物的其他组分(包括其一些组分但不是所有组分)之前,包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的pH。干粉质子源材料或质子源水溶液的其他前体将以使水溶液具有所需的初始pH值的合适的量使用。

[0181] 如果希望将质子源组分以凝胶或其他载体体系(例如水性载体),例如以水性凝胶或溶液的形式储存,优选将含有质子源的缓冲至合适的pH以防止酸性保持,并防止质子源在存储期间降解。优选pH为约3-6,例如约3-5。如有需要,可以在使用质子源组分之前不久通过加入碱来提高pH。

[0182] 例如,一些患者对柠檬酸不耐受。患者在治疗前应进行酸的耐受性测试,并相应地选择酸组分。

[0183] 在一个实施方案中,质子源组分或其部分可以干燥形式,任选地以颗粒形式(诸如粉末)提供以用于本发明。如有需要,质子源组分或其部分可以被包封或微囊包封,例如以控制或延迟一种或多种亚硝酸盐和质子源之间的反应。当质子源在室温下通常具有液体或凝胶状态时,可以特别地使用包封形式。干燥形式和/或包封可有助于质子源组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合储存以生成根据本发明的一氧化氮)的储存。更进一步地,干燥形式和/或包封可有助于质子源组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合以生成根据本发明的一氧化氮)进入小型物体诸如医疗设备中。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,以及其他薄的医疗和/或可植入制品和吸入器。更多详细信息请参见下文题为“组分的任选包封(例如微囊包封)”的部分。

[0184] 如有需要,任选地被包封或微囊包封的一种或多种有机羧酸可以干粉或晶体的形式存在于质子源组分中,也可以与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)结合,例如以水性

凝胶或其溶液的形式存在于质子源组分中。含有干燥或粉末形式的有机羧酸的质子源组分可以在使用前通过加入水方便地制成溶液。在(例如,即将)加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前,并且特别是在(例如,即将)引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总质子源(包括存在的任何有机非羧酸还原酸)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(例如,即将)加入NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前,并且特别是在(例如,即将)引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的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,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总质子源的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更特别的实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的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,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总质子源的摩尔浓度可以在约0.8M至1.2M的范围内。例如,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的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。

[0185] 本文所用的表述“总质子源的摩尔浓度”、“总质子源的浓度”等应理解为是指在于质子(H⁺)供体部分或质子(H⁺)供体部分中的至少一个质子供体部分(其中存在一个以上)主要质子化,即以摩尔计超过50%质子化的pH下,任何是或用作根据本发明的质子源的有机羧酸和/或有机非羧酸的浓度。换句话说,如果在引发NO_x生成反应之前将pH调节至更高的pH,从而使质子化程度降低,则总质子源的摩尔浓度或浓度不应被认为相应地降低。

[0186] 应当注意,将两种或更多种NO_x生成反应混合物的前体溶液组合的动作将使每种溶质或每种溶液中的溶质组合的浓度被稀释,如本领域的技术人员所熟知的。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,否则本文所述的质子源的浓度是其在(例如,即将)加入以液体(例如,溶液)形式添加的NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前在初始溶液中的浓度。通过了解反应混合物的组成和制备方法,可以很容易地得到NO_x生成反应混合物中的实际浓度。

[0187] 干燥或粉末形式的质子源组分可以在使用前通过加入水方便地配制成溶液。

[0188] 如有需要,一种或多种有机羧酸,无论是干燥形式还是载液,都可以与一种或多种多元醇或此类多元醇中的一些多元醇的混合物或溶液的形式存在。

[0189] 优选地,直到需要生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体时才使亚硝酸盐组分与质子源反应性接触。为此,质子源组分或其一部分优选容纳在试剂盒、装置或设备的储器或容器中。然而,另选地,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可以干燥组合物,例如颗粒混合物的形式保存,并且反应可以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。

[0190] 包含一种或多种有机非羧酸还原酸的质子源组分

[0191] 以上关于包含一种或多种有机羧酸或由其组成的质子源组分的讨论同样适用于包含一种或多种有机非羧酸或由其组成的质子源组分。有机非羧酸还原酸将在本节中更详细地举例说明。

[0192] 本文的表述“有机非羧酸还原酸”是指分子中不含-COOH基团的任何有机还原酸。有机非羧酸还原酸可以是直链或支链的。非羧酸还原酸可以是饱和或不饱和的。非羧酸还原酸可以是脂族或芳族的。非羧酸还原酸可以是非环状或环状的。非羧酸还原酸可以是插烯的。

[0193] 一种或多种有机非羧酸还原酸,如果多于一种,则它们中的每一种应优选具有小于约7,更优选小于7.0的 pK_{a1} 。

[0194] 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酸的一种或多种酸中的至少一种酸不与聚合物分子,例如形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子共价连接。

[0195] 有机非羧酸还原酸可以例如选自抗坏血酸;棕榈酸抗坏血酸酯(抗坏血酸棕榈酸酯);抗坏血酸酯衍生物,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;酸性还原酮类,诸如还原酸;异抗坏血酸;草酸;它们的盐;以及它们的组合。在一个具体的实施方案中,有机非羧酸还原酸是抗坏血酸或其盐。

[0196] 有机非羧酸还原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酸的示例包括酸性还原酮,例如还原酸(2,3-二羟基-2-环戊酮)。

[0197] 优选地,缓冲质子源和/或一种或多种亚硝酸盐与质子源接触之后的反应混合物的pH,以将pH控制在已知的范围内,并控制pH在亚硝酸盐消耗时的增加。更多详细信息请参见下文题为“pH控制;任选的缓冲体系”的部分。特别地,设想质子源的至少一种有机非羧酸还原酸可以适当地与其共轭碱一起存在。酸及其共轭碱可以在水性载体中适当地形成缓冲液。可以选择缓冲液,以便在 NO_x 生成反应进行时维持所需的pH,优选在约3至9,例如约4至8范围内的pH,优选用于生理接触或用于与活细胞和生物体接触,在约5至约8范围内的pH。共轭碱如果存在可以单独加入,也可以通过使用酸和/或碱,优选无机酸和/或无机碱调节pH而由质子源原位生成。

[0198] 在(例如,即将)加入会影响pH的 NO_x 生成反应混合物的其他组分之前,包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH,或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开始时的反应混合物的pH,适当地在约3至9,例如约4至8,例如约5至8的范围内。干粉质子源材料或质子源水溶液的其他前体将以使水溶液具有所需的初始pH值的合适的量使用。

[0199] 如果希望将质子源组分以凝胶或其他载体体系(例如水性载体),例如以水性凝胶或溶液的形式储存,优选将含有质子源的缓冲至合适的pH以防止酸性保持,并防止质子源在存储期间降解。优选pH为约3-6,例如约3-5。如有需要,可以在使用质子源组分之前不久通过加入碱来提高pH。

[0200] 一些还原酸诸如草酸是有毒的。应相应地选择酸组分。

[0201] 一种或多种有机非羧酸还原酸可以上述方式在一种或多种有机羧基酸之外,或代替该一种或多种有机羧基酸用于质子源组分。更多详细信息请参见题为“包括一种或多种有机羧酸和质子源组分的质子源”的部分。

[0202] 有机多元醇和有机多元醇组分

[0203] 本发明的方面涉及一种或多种有机多元醇。在下文中,术语“有机多元醇组分”或“多元醇组分”包括有机多元醇本身和用于生成一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体的反应体系的含有有机多元醇的任何组分。

[0204] 本文的表述“有机多元醇”是指具有两个或更多个羟基的有机分子,其(特别是对于亚硝酸盐反应而言)不是质子源,也不是糖或多糖(术语“糖”和“多糖”包括寡糖、聚糖和

糖胺聚糖)。因此,有机多元醇将具有约7以上,例如7.0以上的 pK_{a1} 。

[0205] 本文中的表述“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中,在其所有方面中,有机多元醇不包括还原剂。还原剂是具有两个或更多个羟基的有机分子,而不是糖或多糖,其示例是硫代甘油(例如,1-硫代甘油)、氢醌、丁基化氢醌、抗坏血酸、异抗坏血酸和异抗坏血酸盐。因此,优选地从表述“有机多元醇”中排除硫代甘油(例如,1-硫代甘油)、氢醌、丁基化氢醌、抗坏血酸盐和异抗坏血酸盐,原因是它们为还原剂。无论如何,抗坏血酸和异抗坏血酸都被排除在该表达之外,原因是它们为质子源,特别是对于亚硝酸盐反应而言。为免生疑问,我们确认本身为质子源的还原剂,例如抗坏血酸和/或异抗坏血酸,不排除在本发明的质子源之外,也不排除在本发明的质子源组分、组合、试剂盒、组合物、用途、方法或任何其他部分以及它们以质子源形式存在的具体实施之外。

[0206] 有机多元醇可以是环状或非环状的,也可以是一种或多种环状有机多元醇和一种或多种非环状的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一种或多种被两个或更多个OH基团取代的烷烃、一种或多种被两个或更多个OH基团取代的环烷烃、一种或多种被两个或更多个OH基团取代的环烷基烷烃,及它们的任何组合。最优选地,有机多元醇不带有除OH外的任何取代基。

[0207] 优选地,一种或多种有机多元醇是一种或多种非环状有机多元醇。优选的一种或多种非环状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。优选的一种或多种非环状有机多元醇选自糖醇,例如具有4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子的糖醇。优选的是,一种或多种有机多元醇不包括皂苷、皂苷元、甾体或甾体糖苷。

[0208] 另选地,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醛醇。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个碳原子的环状醛醇。环状多元醇的具体示例是肌醇。

[0209] 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。在具体的实施方案中,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醛醇。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。在另外的实施方案中,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醛醇。在一些实施方案中,一种或多种有机多元醇具有20个或更少个羟基。在具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有20个或更少个羟基的糖醇或醛醇。在更具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇具有15个或更少个羟基。在另外的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有15个或更少个羟基的糖醇或醛醇。一种或多种有机多元醇可以具有在7至20,更特别地在9至15范围内的羟基数目。在某些实施方案中,一种或多种有机多元醇包括9个、12个、15个或18个羟基。

[0210] 优选地,一种或多种有机多元醇是包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元,例如由其组成的糖醇化合物。一种或多种有机多元醇可以是糖醇化合物,该糖醇化合物包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元的直链或一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元的支链,或由其组成。

[0211] 本文所用的单糖单元是指与化合物中至少一个其他单元(无论是另一个单糖单元还是非环状糖醇单元)共价连接的单糖。本文所用的非环状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非环状糖醇单元)共价连接的非环状糖醇。化

合物中的单元可以通过醚键连接。在一些实施方案中,单糖单元中的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。在具体的实施方案中,单糖单元中的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非环状糖醇糖苷配基的糖苷。

[0212] 优选的非环状糖醇单元是具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的糖醇单元。在具体的实施方案中,非环状糖醇单元选自赤藓糖醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇和庚七醇的单元。

[0213] 在具体的实施方案中,单糖单元中的一个或多个单糖单元是 C_5 或 C_6 单糖单元。换句话说,单糖单元中的一个或多个单糖单元是戊糖或己糖单元。在更具体的实施方案中,每个单糖单元都是 C_5 或 C_6 单糖单元。在具体的实施方案中,糖醇单元中的一个或多个糖醇单元是 C_5 或 C_6 糖醇单元。在更具体的实施方案中,每个糖醇单元都是 C_5 或 C_6 糖醇单元。

[0214] 在某些实施方案中,糖醇化合物包含 n 个单糖单元和 m 个非环状糖醇单元,例如由其组成,其中 n 是整数且至少为1, m 是整数且至少为1,并且 $(n+m)$ 不超过10。在某些实施方案中,糖醇化合物包含由一个非环状糖醇单元封端的 n 个单糖单元的链,例如由其组成,其中 n 是介于1和9之间的整数。在这些实施方案中,单糖单元链可通过糖苷键共价连接。在具体的实施方案中,每个单糖单元通过糖苷键与另一个单糖单元或非环状糖醇单元共价连接。在某些实施方案中,糖醇化合物包含由一个非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链,例如由其组成。1个、2个、3个或每个单糖单元可以是 C_5 或 C_6 单糖单元。非环状醇单元可以是 C_5 或 C_6 糖醇单元。糖醇化合物的示例包括但不限于: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($n=3$)。

[0215] 此类糖醇化合物可以被描述为衍生自二糖或寡糖的糖醇。本文所用的寡糖是指由三至十个单糖单元组成的糖。衍生自二糖或寡糖的糖醇可以由(例如,从水解和氢化获得的)二糖、寡糖或多糖(例如,通过氢化)合成,但不限于由二糖、寡糖或多糖合成的化合物。例如,衍生自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衍生自二糖、三糖或四糖的糖醇。衍生自二糖的糖醇的示例包括但不限于异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。衍生自三糖的糖醇的示例包括但不限于麦芽三糖醇。衍生自四糖的糖醇的示例包括但不限于麦芽四糖醇。

[0216] 可以提及选自赤藓糖醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚葡萄糖醇及它们的任何组合中的任一种作为合适的有机多元醇。可以使用甘油,并且当其存在时,优选与一种或多种其他有机多元醇,例如赤藓糖醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚葡萄糖醇或它们的任何组合结合。

[0217] 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形式和光学异构体以及异构体混合物都旨在包括在本发明和专利的范围内。特别地,可以使用所有手性有机多元醇及其所有混合物的D和/或L形式。

[0218] 有趣的是,已经发现在本发明中使用多元醇的作用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结果,至少在NO生成量方面如此。

[0219] 例如,山梨糖醇是甘露糖醇的立体异构体,在一个羟基的取向上彼此不同。如下文的实施例2D和2E(图5和图6)所示,山梨糖醇和甘露糖醇对亚硝酸盐和质子源之间的反应产生的影响在其他方面相同的反应体系中不同。

[0220] 在具体的实施方案中,有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇及它们的任何组合。阿糖醇可以是D或L阿糖醇或它们的混合物。木糖醇可以是D或L木糖醇或它们的混合物。山梨糖醇可以是D或L山梨糖醇或它们的混合物。甘露糖醇可以是D或L甘露糖醇或它们的混合物。

[0221] 在具体的实施方案中,一种或多种多元醇是糖醇化合物,当用于本文所述的体系、方法、组合、试剂盒和组合物时,该糖醇化合物包含由本文所述的一种或多种单糖单元和一种或多种非环状糖醇单元(包括衍生自二糖或寡糖的糖醇),例如由其组成,这些体系、方法、组合、试剂盒和组合物用于或针对结核病感染的治疗或用于减少结核病细菌的数目的抗微生物方法。

[0222] 在一个实施方案中,有机多元醇组分可以干燥形式,任选以颗粒形式诸如粉末形式提供以用于本发明。如有需要,有机多元醇可以被包封或微囊包封,例如以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具有液体或凝胶状态时,可以特别地使用包封形式。干燥形式和/或包封可有助于有机多元醇组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合以生成根据本发明的一氧化氮)的储存。更进一步地,干燥形式和/或包封可有助于有机多元醇组分(无论是单独使用还是与反应的其他组分混合以生成根据本发明的一氧化氮)进入小型物体诸如医疗设备中。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,以及其他薄的医疗和/或可植入制品和吸入器。更多详细信息请参见下文题为“组分的任选包封(例如微囊包封)”的部分。

[0223] 另选地,有机多元醇组分可包括载体介质,例如水性载液或凝胶载体。如果有机多元醇在室温下通常是液体,则它可以在不含任何附加载体组分的情况下原样使用,或者可以与一种或多种载体添加剂,例如水混合使用。

[0224] 如有需要,任选地被包封或微囊包封的一种或多种有机多元醇可以干粉或晶体的形式存在于多元醇组分中,也可以与凝胶或其他载体体系(例如水性载体)结合,例如以水性凝胶或其溶液的形式存在于多元醇组分中。含有干燥或粉末形式的有机多元醇的多元醇组分可以在使用前通过加入水方便地制成溶液。在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇的摩尔浓度可以是达到该多元醇或每种多元醇在溶液中的饱和极限的任何浓度。例如,总的一种或多种多元醇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,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更具体的实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇的摩尔浓度可以在0.8M至1.2M的范围内。例如,在引发与亚硝酸盐的反应之前,这种溶液中的总的一种或多种多元醇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。

[0225] 应当注意,将两种或更多种NO_x生成反应混合物的前体溶液组合的动作将使每种溶质或每种溶液中的溶质组合的浓度被稀释,如本领域的技术人员所熟知的。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,否则本文所述的有机多元醇的浓度是其在(例如,即将)加入以液体(例如,溶液)形式添加的NO_x生成反应混合物的任何其他组分之前在初始溶液中的浓度。通过了解反应混合物的组成和制备方法,可以很容易地得到NO_x生成反应混合物中的实际浓度。

[0226] 干燥或粉末形式的多元醇组分可以在使用前通过加入水方便地配制成溶液。

[0227] 如有需要,多元醇,无论是干燥形式还是载液,都可以与一种或多种亚硝酸盐或质子源或此类多元醇中的一些多元醇的混合物或溶液的形式存在。

[0228] 在亚硝酸盐在使用前与生成一氧化氮的反应的其他组分始终分开的具体的实施方案中,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,有机羧酸组分可以基本上不含多元醇。在另选的实施方案中,有机羧酸组分包括一种或多种多元醇。在这些实施方案中,亚硝酸盐组分可以基本上不含多元醇。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,该一种或多种多元醇在两种组分之间可以相同或不同。

[0229] 在另一个实施方案中,有机羧酸组分和亚硝酸盐组分可以基本上不含多元醇,并且一种或多种多元醇可以包含在单独的多元醇组分中。

[0230] 反应混合物中亚硝酸盐、质子源和任何多元醇的相对浓度

[0231] 在NO_x生成反应开始时(或开始之前),多元醇组分或反应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介于亚硝酸盐组分或反应液中的亚硝酸根离子的总摩尔浓度的约0.05倍和约3倍之间,例如介于亚硝酸根离子的总摩尔浓度的约0.1倍和约2倍之间,例如约0.25倍和约1.5倍之间,例如约0.3倍和约1.2倍之间。在(例如,即将)引发NO_x生成反应之前,一种或多种有机多元醇和亚硝酸根离子之间相同的相对摩尔浓度适当地提供在根据本发明的组合或试剂盒的组分中,或本发明的组合物中。

[0232] 在NO_x生成反应开始时(或开始之前),多元醇组分或反应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介于质子源组分或反应液中的质子源的总摩尔浓度的约0.05倍和约3倍之间,例如介于质子源的总摩尔浓度的约0.1倍和约2倍之间。在(例如,即将)引发NO_x生成反应之前,一种或多种有机多元醇和质子源之间相同的相对摩尔浓度适当地提供在根据本发明的组合或试剂盒的组分中,或本发明的组合物中。

[0233] 任选的附加组分

[0234] 用于本发明的组合、试剂盒或组合物可以加入一系列稀释剂、载体和赋形剂中和/或与一种或多种附加组分、特定的功能性组分联合提供,该附加组分、特定的功能性组分旨在为使用其的组合、试剂盒或组合物提供一种或多种特定的益处。当需要在体内使用时,此类稀释剂、载体、赋形剂和/或附加组分通常是生理上相容的。

[0235] 合适的生理上相容的稀释剂、载体和/或赋形剂的示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。

[0236] 一般而言,根据预期的施用方式,药物制剂将含有约0.005重量%至约95重量%,

优选约0.5重量%至约50重量%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,或者对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0237] 赋形剂可以根据预期用途或施用途选自己知的赋形剂,反应物和/或反应产物通过该给药途径递送至靶位点以递送一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体。例如,可通过将亚硝酸盐掺入赋形剂诸如乳膏、洗剂和软膏基质或其他增稠剂和稠化剂(例如尤特奇L100、卡波普、羧甲基纤维素或羟甲基纤维素)中来配制乳膏、洗剂和软膏。质子源可以掺入选自卡波普、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、乙醇、乳糖或水性基质中的赋形剂中。如果需要形成膜,则可以使用成膜赋形剂,诸如丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮)、明胶、瓜尔胶和虫胶。

[0238] 任选的附加组分可以例如选自甜味剂、掩味剂、增稠剂、稠化剂、润湿剂、润滑剂、粘合剂、成膜剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、芳香剂、盐、包衣剂、抗氧化剂、药物活性剂和防腐剂。此类组分在本领域中是公知的,并且对于本领域的读者来说,没有必要对它们进行详细的讨论。辅助物质诸如润湿剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂和增溶剂的示例包括例如磷酸钠、磷酸钾、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸酯、三乙醇胺油酸酯等。甜味剂或掩味剂可以例如包括糖、糖精、阿斯巴甜、三氯蔗糖、纽甜或其他化合物,其对味道、余味、感觉到的令人不快的咸味、酸味或苦味产生有益影响,减少口服或吸入制剂对接受者的刺激倾向(例如,通过引起咳嗽或咽喉痛或其他不期望的副作用,诸如可以降低递送剂量或对患者对处方治疗方案的依从性产生不利影响)。某些掩味剂可与一种或多种亚硝酸盐形成复合物。增稠剂、稠化剂和成膜剂的示例已在上文给出。

[0239] 药物活性剂和其他附加组分,例如用作稀释剂、载体和赋形剂的附加组分的选择,可以通过其对所涉及的疾病或医学病况的治疗方案的适用性,以及根据本发明的组合或组合物的期望施用途来确定。可以参考标准参考文献,诸如Martindale,第39版(2017年),默克索引,第15版(2013年),古德曼和吉尔曼的《治疗学药理基础》,第13版(2017年),英国国家处方集网(<https://bnf.nice.org.uk/>),雷明顿:《药学科学与实践》,第22版(2012年),或《内科医师用药手册》,第71版(2017年)。

[0240] 根据本发明的组分和组合物可出于治疗目的向动物(包括人)受试者施用的施用途的示例包括局部(例如,乳膏、洗剂、凝胶、软膏、糊剂、润肤剂、喷雾剂)、耳部、鼻部(例如,喷雾剂)、阴道、直肠(例如,栓剂)、口服(例如雾剂、喷雾剂、嗽口水、气雾剂)、肠内(例如,片剂、锭剂、含片、胶囊、润喉止咳糖浆、酏剂)和肠胃外(例如,注射液)、眼睛、耳朵、鼻子或咽喉(例如,滴剂),或经呼吸道或肺部(例如雾剂、气雾剂、粉雾剂)。

[0241] 可以掺入组分和组合物中或与根据本发明的组分和组合物共同施用的药物活性剂的示例包括抗生素,甾体,麻醉剂(例如,局部麻醉剂诸如利诺卡因(利多卡因)、丁卡因(四卡因)、赛罗卡因、丁哌卡因、丙胺卡因、罗哌卡因、苯佐卡因、甲哌卡因、可卡因或它们的任何组合),镇痛药,抗炎剂(例如非甾体抗炎药(NSAID)),抗感染剂,疫苗,免疫抑制剂,抗惊厥药,抗痴呆药,前列腺素,退热药,抗真菌药,抗银屑病药,抗病毒剂,血管扩张剂或血管收缩剂,防晒剂(例如,PABA),抗组胺剂,激素诸如雌激素、孕酮或雄激素,抗胆碱剂,心血管治疗剂诸如 α 或 β 阻断剂或米诺地尔(Rogaine),维生素,皮肤软化剂,酶,肥大细胞稳定剂,杀疥螨剂,杀虱剂,角质剥脱剂,润滑剂,镇静剂,洗发精,抗粉刺制剂,烧伤治疗制剂,清洁

剂,除臭剂,脱色剂,尿布皮疹治疗产品,润肤霜,润肤膏,光增敏剂,毒葛或毒橡树或漆树制品,晒伤治疗制剂,蛋白质,肽,蛋白多糖,核苷酸,寡核苷酸(诸如DNA、RNA等),矿物质,生长因子,含焦油的制剂,含蜂蜜的制剂(例如,含麦卢卡蜂蜜的制剂),疣治疗制剂,湿敷料,创伤护理产品或它们的任何组合。

[0242] 具体的示例包括止痛剂,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;抗利尿激素;氢化可的松;东莨菪碱;硝化甘油;硝酸异山梨酯;抗组胺药,诸如特非那定;可乐定;烟碱;非甾体免疫抑制药物,诸如环孢霉素、氨甲喋呤、硫唑嘌呤、麦考酚酸酯、环磷酰胺、TNF- α 拮抗剂和抗IL5、抗IL4Ra、抗IL6、抗IL13、抗IL17、抗IL23细胞因子单克隆抗体;抗痉挛药;以及阿尔茨海默病、痴呆和/或帕金森病治疗药物,诸如阿扑吗啡和卡巴拉汀。

[0243] 如有需要,任选的附加组分中的任何组分可以被包封或微囊包封,例如以控制或延迟其释放。更多详细信息请参见下文题为“组分的任选包封(例如微囊包封)”的部分。

[0244] 组分的任选包封(例如,微囊包封)

[0245] 用于本发明的组合、试剂盒和组合物的组分中的至少一些组分可以被包封,例如微囊包封。

[0246] 微囊包封组分的使用对于NO生成来说是有用的,因为它能够使相对不稳定的化合物(例如NO)从化学上稳定形式的前体中产生的时间延长。多种微囊包封的反应物和/或一种或多种任选的附加组分可容易地在干燥环境中混合储存并相互接触,并且仅需向前体混合物提供少量的水,就可以引发NO的产生。另选地,这种微囊包封的反应物和/或一种或多种任选的附加组分的混合物可直接施用于受试者(例如皮肤、粘膜表面)或进入受试者的鼻子、口腔、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的NO的释放。另一个优点是,由微囊包封的反应物和/或一种或多种任选的附加组分占据的体积相对较小,使得它们可以容易地进入小型物体诸如医疗设备中。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,以及其他薄的医疗和/或可植入制品和吸入器。

[0247] 用于包封或微囊包封反应物和/或一种或多种任选的附加组分的生产方法的一个示例是对反应物和/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,以产生包含分散在聚合物基质内的材料的单个颗粒的细分粉末。也可使用其他包封或微囊包封方法,例如锅包衣、空气悬浮包衣、离心挤出、纤维纺丝、纤维挤出、喷嘴振动、离子凝胶化、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(存在于包括玉米的某些草种类中的醇溶谷蛋白种子储藏蛋白)、壳聚糖、透明质酸和藻酸,或可生物降解的聚酯、聚酐、聚(原酸酯)、聚磷腈或多糖(参见Park等人,Molecules,第10卷,第141-161页(2005年))。其中一种化学物质如上所述被微囊包封的组合物是用于递送药物和其他药剂的公知组合物。参见Shalaby和Jamiolkowski,美国专利4130639;Buchholz和Meduski,美国专利6491748。然而,在几乎所有此类组合物中,被微囊包封的是治疗剂,并且治疗剂不是通过微囊包封试剂的反应产生的。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内。已经描述了用于医疗制品的释放一氧化氮的聚合物,其涉及NO加合物/供体。参见例如

Arnold, 美国专利7829553 (与疏水性聚合物连接的碳基二醇二氮烯鎓); Knapp, 美国专利7135189 (亚硝基硫醇前体和一氧化氮供体)。

[0248] pH控制;任选的缓冲体系

[0249] 组合物可以具有受控的pH值。特别地,组合物可具有在3.0至8.0的范围内,或更特别地在4.0至8.0的范围内的pH值。在更具体的实施方案中,组合物具有在4.0-7.4范围内的pH值。在更具体的实施方案中,组合物可具有在4.0至6.0范围内的pH值。在这些实施方案中,组合物可具有在4.5至6.0范围内的pH值。

[0250] 组合物的pH可以任何已知的方式控制。在具体的实施方案中,在与亚硝酸盐组分混合之前,控制有机羧酸组分或有机还原酸组分的pH。在一些实施方案中,有机羧酸组分或有机还原酸组分包括缓冲液。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。

[0251] 在一些实施方案中,通过混合有机羧酸或有机非羧酸还原酸及其盐配对物形成缓冲液。例如,有机羧酸组分可以包括有机羧酸和有机羧酸的盐。有机非羧酸还原酸组分可以包括有机非羧酸还原酸和有机非羧酸还原酸的盐。在具体的实施方案中,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其他有机酸的盐。例如,有机羧酸组分可以包括柠檬酸和抗坏血酸盐。在另外的实施方案中,有机羧酸组分可以包括有机羧酸、有机羧酸的盐和另外的有机羧酸的盐。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。

[0252] 在其他实施方案中,通过调节有机羧酸或有机非羧酸还原酸的pH以使酸(质子化形式)与其盐配对物共存来形成缓冲液。这通过向有机羧酸或有机非羧酸还原酸中加入原位生成缓冲体系的量的强无机碱和任选的强无机酸而适当地实现。合适的强无机碱的示例包括氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、氢氧化铷和氢氧化铯。合适的强无机酸的示例包括盐酸、硫酸、氢溴酸和硝酸。

[0253] 缓冲液可包括一种或多种生理缓冲液,尤其是当根据本发明的组合或组合物要接触细胞或动物(包括人)皮肤、粘膜或其他组织时,诸如施用于鼻、口、呼吸道或肺的情况。合适的生理上相容的缓冲液的示例包括Good's缓冲液,其缓冲的pH值范围为约5至约9,例如2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇、N-2-氨基乙磺酸(ACES)、N-(2-乙酰胺基)-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)甲基氨基]-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)、脱水物(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)甲基氨基]丙磺酸(TAPS)、2-羟基-3-[三(羟甲基)甲基氨基]-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)。

[0254] 组合物的摩尔渗透压浓度

[0255] 应当控制待递送至生理系统,特别是通过将引起与人或动物受试者的皮肤、粘膜、鼻、口、呼吸道或肺接触的途径递送至生理系统的亚硝酸盐、质子源、有机多元醇或它们的任何组合的任何溶液的溶质强度,以避免受试者的器官和组织发生任何不期望的脱水。

[0256] 摩尔渗透压浓度 (Osm) 定义为溶解在一千克溶剂中的溶质的摩尔数,可以表示为每千克的渗透压摩尔数 (Osmol/kg)。根据本发明,待向人或动物受试者施用的任何溶液的摩尔渗透压浓度通常应在约100mOsmol/kg至约5000mOsmol/kg的范围内,例如约100mOsmol/kg、200mOsmol/kg、300mOsmol/kg、400mOsmol/kg、500mOsmol/kg、600mOsmol/kg、700mOsmol/kg、800mOsmol/kg、900mOsmol/kg或1000mOsmol/kg至约2000mOsmol/kg、2250mOsmol/kg、2500mOsmol/kg、2750mOsmol/kg、3000mOsmol/kg、3250mOsmol/kg、3500mOsmol/kg、3750mOsmol/kg、4000mOsmol/kg、4250mOsmol/kg、4500mOsmol/kg、4750mOsmol/kg或5000mOsmol/kg的范围内。

[0257] 混合各组分以引发NO_x生成

[0258] 我们已经发现,为了引发NO_x生成而混合NO_x生成体系的组分的顺序会对使用由此生成的NO_x的结果产生影响。这种影响的证据在下文实施例6中提供。

[0259] 在该实施例中,我们证明了根据本发明的组合物杀灭THP-1细胞中的结核分枝杆菌HN878的效力是不同的,这取决于:一方面,首先以所需比例将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于其待使用的形式的组合物中所需浓度的浓度混合,然后将浓缩物适当地用水稀释以获得待使用的组合物;或另一方面,首先以所需比例将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以针对其待使用的形式的组合物中所需浓度的浓度混合。

[0260] 此外,无法预测哪种混合成分的方式会在抗微生物作用方面产生更好的结果。虽然一般来说,似乎稀释相对浓缩的预混合物以得到待使用的组合物可能会对THP-1细胞中的结核杆菌HN878产生更好的抗微生物作用,但在一些情况下,其产生的结果不如首先将各组分以所需的使用浓度混合的方法那样好。

[0261] 因此,在本发明的一个实施方案中,制备NO_x生成组合物的方法包括以所需比例将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于其待使用的形式的组合物中所需浓度的浓度混合,以形成浓缩预混合物,随后适当地用水稀释该浓缩预混合物,以提供待使用的组合物。

[0262] 因此,在本发明的另一个实施方案中,制备NO_x生成组合物的方法包括以所需比例将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以针对其待使用的形式的组合物中所需浓度的浓度混合,以提供待使用的组合物。

[0263] 优选实施方案

[0264] 本发明第一至第八方面的优选实施方案是存在以下一种或多种情况的实施方案:

[0265] -一种或多种亚硝酸盐包括(例如,包括或基本上由或仅由)一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或它们的任何组合(组成);

[0266] -质子源包括(例如,包括或基本上由或仅由)抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合(组成);

[0267] -抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合的分子不与聚合物或大分子共价键合;

[0268] -一种或多种有机多元醇包括(例如,包括或基本上由或仅由)每分子具有4个至12个碳原子和4个至12个OH基团的直链糖醇或醛醇,例如山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇

或它们的两种或更多种的任何组合(组成)；

[0269] -一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,其包含由一个非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链组成,例如由其组成,任选地其中1个、2个、3个或每个单糖单元为C₅或C₆单糖单元和/或非环状醇单元为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；

[0270] -在该NO_x生成反应开始时或开始之前,该多元醇组分或该反应液中的该一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于该亚硝酸盐组分或该反应液中的该亚硝酸根离子的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间；

[0271] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分或反应液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于质子源组分或反应液中的质子源的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间；

[0272] -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的接触的应用,在引发,特别是即将引发NO_x生成反应之前,质子源的pH在3.0至9.0的范围内；

[0273] -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的接触的应用,在引发,特别是即将引发NO_x生成反应之前,质子源的pH在4.0至8.0的范围内；

[0274] -对于涉及反应混合物与动物(包括人)受试者的鼻、口、呼吸或肺之间的接触的应用,在引发,特别是即将引发NO_x生成反应之前,质子源的pH在5.0至8.0的范围内；

[0275] -所靶向的微生物选自下文题为“抗微生物用途的靶标”的部分中列出的微生物,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、包括其耐抗生素菌株的铜绿假单胞菌。

[0276] 本发明第九方面的优选实施方案是存在以下一种或多种情况的实施方案：

[0277] -该一种或多种亚硝酸盐包括(例如,包括或基本上由或仅由)一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或它们的任何组合(组成)；

[0278] -该质子源包括(例如,包括或基本上由或仅由)抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合(组成)；

[0279] -该抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或它们的两种或更多种的任何组合的分子不与聚合物或大分子共价键合；

[0280] -该一种或多种有机多元醇包括(例如,包括或基本上由或仅由)每分子具有4个至12个碳原子和4个至12个OH基团的直链糖醇或醛醇,例如山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇或它们的两种或更多种的任何组合(组成)；

[0281] -一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,其包含由一个非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链组成,例如由其组成,任选地其中1个、2个、3个或每个单糖单元为C₅或C₆单糖单元和/或非环状醇单元为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；

[0282] -在该NO_x生成反应开始时或开始之前,该多元醇组分或该反应液中的该一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于该亚硝酸盐组分或该反应液中的该亚硝酸根离子的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间；

[0283] -在NO_x生成反应开始时或开始之前,多元醇组分或反应液中的一种或多种有机多元醇的总摩尔浓度介于质子源组分或反应液中的质子源的总摩尔浓度的0.05倍和3倍之间;

[0284] -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的接触的应用,在引发,特别是即将引发NO_x生成反应之前,质子源的pH在3.0至9.0的范围内;

[0285] -对于涉及该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的接触的应用,在引发,特别是即将引发该NO_x生成反应之前,该质子源的pH在4.0至8.0的范围内;

[0286] -对于涉及反应混合物与动物(包括人)受试者的鼻、口、呼吸或肺之间的接触的应用,在引发,特别是即将引发NO_x生成反应之前,质子源的pH在5.0至8.0的范围内;

[0287] -所靶向的微生物选自下文题为“抗微生物用途的靶标”的部分中列出的微生物,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、包括其耐抗生素菌株的铜绿假单胞菌。

[0288] 组合和组合物

[0289] NO_x生成反应可以多种方式引发。这些方式的特征通常在于使一种或多种亚硝酸盐和质子源在NO_x生成反应可以开始的条件下接触。

[0290] 反应可以通过将组合的单独组分组合来引发。可以在体外实现这种组合,然后将所得组合物施用于受试者或施用于待根据本发明治疗的任何表面。另选地,可以将逸出的气体施用于受试者或施用于待根据本发明治疗的任何表面。更进一步地,所得组合物的两种使用方式可以按时间间隔进行,以便在一些气体逸出之后将组合物施用于受试者或施用于待治疗的任何表面。

[0291] 这种组合可以分步进行,例如,首先将干粉形式的组分混合,然后与水或另一种液体载体介质混合以引发反应。另选地,可首先将干粉形式的组分单独与水或另一种液体载体介质混合,然后将两种或更多种液体混合以引发反应。

[0292] 另选地,根据本发明的NO_x生成反应的组分中的至少一些组分可以混合物形式存在于单一组合物中,并且NO_x生成反应在该组合物上引发。引发NO_x生成反应的一种可能方式可以是例如加入引发反应的关键组分或添加剂,例如,如果组合物的组分是干燥或包封形式,则加入水;如果组合物的成分缺少质子源,则加入质子源。

[0293] 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的一种或多种组分。试剂盒的部件通常装在容器中,这些容器可以是分开的,也可以是经过调整以促进引发NO_x生成反应所需的混合的。需要由试剂盒的使用者引入到其他必要组分中的用于引发NO_x生成反应的关键引发组分,可以是例如亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分中的一者,也可以是附加成分,通常是通常可获得的组分诸如水,其可以由使用者提供。

[0294] 在该专利中定义并描述的组合和组合物的参数通常包括物理参数,例如pH、浓度和摩尔渗透压浓度。在任何可能的情况下,这些参数都在引发NO_x生成反应之前测量。除非另有说明,否则pH参数是指去离子水中的质子源在用于引发NO_x生成反应的浓度下的pH。除非另有说明,否则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,当亚硝酸盐和有机羧酸或有机还原酸混合反应生成一氧化氮气体时,在NO_x生成反应进行的同时,不可能轻易地测量这些参数。

[0295] 此外,应当注意的是,在反应混合物中时,各成分的浓度不一定对应于它们在混合之前在组合的各部分中的浓度。例如,假定根据本发明的用于引发NO_x生成反应的组合物由作为预制溶液一起加入的大约等体积的亚硝酸盐组分和质子源组分形成。在该实施方案中,混合后的反应组合物具有浓度为亚硝酸盐组分的一半的亚硝酸盐浓度和浓度为质子源组分浓度的一半的质子源浓度。

[0296] 根据体系在NO_x生成反应期间或之后的预期用途,组合的各部分和组合物可以是任何合适的物理形式。例如,组合的各部分和组合物可以各自为液体、凝胶或薄膜的形式,因此NO_x生成反应混合物同样为液体、凝胶或薄膜的形式。液体可以适于能够被雾化以吸入到呼吸道或肺中。如果NO_x生成混合物旨在施用于口腔或咽喉,则组合物的各部分和组合物可以是漱口水或饮料的形式。另选地,如果NO_x生成反应混合物旨在以局部施用的方式应用于皮肤,则组合物的各部分和组合可以是软膏、洗剂或乳膏的形式。

[0297] 多组分体系、试剂盒和分配器

[0298] 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并且如本文所述的。多组分体系中的组分适于彼此接触,并且反应混合物和/或逸出气体通过用于在使用前容纳组分的适当容器或储器,以及用于混合组份、分配反应混合物和/或逸出气体,以及总体控制所述混合和分配的装置来分配。在一个优选实施方案中,反应混合物可以夹带在气流中的液滴的雾或气溶胶的形式分配。

[0299] 本发明的试剂盒和分配器通常包括用于在使用前容纳组分的容器中的至少一些容器,至少一个用于混合组分、分配反应混合物和/或逸出气体,以及总体控制所述混合和分配的设备或其他装置,以及在使用前包含在试剂盒或分配器的容器中的组分(如有)。使用说明或使用说明所在位置的指示,例如在线使用说明,可以适当地存在。此类试剂盒和分配器构成了本发明的另一方面

[0300] 本发明的试剂盒可以是用于混合组分、分配反应混合物和/或逸出气体,以及总体控制所述混合和分配的容器和装置的相对简单的集合。此类试剂盒可适当地用于研究目的,或在混合和分配操作中可预期和容许有很大差异的情况下提供。

[0301] 本发明的其他试剂盒可以是一个或多个容器连同—个或多个本发明的分配器的更复杂的集合,该一个或多个容器包括消耗品(是使用者引发NO_x生成反应所需的组合和/或组合物,任选地含有水或其他由用户提供的常用成分)。

[0302] 本发明的分配器通常适用于重复类似的分配反应混合物、包含反应混合物的载体和/或逸出气体的动作。分配器可以包括泵或推进剂系统以将包括NO_x生成反应混合物或逸出气体的组合物从分配器中排出并将其引导至靶标。推进剂系统可以使用在医疗用途上是药学上可接受的或生物相容的加压和/或液化气体,例如加压空气或加压/液化丁烷。另选地,可以使用来自使用者肺部的吸力将包括NO_x生成反应混合物或逸出气体的组合物从分配器中排出并将其引导至靶标。用于本发明的分配器可适当地包括致动器设备,诸如使用者可借以致动分配器的可手动操作的触发器或按钮。此类分配器可适于专业、研究、消费者或患者用途,并且相应地适于促进靶标进行治疗的预期途径。

[0303] 原则上已知有多种试剂盒和分配器装置,它们可以用于或容易地适用于在使用前

容纳组分、混合组分或促进所述混合、分配包含反应混合物和/或逸出气体的组合物,以及总体控制所述混合和分配或促进所述控制。

[0304] 例如:

[0305] -注射器,例如双筒分配注射器。

[0306] -容器系统,例如泵作用容器、挤压作用容器或摇动作用容器,例如包括两个容器,以混合至少亚硝酸盐组分和质子源组分,并分配包括NO_x生成反应或逸出气体的组合物。US 2019/0134080中描述了此类系统,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0307] -装置,用于在使用前容纳水溶液性的组分、混合组分、雾化液体反应混合物并将其分配以供人体肺部吸入,并且用于总体控制所述混合和分配。示例包括软雾吸入器、喷射式雾化器、超声波雾化器和振动筛孔雾化器。WO 03/032928和WO 2009/086470中描述了选择合适的雾化器、液滴尺寸、助剂、包装形式等用于经雾化的通过酸化亚硝酸盐产生的NO_x生成反应介质的吸入,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0308] -上述装置可以被布置成在预混合的液体反应混合物装入雾化器之后进行雾化,并将其分配以供人体肺部吸入,并且用于总体控制所述混合和分配。

[0309] -装置,用于在使用前容纳水溶液形式的组分、混合组分、雾化液体反应混合物并将其分配以供人体肺部吸入,并且用于总体控制所述混合和分配。示例包括定量吸入器。WO 03/032928和WO 2009/086470中描述了选择合适的液滴尺寸、助剂、包装形式等用于经雾化的通过酸化亚硝酸盐产生的NO_x生成反应介质的吸入,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0310] -美国专利9730956中描述了用于将一氧化氮释放溶液喷到上呼吸道中的技术和装置,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0311] -装置,用于在使用前容纳干粉形式的组分并将其分配以供人体肺部吸入。示例包括干粉吸入器(DPI),其可被制成单剂量胶囊或多剂量干粉吸入器,或者被制成储存粉末或多剂量独立泡罩。WO 2009/086470中描述了选择合适的粉末粒度、助剂、包装形式等用于干粉组合的吸入,以在肺内提供反应介质从而通过酸化亚硝酸盐原位生成NO,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0312] -美国专利申请2013/0200109、7066356和2019/0134080中描述了用于在使用前容纳溶液形式的组分、使其充气并以泡沫形式分配用于皮肤消毒剂用途或治疗皮肤病的分配器,其公开内容通过引用方式并入本文;

[0313] -WO 2014/188175中描述了用于容纳组分并将其分配到受试者皮肤的透皮贴剂组件,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0314] 本发明的组合和组合物或逸出气体的剂量可以在很大的范围内变化,这取决于待治疗的疾病、病症或病况(在医学治疗的情况下)或期望的作用(在非医学治疗的情况下)、所需治疗的严重程度和待治疗受试者的病况、年龄和健康状况,或在非医学治疗的情况下待治疗靶标的性质。在医学治疗的情况下,最终将由医生确定适当的剂量。在非医学治疗的情况下,本领域技术人员将能够通过检索相关文献进行合理的试验来研究适当的剂量和治疗方法。

[0315] 在一些实施方案中,发生NO_x生成反应的组合物或从其逸出的气体可在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后600秒内施用于靶位置,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。如此,靶位置可暴露于大量的一氧化氮中。

[0316] 在一些实施方案中,发生NO_x生成反应的组合物可以在靶位置处或附近,例如在微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者(包括无生命的表面和空间)上、内或附近原位形成。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秒有效施用。在其他实施方案中,组合物在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后大于0秒且小于600秒的范围内施用于靶位置或其附近。在更具体的实施方案中,组合物在0秒至120秒的范围内施用。在另外的实施方案中,组合物在0秒至60秒的范围内施用。

[0317] 在其他实施方案中,发生NO_x生成反应的组合物或从其逸出的气体可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秒施用于靶位置或其附近,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。在这种情况下,靶位置,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的一氧化氮,但仍可具有有益的特性,诸如抗微生物作用。在这些实施方案中,发生NO_x生成反应的组合物或从其逸出的气体可以在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后至多48小时施用。在具体的实施方案中,组合物或从其逸出的气体可以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,或至多约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。

[0318] 如果储存得当,发生NO_x生成反应的组合物或从其逸出的气体则可以在亚硝酸盐组分和质子源组分合并后超过48小时施用。例如,组合物可以储存在密封容器中,例如在真空中。在密封容器中的储存通常在亚硝酸盐和有机羧酸或有机还原酸组合后不超过24小时进行。组合物可以在亚硝酸盐组分和质子源组分组合后不超过600秒储存在密封容器中。如此,一定比例的一氧化氮气体得以保留。如果NO_x生成组合物在低温,例如在约-30℃至约+10℃范围内,例如在约1℃至约10℃范围内的温度下储存,则气体的逸出速率可显著减慢,使得组合物的储存时间非常长。

[0319] 在具体的实施方案中,气溶胶分配器可包括多个储器,其中第一储器含有液体形式(例如,水溶液)的亚硝酸盐组分,并且第二储器含有液体形式(例如,水溶液)的质子源组分。在该实施方案中,在所述亚硝酸盐和质子源组分混合之前、期间或之后,各组分可以适当地与推进剂混合。

[0320] 在另一个具体的实施方案中,分配器可以是含有本发明组合物的单筒注射器。可选择组合物的粘度,以便组合物能够通过手动操作或通过注射器的动力操作从注射器分配。例如,组合物可以是液体或凝胶。

[0321] 在另一个具体的实施方案中,分配器可以是具有含有亚硝酸盐组分的第一筒和含有质子源组分的第二筒的多筒注射器。可选择组分的粘度,以便组合物能够通过手动操作或通过注射器的动力操作从注射器分配。例如,每种组分可以独立地是液体或凝胶。

[0322] 其他用于组分的储器:水凝胶

[0323] 在本发明的一些实施方案中,可以使用分子储器,例如水凝胶。水凝胶是高度水合的、通常交联的三维聚合物(均聚物或共聚物)或大分子网络,其能够吸收和保留其干重许多倍的水、其他水性液体或其他非水性亲水液体。液体的吸收通常伴随着水凝胶的溶胀。通过适当选择共价键合到聚合物或大分子的化学组分,可以制备酸性水凝胶或具有其他特殊化学性质的水凝胶。

[0324] 在本发明中可以用作质子源组分的水凝胶是已知的。此类含有酸性-COOH基团的

水凝胶的示例描述于例如WO 2007/007115、WO 2008/087411、WO 2008/087408、WO 2014/188174和WO 2014/188175以及其中提及的文献中,它们所有的公开内容通过引用方式并入本文。WO 2014/188174和WO 2014/188175中特别描述了此类水凝胶在使用NO_x生成的皮肤护理,包括与NO_x生成相结合的药物透皮递送中的用途。此类水凝胶的具体示例包括丙烯酸、甲基丙烯酸、2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(ATBS,购自Vinati Organics Ltd)及它们的盐的均聚物或共聚物。由包括(甲基)丙烯酸或由(甲基)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链羧酸基团。

[0325] 因此,例如,多组分体系可包含第一酸性水凝胶垫或层组分,该组分包含质子源组分,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。亚硝酸盐组分可以是例如含有溶解的亚硝酸盐的液体介质。如此,水凝胶垫或层的表面可以与亚硝酸盐组分接触以引发NO_x生成反应。另选地,亚硝酸盐组分可以是固体载体(例如,垫或层),该固体载体含有形式为在固体载体和水凝胶接触时易于溶解在水凝胶的吸入液体中的亚硝酸盐。

[0326] 通常,固体载体垫或层对于一氧化氮的扩散是可渗透的(完全可渗透的或至少半渗透的)。如此,当固体载体垫或层和水凝胶结合以使亚硝酸盐组分和质子源组分合并时,一氧化氮可以扩散至治疗区域。固体载体垫或层可以是例如网、非织造棉絮、薄膜、泡沫、藻酸盐层或膜。

[0327] 在具体的实施方案中,固体载体层是网。网可以是多条连接的固体绳,其通常是柔性的,形成某些物质从中穿过的孔或间隙的网格。网可以是织造或非织造的。在一些实施方案中,网是非织造的。

[0328] 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示例包括但不限于粘胶、聚酰胺、聚酯、聚丙烯或它们的共混物。可以对聚合物材料进行处理以例如增加其亲水性。在具体的实施方案中,固体载体层是聚丙烯网。

[0329] 在具体的实施方案中,固体载体是吸收性的,并且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。吸收、吸入或浸渍的亚硝酸盐组分在固体载体内可以是固体(干燥的)或水溶液形式。

[0330] 在具体的实施方案中,固体载体包含多于一个的层,并且亚硝酸盐组分被吸收、吸入或浸渍在至少一层中或被涂覆在至少外层上。例如,固体载体可以包括2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个层,诸如聚丙烯网层,其吸收、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。

[0331] 酸性水凝胶具有天然缓冲能力,这是由于内部有大量质子化的侧链酸性基团,当水凝胶表面的侧链酸性基团在NO_x生成反应期间被去质子化时,H⁺离子可以经由吸入的水性介质从侧链酸性基团迁移,以在水凝胶结构的表面保持相对酸性的pH。

[0332] 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/或多元醇组分以用于本发明。质子源组分可以通过在与水凝胶接触的液体介质中提供质子源,和/或通过将质子源吸收、吸入、浸渍或涂覆到固体载体上与此类水凝胶接触。在此类水凝胶中,可以规定亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分都不与水凝胶的聚合物或大分子网络共价键合;例如,考虑到亚硝酸盐组分和质子源组分在期望引发NO_x生成反应之前不得一起反应,本发明所需的所有组分都可以被吸入水凝胶中并包含在水凝胶块内的水性介质中,但不与水凝胶的聚合物或大分子共价键合。

[0333] 水凝胶垫或层的厚度可以在0.5mm至2mm的范围内。在一些实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1mm至2mm的范围内。在具体的实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1.0mm至1.6mm的范围内。

[0334] 上述与质子源组分有关的特征通常将同样适用于用作质子源组分的任何酸性水凝胶。因此,例如,水凝胶可以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。

[0335] 在一些实施方案中,水凝胶可以包括阻挡层。阻挡层通常为聚合物膜,诸如聚氨酯膜,并且位于水凝胶的外表面上。在使用时,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,以便在组合形式的多组分体系和大气之间提供阻挡。与水凝胶相邻的阻挡膜的表面通常具有比相邻水凝胶表面更大的表面积。如此,阻挡层可以延伸到水凝胶的周边之外。在这些实施方案中,阻挡层可以具有围绕其周边边缘的粘合剂,以在使用时将水凝胶粘附到例如受试者的皮肤。

[0336] 在一个具体的实施方案中,本发明提供了一种双组分体系,该双组分体系包括:

[0337] a) 一个或多个网,该一个或多个网吸入、浸渍或涂覆有一种或多种亚硝酸盐,诸如 NaNO_2 ;和

[0338] b) 水凝胶,该水凝胶包含质子源,该质子源包括选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的一种或多种酸,

[0339] 其中组分(a)与组分(b)分开,并且其中组分(a)和(b)中的一者或多者还包含一种或多种有机多元醇;

[0340] 其特征在于以下一项或多项:

[0341] (a) 该一种或多种有机多元醇以反应产出提高量存在;

[0342] (b) 该质子源不仅仅是包含共价键合到三维聚合物基质的侧链羧酸基团的水凝胶;

[0343] (c) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0344] (d) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0345] (e) 当使用一种或多种增塑剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是甘油;

[0346] (f) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0347] (g) 当使用一种或多种增粘剂时,该一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0348] (h) 上述(b)至(g)中的任何一项或多项,其中“不仅仅”一词替换为“不包括”;

[0349] (i) 该一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0350] (j) 该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(硬脂酸甘油酯)、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、二甘醇、三甘醇、四甘醇、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、己二醇、辛甘醇、

除本文所列之外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸酯、乙基己基甘油、它们的任何组合或上述有机多元醇中的任一种与甘油和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0351] 为免生疑问,特此确认与本发明的方面相关的上述表征特征(a)至(j)的实施方案和优选项同样适用于本实施方案。

[0352] 例如,这种体系可以通过将组分(a)和(b)组合以引发NO_x生成反应来使用。然后,这种组合可例如通过局部施用用于人体或动物体的疗法或其他治疗。用途可以如W02014/188174和W0 2014/188175中所述,也可以如下所述。体系还可以用于如下所述的非医疗用途。当用于体系接触受试者皮肤(包括粘膜)的局部医疗应用时,一个或多个网可以是皮肤接触层。

[0353] 在治疗或手术中的用途

[0354] NO_x生成反应进行的根据本发明的组合物和从其逸出的气体在治疗和外科手术中具有许多应用,包括治疗和/或预防治疗、矫正疾病和病症和病况的手术、美容手术、重建手术,包括人和兽医学和外科手术。当对用组合物或从其逸出的气体治疗有响应的身体损伤或异常引起或加重焦虑、抑郁或其他精神疾病或病症时,身体病况的治疗、预防或缓解可以相应地治疗、预防或缓解精神病况,由此本发明的用途也延伸到精神健康领域。

[0355] 一氧化氮和一氧化氮生成组合物的许多生理作用和基于此的医学治疗在文献中已有报道,因此已经开发了许多治疗方法。提供以下非穷举列表作为说明。所列出的用途以及其他未列出的用途都包括在本发明和专利中。

[0356] 通过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等人, Med.Res.Rev., 2009年9月;第29卷(第5期),第683-741页);

[0357] Houston等人, J.Clin.Hypertens. (格林威治), 2014年7月,第16卷(第7期),第524-529页描述了口服一氧化氮补充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;

[0358] 通过一氧化氮保护组织免受由于低血液供应引起的损伤(参见van Faassen等人, Med.Res.Rev., 2009年9月;第29卷(第5期),第683-741页);

[0359] 一氧化氮作为神经递质在氮能神经元,例如对平滑肌,例如胃肠道和勃起组织中的平滑肌有活性的氮能神经元中的作用(参见Toda等人, Pharmacol. Ther., 2005年5月;第106卷(第2期),第233-266页);

[0360] 通过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,促进血管稳态(参见Dessey和Ferron, Current Medical Chemistry-Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2004年;第3卷(第3期),第207-216页);

[0361] 一氧化氮降低心脏收缩性和心率的作用(参见Navin等人, J.Cardiovascular Pharmacology, 2002年;第39卷(第2期),第298-309页);

[0362] 促进毛细血管和肺扩张的关键新生儿护理,例如新生儿患者的原发性肺动脉高压和胎粪吸入后的治疗(参见Barrington等人, The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017年;1, CD000399 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375630>); Chotigeat等人, J.Med.Assoc.Thai., 2007年;第90卷(第2期),第266-271页;以及Hayward等人, Cardiovascular Research, 1999年;第43卷(第3期),第628-638页);

[0363] 预防糖尿病患者的血管损伤、内皮功能障碍和血管炎症、神经病和非愈合性溃疡,

并降低随之而来的需要截肢的风险(参见nfb University Studies-“Nitric Oxide Holds Promise for Diabetes”,

[0364] <http://www.nfb.org/Images/nfb/Publications/vod/vod212/vodspr0613.htm>);

[0365] 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;治疗血氧不足呼吸窘迫的可逆性原因(参见Mark等人,N.Eng.J.Med.,2005年12月22日;第353卷(第25期),第2683-2695页);

[0366] 施用一氧化氮作为肺栓塞继发的急性右心室衰竭患者的挽救疗法(参见Summerfield等人,2011年;Respir.Care,第57卷(第3期),第444-448页);

[0367] 治疗心绞痛、百草枯中毒和其他心血管疾病(参见Abrams,The American Journal of Cardiology,1996年;第77卷(第13期),第31C-37C页);

[0368] 治疗膀胱收缩功能障碍(参见Moro等人,Eur.J.Pharmacol.,2012年1月;第674卷(第2-3期),第445-449页;以及Andersson等人,Br.J.Pharmacol,2008年2月;第153卷(第7期),第1438-1444页);

[0369] 治疗急性和慢性肺部感染和败血症的治疗(参见Fang等人,Nature Reviews.Microbiology,2004年10月;第2卷(第10期),第820-832页;以及Goldfarb等人,Critical Care Medicine,2007年1月;第35卷(第1期),第290-292页);

[0370] 包括一氧化氮的毒活性氮中间体(RNI)被认为是在活化的小鼠巨噬细胞对抗毒性结核分枝杆菌的抗分枝杆菌作用中的效应分子(参见Chan等人,J.Exp.Med.,1992年4月;第175卷,第1111-1122页);

[0371] 气态一氧化氮对于治疗囊性纤维化患者的耐抗生素细菌和真菌性肺部感染可能是有效的(参见Deppisch等人,2016年2月9日;“一氧化氮气体治疗囊性纤维化患者耐抗生素细菌和真菌性肺部感染:I期临床研究(Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis:aPhase I clinical study)”,Springer,DOI 10.1007/s15010-016-0879-x);

[0372] 据报道,一氧化氮是一种潜在的用于皮肤病的局部广谱抗微生物剂,产生耐药性的可能性很小(参见B L Adler和A J Friedman,Future Sci.OA,2015年;第1卷(第1期),FS037);

[0373] 一氧化氮是神经递质,并与男性和女性的神经元活性和从回避学习到生殖器勃起范围的各种功能有关(参见Kim等人,J.Nutrition,2004年,第134卷,第28735页);

[0374] Sullivan等人,Cardiovascular Research,1999年8月,第43卷(第3期),第658-665页中描述了一氧化氮治疗男性阳痿和勃起功能障碍的用途;

[0375] 一氧化氮作为手术佐剂用于辅助创伤愈合、减少缺血-再灌注损伤、辅助手术后的心肺恢复和血管手术后的恢复,以及辅助矫形手术的术后恢复的潜在用途已有报道(参见A Krausz和A J Friedman,Future Sci.OA,2015年;第1卷(第1期),FS056);

[0376] WO 95/22335和Hardwick等人,2001年,Clin,Sci.100,第395-400页中描述了NO的抗微生物和创伤愈合作用;

[0377] 欧洲专利1411908(阿伯丁大学)报道了显示一氧化氮可有效治疗包括黑曲霉的甲下感染的数据;

[0378] 将NO_x生成组合物局部应用于皮肤以治疗真菌性皮肤感染,诸如足癣(脚气)(参见Weller等人,J.Am.Acad.Dermatol.,1998年4月,第38卷(第4期),第559-563页;

[0379] 将NO_x生成组合物局部应用于皮肤以治疗病毒性皮肤感染(参见WO 99/44622);

[0380] 将NO_x生成组合物局部应用于皮肤以治疗以血管收缩为基本问题的病况,诸如雷诺综合征(也称为雷诺现象)(参见Tucker等人,Lancet,1999年11月13日,第354卷,第9191期,第1670页-1675);

[0381] WO 2000/053193中描述了酸化亚硝酸盐作为在皮肤表面局部产生一氧化氮的药剂用于治疗外周局部缺血和相关病况(诸如雷诺现象)和创伤(诸如术后创伤)和烧伤的用途;

[0382] 美国专利9,730,956(Stenzler等人)要求保护液态一氧化氮释放溶液(NORS)治疗人的创伤的用途.NORS也被认为具有抗细菌、抗真菌和/或抗病毒特性,并且提供了证明对鲍曼不动杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和溶血性曼氏杆菌的抗细菌效力的数据。提供了证明NORS对H1N1流感病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒和牛副流感3型病毒的抗病毒效力的数据。提供了证明NORS对红色毛癣菌和须毛癣菌的抗真菌效力的数据;

[0383] Chou S-H等人,“去带环对左心室压力过载大鼠肺部ET-1、eNOS和cGMP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年,第231卷,第954-959页;

[0384] Gladwin MT等人,“亚硝酸盐作为血管内分泌一氧化氮储库,有助于缺氧信号传导、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年,第291卷,第H2026-H2035页;

[0385] Hunter CJ等人,“吸入的雾化亚硝酸盐是一种缺氧敏感、NO依赖性的选择性肺血管扩张剂(Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator)”,Nat.Med.,2004年,第10卷,第1122-1127页;

[0386] Ozaki M等人,“通过内皮细胞的一氧化氮减少了缺氧肺血管重塑(Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium)”,Hypertension,2001年,第37卷,第322-327页;

[0387] Rubin LJ,2006年,“肺动脉高压(Pulmonary arterial hypertension)”,Proc.Am.Thorac.Soc.,第3卷,第111-115页;

[0388] Yellon D.M.等人,2007年,“心肌再灌注损伤(Myocardial Reperfusion Injury)”,N.Engl.J.Med.,第357卷,第1121-1135页;

[0389] Duranski M.R.等人,“亚硝酸盐在体内心脏和肝脏缺血-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年,第115卷,第1232-1240页;

[0390] Jung K-H.等人,“早期静脉输注亚硝酸钠可保护脑免受体内缺血-再灌注损伤(Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury)”,Stroke,2006年,第37卷,第2744-2750页;

[0391] Esme H.等人,“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年,第54卷,第477-483页;

[0392] 中国专利申请CN 101028229中描述了酸化亚硝酸盐释放NO作为改善人的皮肤质量的药剂的用途;

[0393] 中国专利申请CN 101062050中描述了酸化亚硝酸盐释放NO作为促进毛发生长和预防或治疗人类脱发的药剂的用途。

[0394] 关于一氧化氮生理作用的其他一般讨论可参见例如,Lancaster等人,Proc Natl Acad Sci,1996年,第91卷,第8137-8141页;Ignarro等人,Proc Natl Acad Sci,1987年,第84卷,第9265-9269页;综述于Brent,J Cell Science,2003年,第116卷,第9-15页;综述于Murad,N Engl J Med,2006年,第355卷,第2003-2011页。

[0395] 已公开的用于递送NO的药理学形式综述于Butler和Feelisch,Circulation,2008年,第117卷,第2151-2159页。

[0396] 以上引用的出版物中的每一篇的公开内容通过引用方式并入本文。

[0397] 本发明适用于一氧化氮和一氧化氮生成体系的所有治疗和手术用途,包括但不限于上述参考文献中公开的具体疗法和手术用途和其他公开的疗法和手术用途,以及基于一氧化氮和一氧化氮生成反应产物的生理作用的基础知识的疗法和手术用途。

[0398] 血管舒张

[0399] 一氧化氮诱导血管舒张的特性表征了使用本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体的许多治疗。

[0400] 对血管舒张有响应的疾病、病症和病况的具体示例包括但不限于与局部缺血和皮肤损伤有关的病况。

[0401] 与组织局部缺血有关的疾病包括雷诺综合征、重度原发性血管痉挛和组织局部缺血,例如由手术、脓毒性休克、辐射或外周血管疾病(例如,糖尿病和其他慢性系统性疾病)引起的组织局部缺血。

[0402] 当用于治疗或预防与手术导致的组织局部缺血有关的病况时,本发明的组合或组合物或从使用本发明的NO_x生成反应逸出的一氧化氮,可以在手术之前、期间或之后施用于受试者。组合、组合物或逸出气体可施用于手术部位或手术部位附近。可以使用这种治疗或预防组织局部缺血的手术方法的示例包括移植手术,组织或器官移植手术、冠状动脉手术、颈动脉导管插入术、提供用于施用全身性药物诸如化疗药物的内置动脉或静脉导管的手术、包括但不限于带蒂或旋转皮瓣的美容手术方法、在与先前手术方法相同的部位进行切口的重复手术、在皮肤不良和/或下层组织灌注不良或由于(诸如动脉硬化或糖尿病患者的)伴随疾病而预期灌注不良的区域进行的手术、在血管受损或损伤的创伤情况下的手术,以及去除或矫正皮肤或皮下动静脉畸形的手术。

[0403] 例如,通过将根据本发明的组合、组合物或逸出气体施用于器官,该组合、组合物或逸出气体可用于治疗或预防器官的缺血再灌注损伤。器官可以是选自心脏(例如,以预防或治疗心肌缺血)、脑部(例如,以治疗或预防脑缺血和/或梗塞(中风))、肺部(例如,以治疗或预防肺的缺血再灌注损伤)、肾脏(例如,以治疗或预防肾脏的缺血再灌注损伤)和肝脏

(例如,以治疗或预防肝脏的缺血再灌注损伤)中的一者或多者。手术可以是器官的移植。组合、组合物或逸出气体的施用可以在局部缺血发作之后进行或可以是预防的。

[0404] 透皮药物递送用途

[0405] 一氧化氮诱导药物透皮递送的特性代表了本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体的另一重要用途。

[0406] WO 02/17881和WO 2014/188175描述了用于生成一氧化氮的组合物和组合物以及从其逸出的气体的透皮药物递送的用途,并且在这些公开中描述的用于此类用途的相同条件、优选项和实施例也适用于本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体,它们的公开内容通过引用方式并入本文。

[0407] 通常,本发明的组合和组合物将包括一种或多种透皮递送至受试者的药物活性剂,并且将作为局部组合或组合物形式提供以应用于受试者的皮肤。关于可以使用的药物活性剂的示例,请参见上文题为“任选的附加组分”的部分。

[0408] 合适的局部组合可以包括含亚硝酸盐的网和单独的含质子源的水凝胶,两者适于在受试者的皮肤上一起使用,如上文题为“用于组合物或组合物体系的其他储库;水凝胶”的部分中所述。多元醇和药物活性剂可以组合的一种或多种单独组分提供或掺入水凝胶中,或者这些选择的任何组合可分别用于多元醇和药物活性剂。

[0409] 创伤、皮肤损伤和烧伤的治疗

[0410] 一氧化氮诱导血管舒张和药物透皮递送以及杀死或防止微生物增殖的特性引出了本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体在治疗创伤、皮肤损伤和烧伤中的另一重要应用。

[0411] 可使用本发明治疗的病况包括溃疡、皮肤供体部位、手术创伤(术后)、烧伤(诸如烫伤、浅层烧伤、部分皮层烧伤和全层烧伤)、撕裂和擦伤。创伤可以是慢性或急性的。溃疡可以是各种来源的,诸如动脉或静脉来源的。溃疡的示例包括腿溃疡,例如慢性腿溃疡或急性腿溃疡;压迫性溃疡,例如慢性压迫性溃疡或急性压迫性溃疡;静脉性溃疡;以及与糖尿病有关的溃疡,诸如糖尿病足溃疡。

[0412] WO 2014/188174描述了用于生成一氧化氮的组合物和组合物以及从其逸出的气体用于治疗创伤、皮肤损伤和烧伤的用途,并且在此公开中描述的相同条件也适用于本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0413] 通常,本发明的组合和组合物将包括一种或多种药物活性剂,并且将作为局部组合或组合物形式提供以应用于受试者的皮肤。关于可以使用的药物活性剂的示例,请参见上文题为“任选的附加组分”的部分。对于创伤、皮肤损伤和烧伤的治疗,一种或多种药物活性剂可以适当地选自镇痛药和/或麻醉剂(例如,局部麻醉剂)(例如,减轻慢性疼痛、急性疼痛或神经性疼痛的镇痛药和/或麻醉剂)、抗微生物剂、消毒剂、抗炎剂和抗瘢痕形成剂。

[0414] 合适的局部组合可以包括含亚硝酸盐的网和单独的含质子源的水凝胶,两者适于在受试者的皮肤上一起使用,如上文题为“用于组合物或组合物体系的其他储库;水凝胶”的部分中所述。多元醇和药物活性剂可以组合的一种或多种单独组分提供或掺入水凝胶中,或者这些选择的任何组合可分别用于多元醇和药物活性剂。

[0415] 局部抗微生物用途

[0416] 在抗微生物应用中,治疗有效的NO剂量可以很小,例如低至百万分之几百(ppm),

例如100ppm至600ppm(参见例如,Ghaffari等人,Nitric Oxide Biology and Chemistry, 2009年,第14卷,第21-29页,其公开内容通过引用方式并入本文),而一氧化氮的有效性在很大程度上取决于与皮肤接触的时间(Ormerod等人,BMC Research Notes,2011年,第4卷,第458-465页,其公开内容通过引用方式并入本文)。

[0417] 缓慢局部释放一氧化氮的提议已有公开(参见例如,美国专利6103275)。然而,所得的局部NO剂量持续时间少于一小时,因此局部抗微生物作用较差。如在上文题为“多组分体系、试剂盒和分配器”的部分中所讨论的,以及如下文实施例所示的,本发明在局部和非局部施用系统中都能实现更长的NO给药期,从而产生显著的临床优势。

[0418] 特别地,研究已发现,本发明的组合和组合物能够在NO_x生成反应开始后的最初约200-500秒内提供较强的一氧化氮产出(“初始突释”),随后任选地在气体逸出停止或下降至有效水平以下之前,长时间缓慢释放一氧化氮,持续数小时(“拖尾”)。本发明的组合和组合物逸出的NO剂量超过公布的最小有效抗微生物剂量,从而使本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体具有潜在有效的局部抗微生物用途。

[0419] 用于局部抗微生物应用的NO_x生成组合和组合物的制剂在现有技术,例如美国专利申请2014/0056957(其公开内容通过引用方式并入本文)中有详细描述,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单独的含质子源的水凝胶,两者适于在受试者的皮肤上一起使用,如上文题为“用于组合物或组合物体体系的其他储库;水凝胶”的部分中所述。多元醇和任何药物活性剂可以组合的一种或多种单独组分提供或掺入水凝胶中,或者这些选择的任何组合可分别用于多元醇和药物活性剂。

[0420] 其他皮肤或局部治疗

[0421] 一氧化氮和一氧化氮生成组合物的其他局部应用包括刺激毛发生长和治疗阳痿和勃起功能障碍。

[0422] 本发明的组合和组合物可以配制成局部施用于此类治疗。

[0423] 局部敷料和敷料系统,例如创伤敷料

[0424] 在局部治疗中,通常希望在施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污染,有助于去除愈合过程中产生的脓液或碎屑,防止或限制治疗组合物在洗澡或淋浴时或通过衣服接触或由于受试者的正常活动而损失,并缓冲治疗区域以免受碰撞或摩擦。

[0425] 为此,通常将治疗纳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或透水的,并且可以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。

[0426] 在另一方面,本发明提供了一种局部敷料,例如创伤或皮肤敷料,或敷料系统,该局部敷料包含根据本发明第五方面的组合或组合物,该敷料或敷料系统的至少一个组分包含背衬片和任选的一个或多个其他层,诸如选自纱布和垫层的层。根据本发明第五方面的组合或组合物适当地布置在背衬片的面向皮肤的一侧上,并且布置成当敷料施用于皮肤并且NO_x生成反应引发时,用NO_x生成反应混合物或从其逸出的气体处理期望的皮肤区域。

[0427] 敷料或敷料系统可以在使用前适当地放在密封的无菌包装中。

[0428] 鼻、口、呼吸道和肺用途

[0429] 一氧化氮诱导血管舒张和药物透皮递送以及杀死或防止微生物增殖的特性引出了本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体在鼻、口、呼吸道和肺的粘膜和组织的治疗中的另一重要应用,和/或鼻、口、呼吸道和肺作为用于将本发明的组合和组合物递送至人或动物受试者的施用途径的用途。

[0430] 可使用本发明治疗的病况包括肺部疾病,诸如病毒感染,例如流感、SARS-CoV或SARS-CoV-2;肺动脉高压;移植涉及的心脏、脑部和器官的缺血再灌注损伤;慢性阻塞性肺病(COPD)(特别是肺气肿、慢性支气管炎);哮喘,包括重症哮喘和病毒和细菌诱导的哮喘恶化和难治性(不可逆性)哮喘;鼻内或肺部细菌感染,诸如肺炎、肺结核、非结核分枝杆菌感染和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。

[0431] WO 2009/086470描述了用于生成一氧化氮的雾化液体组合和组合物以及从其逸出的气体用于治疗鼻、口、呼吸道和肺的疾病的用途,和/或鼻、口、呼吸道和肺作为用于将此类组合和组合物递送至人或动物受试者的施用途径的用途,并且在此公开中描述的用于此类用途的相同条件、优选项和实施例也适用于本发明的组合和组合物以及从其逸出的气体,其公开内容通过引用方式并入本文。

[0432] 通常,用于递送至鼻、口、呼吸道和肺的本发明的组合和组合物将包括一种或多种药物活性剂。关于可以使用的药物活性剂的示例,请参见上文题为“任选的附加组分”的部分。

[0433] 经由鼻、口、呼吸道和肺的递送途径来实施本发明,有两种主要的递送方法。第一种方法是将本发明的组合或组合物直接递送至鼻、口、呼吸道和肺。第二种方法是从使用本发明的NO_x生成反应逸出的气体递送至鼻、口、呼吸道和肺,而本发明的组合或组合物不进入患者体内。

[0434] 1.将组合或组合物直接递送至鼻、口、呼吸道和肺

[0435] 组合或组合物或它们的组分可以干燥固体形式直接递送至鼻、口、呼吸道和肺,从而使粘膜的液体溶解固体成分材料并引发NO_x生成反应。

[0436] 组合的组分可以单独或一起施用。在一个优选实施方案中,质子源或其至少一种组分可在其余组分之前施用,以便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,这有助于NO_x生成反应的快速引发。

[0437] 将组合的任何干燥组分或干燥组合物直接递送至鼻、口、呼吸道和肺可以适当地通过使用干粉吸入器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组分)或干粉组合物递送至受试者的干粉吸入来进行,其中该干粉吸入器将含有小于6微米体积平均直径的颗粒的气溶胶递送至受试者。干粉吸入器可以适用于装入干粉的单次或多次给药,使得干粉吸入器以小于6微米体积平均直径的颗粒向受试者递送约0.1mg/次吸气至约100mg/次吸气的一种或多种干粉组分或干粉组合物。

[0438] 另外地或另选地,组合或组合物或它们的组分可以亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一种或多种组分的溶液液滴的雾或喷雾形式直接递送至鼻、口、呼吸道或肺。

[0439] 本文所述的本发明的实施方案通常适用于直接递送至受试者的鼻、口、呼吸道或肺。非限制性地,例如,组合或组合物或它们的组分可与一种或多种生理上相容的稀释剂、

载体和/或赋形剂联合直接施用于受试者的鼻、口、呼吸道或肺,和/或与一种或多种其他组分(特别是旨在提供一种或多种特定益处的功能性组分)联合提供。合适的生理上相容的稀释剂、载体和/或赋形剂的示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。如有需要,也可以存在少量的非毒性辅助物质,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、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸酯、三乙醇胺油酸酯等。一般而言,根据预期的施用方式,药物制剂将含有约0.005重量%至约95重量%,优选约0.5重量%至约50重量%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,或者对于本领域技术人员而言是显而易见的。参见例如,Martindale,第39版(2017年),默克索引,第15版(2013年),古德曼和吉尔曼的《治疗学药理基础》,第13版(2017年),英国国家处方集网(<https://bnf.nice.org.uk/>),雷明顿:《药学科学与实践》,第22版(2012年),或《内科医师用药手册》,第71版(2017年)。

[0440] 在一个优选实施方案中,用于递送至受试者的鼻、口、呼吸道或肺的组合或组合物将采取单位剂型的形式,诸如含有液体、待悬浮的固体、干粉、冻干物或其他组合物的小瓶,该组合或组合物除了含有NO_x生成反应的组分之外,还可适当地含有稀释剂,诸如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等;润滑剂,诸如硬脂酸镁等;粘合剂,诸如淀粉、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素衍生物等。

[0441] 将包含组合的组分的任何液体或液滴形式的组合物直接递送至鼻、口、呼吸道和肺可以适当地通过使用雾化器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组分)或液体形式的组合物递送至受试者的吸入来进行,其中该雾化器将含有小于5微米体积平均直径的颗粒的气溶胶递送至受试者。雾化器可以适用于装入组合的液体组分或液体组合物的单次或多次给药,使得雾化器以小于5微米体积平均直径的液滴,优选以具有在约2 μ m至约5 μ m范围内的直径的液滴,向受试者递送约0.1mg/次吸气至约100mg/次吸气的一种或多种液体组分或液体形式的组合物。

[0442] 在一个实施方案中,基于允许形成具有主要介于约2微米和约5微米之间的总气体动力学中位数直径(MMAD),包含组合的组分的液滴或液滴形式的组合物的气溶胶来选择雾化器。

[0443] 在一个实施方案中,包含组合的组分的液滴或液滴形式的组合物的递送量提供了对肺部病理、呼吸道感染和/或肺外、全身分布的治疗作用,也可治疗肺外和全身疾病。

[0444] 在此之前,研究已表明,两种类型的雾化器,即喷射式和超声波雾化器能够产生并递送具有介于2 μ m和4 μ m之间的尺寸的气溶胶颗粒。这些粒径已被证明对于中呼吸道沉积是最佳的,因此,对于由革兰氏阴性菌引起的肺部细菌感染的治疗是最佳的,该革兰氏阴性菌诸如铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肠杆菌种、肺炎克雷伯氏菌、产酸克雷伯氏菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、粘质沙雷氏菌、流感嗜血杆菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽寡养单胞菌、木糖氧化产碱杆菌、金黄色葡萄球菌和多重耐药铜绿假单胞菌。然而,除非使用特别配制的溶液,否则这些雾化器通常需要更大的体积来施用足够量的药物以获得治疗作用。喷射式雾化器利用空气压力将水溶液破碎成气溶胶液滴。超声波雾化器利用压电晶体对水溶液进行剪切。然而,通常情况下,喷射式雾化器在临床条件下的效率仅为约10%,而超声雾

化器的效率仅为约5%。因此,尽管雾化器中放有大量的药物,但肺部沉积和吸收的药物量只是10%的一小部分。较小的粒径或缓慢的吸入速率可以产生深肺沉积。根据适应症,本发明可能需要中肺和肺泡沉积,例如用于抗微生物活性的中呼吸道沉积,或用于肺动脉高血压和全身递送的中肺和/或肺泡沉积。用于使用雾化器进行的制剂递送的组合物和方法的示例性公开可参见例如US 2006/0276483,包括使用振动筛孔雾化器递送雾化微粒的技术、方案和表征的描述。US 2006/0276483的公开内容通过引用方式并入本文。

[0445] 因此,在一个实施方案中,振动筛孔雾化器用于在优选实施方案中递送包含组合的组分的液滴或液滴形式的组合物的气溶胶。振动筛孔雾化器包括与隔膜流体接触的液体存储容器以及吸气阀和呼气阀。在一个实施方案中,将约1mL至约5mL待递送的液体制剂置于储存容器中,并使气溶胶发生器产生粒径选择性地介于约1 μ m和约5 μ m体积平均直径之间的雾化气溶胶。

[0446] 因此,例如,在优选实施方案中,将亚硝酸盐组分制剂或质子源组分(其中之一或两者任选地包括一种或多种根据本发明的有机多元醇)置于液体雾化吸入器中,并按以下递送剂量制备:约1mL至约5mL的给药溶液约7mg至约700mg,优选约1mL至约5mL的给药溶液约17.5mg至约700mg,更优选约1mL至约5mL的给药溶液约17.5mg至约350mg,优选约1mL至约5mL的给药溶液约0.1mg至约300mg,更优选约1mL至约5mL的给药溶液约0.25mg至约90mg,产生体积平均直径颗粒大小在约1 μ m和约5 μ m之间的制剂。

[0447] 通过非限制性示例,包含组合的组分的雾化液体或液滴形式的组合物可以所述可吸入递送剂量在小于约20分钟,优选小于约10分钟,更优选小于约7分钟,更优选小于约5分钟,更优选小于约3分钟,并且在一些情况下最优选小于约2分钟内施用。

[0448] 通过非限制性示例,在其他情况下,包含组合的组分的雾化液体或液滴形式的组合物在较长时间段内施用时可达到更好的耐受性和/或表现出曲线下面积(AUC)形状增强特征。在这些条件下,所述可吸入递送剂量在大于约2分钟,优选大于约3分钟,更优选大于约5分钟,更优选大于约7分钟,更优选大于约10分钟,并且在一些情况下最优选约10分钟至约20分钟内施用。

[0449] 单独组分制剂的示例可以包含(i)亚硝酸盐的水溶液,其具有大于约6,例如在约6至约8的范围内,例如约7的pH;和(ii)质子源组分的水溶液,至少两种单独的液体溶液组分(i)和(ii)能够混合形成NO_x生成组合物,该NO_x生成组合物可以用于装载雾化器以递送至人患者或兽医受试者。

[0450] 对于水性和其他非加压液体体系,可使用各种雾化器(包括小体积雾化器)来雾化组合或组合物的组分。压缩机驱动的雾化器采用喷射技术,并使用压缩空气来生成液体气溶胶。此类设备可购自例如Healthdyne科技公司;英维康公司;Mountain医疗设备公司;帕瑞呼吸设备公司(弗吉尼亚州中洛锡安);Mada医疗公司;Puritan-Bennet;Schuco公司,DeVilbiss健康医疗公司;以及Hospitak公司。超声波雾化器依靠压电晶体振动形式的机械能来生成可吸入液滴,并且可购自例如欧姆龙健康医疗公司和DeVilbiss健康医疗公司。振动筛雾化器依靠压电或机械脉冲来生成可吸入液滴。与本文所述的亚硝酸盐或提供亚硝酸盐或一氧化氮的化合物一起使用的雾化器的其他示例描述于美国专利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,所有这些专利通过引用方式并入本文。

[0451] 可以与包含本文所述的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用示例包括由Aerogen (Aerogen公司,爱尔兰戈尔韦)生产的Respirgard II®、Aeroneb®、Aeroneb®Pro、AeroEclipse XL®和Aeroneb®Go;由Aradigm生产的AERx®和AERx Essence™;由伟康公司(美国宾夕法尼亚默里斯维尔)生产的Porta-Neb®、Freeway Freedom™、SideStream、SideStream Plus、Ventstream和I-neb;和帕瑞GmbH生产的PARI LC-Plus®、PARI LC-Star®、PARI LC-Sprint®和e-Flow™(帕瑞呼吸设备公司,美国弗吉尼亚州中洛锡安;帕瑞GmbH,德国施塔恩贝格)。根据制造商的说明书,这些雾化器中的任何一种都可以与面罩或口罩一起使用。通过进一步的非限制性示例,美国专利6,196,219在此通过引用方式整体并入。

[0452] 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。对于水性气溶胶制剂,药物可以约0.67mg/mL至约700mg/mL的浓度存在;在某些优选实施方案中,亚硝酸盐以约0.667mg亚硝酸根阴离子/mL至约100mg亚硝酸根阴离子/mL的浓度存在。此类制剂提供了向肺部适当区域的有效递送,浓度更高的气溶胶制剂具有额外的优势,能够在非常短的时间段内将大量药物物质递送至肺部。在一个实施方案中,优化制剂以提供耐受良好的制剂。因此,某些优选实施方案包含亚硝酸盐(诸如亚硝酸钠、亚硝酸钾或亚硝酸镁),并且被配制成具有良好的口感,pH为约4.7至约6.5,摩尔渗透压浓度为约100mOsmol/kg至约3600mOsmol/kg,并且任选地在某些另外的实施方案中,渗透离子(诸如氯离子、溴离子)浓度为约30mM至约300mM。

[0453] 在一个实施方案中,用于制备气溶胶制剂的溶液或稀释剂具有为约4.5至约9.0,优选约4.7至约6.5(例如,作为酸性混合物),或为约7.0至约9.0(作为单瓶配置)的pH范围。该pH范围提高了耐受性,根据本文他处所述的某些实施方案,加入掩味剂也可提高耐受性。当气溶胶为酸性或碱性时,它可引起支气管痉挛和咳嗽。然而,pH的安全范围是相对的,一些患者可以耐受弱酸性气溶胶,而其他患者则会出现支气管痉挛。任何pH小于约4.5的气溶胶通常都会诱导支气管痉挛。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的气溶胶都可能具有低耐受性,因为身体组织通常不能缓冲碱性气溶胶。pH控制为低于约4.5和高于约8.0的气雾剂通常产生肺部刺激,伴有严重的支气管痉挛性咳嗽和炎症反应。由于这些原因以及为了避免患者的支气管痉挛、咳嗽或炎症,确定气溶胶制剂的最佳pH为约pH 5.5至约pH 8.0。

[0454] 因此,在一个实施方案中,将本文所述的气溶胶制剂的pH调节至约4.5至约7.5,对于酸性混合物最优选的pH范围为约4.7至约6.5,对于单瓶配置最优选的pH范围为约7.0至约8.0。通过非限制性示例,根据本文公开的某些实施方案的组合物还可以包括pH缓冲液或pH调节剂,其通常是由有机酸或碱制备的盐,并且在优选实施方案中,包括如本文所述的酸性赋形剂(例如,非还原酸诸如柠檬酸或柠檬酸盐,诸如柠檬酸钠)或缓冲液(诸如柠檬酸盐)或上文所述并参考表1的其他缓冲液。因此,这些和其他代表性的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。

[0455] 许多患者对各种化学味道,包括苦味、咸味、甜味、金属感的敏感性增加。为了产生耐受良好的药物产品,可以通过加入掩味剂和赋形剂、调节摩尔渗透压浓度以及加入甜味剂来实现掩味。

[0456] 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。他们的呼吸道对低渗或高渗、酸性或碱性条件,以及任何渗透离子诸如氯离子的存在特别敏感。这些条件的任何失衡或高于某一浓度值的氯化物的存在会引发支气管痉挛或炎症事件和/或咳嗽,从而极大地影响可吸入制剂的治疗。在未有利地使用根据本文公开的某些实施方案的调节pH、摩尔渗透压浓度和掩味剂的情况下,这两种条件都可能阻止雾化药物有效递送至支气管内空间。

[0457] 在一些实施方案中,本文公开的亚硝酸盐化合物(或在不同的实施方案中,提供亚硝酸盐或一氧化氮的化合物)的水溶液的摩尔渗透压浓度通过提供赋形剂来调节。在一些情况下,一定量的渗透离子,诸如氯离子、溴离子或其他阴离子,可以促进雾化亚硝酸盐成功且有效的递送。然而,研究已发现,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。

[0458] 支气管痉挛或咳嗽反射可能并非在所有情况下都可以通过使用具有给定摩尔渗透压浓度的用于雾化的稀释剂来改善。然而,当稀释剂的摩尔渗透压浓度在一定范围内时,这些反射往往可以得到充分的控制和/或抑制。安全且耐受的用于雾化治疗化合物的优选溶液具有约100mOsmol/kg至约3600mOsmol/kg的总摩尔渗透压浓度,其中氯离子浓度范围为约30mM至约300mM,优选约50mM至约150mM。这种渗透压控制支气管痉挛,并且作为渗透阴离子的氯离子溶液控制咳嗽。因为溴离子和碘离子都是渗透离子,因此它们都可以取代氯离子。此外,碳酸氢根可以取代氯离子。

[0459] 纳米颗粒药物分散体也可以进行冷冻干燥以获得适合于鼻腔或肺部递送的粉末。此类粉末可以含有具有表面改性剂的聚集的纳米微粒药物颗粒。这种聚集体可以具有在可吸入范围内的尺寸,例如约2微米-约5微米MMAD。

[0460] 2. 将从NO_x生成反应中逸出的气体递送至鼻、口、呼吸道或肺

[0461] 用于将计量量的一氧化氮递送至患者肺部的吸入器是公知的。一般而言,一氧化氮在场外生成,并用连接到专用输送装置使用的加压气瓶运送到医院或诊所。可以提及INOMAX治疗系统作为示例(英国BOC医疗,

[0462] <https://www.bochealthcare.co.uk/en/products-and-services/products-and-services-by-category/medical-gases/inomax/inomax.html>)。缩写INOMAX(吸入性一氧化氮)通常用于INOMAX治疗系统的气瓶,缩写INOVent用于递送设备。对INOMAX治疗系统的评估已有公开,例如Kirmse等人,Chest,1998年6月,第113卷(第6期),第1650-1657页。该出版物的公开内容通过引用方式并入本文。

[0463] 根据本发明第一方面的方法可适当地在专用NO制造设备中实施,并且根据本发明第二方面的气体产品以正常方式用压力气瓶提供给使用者。然后,以已知的方式将加压气瓶与分配、监测、给药、混合和递送装置联合使用。

[0464] 抗微生物用途的靶标

[0465] 如前所述,本发明的NO_x生成反应和从其逸出的气体对潜在大范围的微生物具有生物杀伤或生物静力作用,从而产生许多抗微生物应用。

[0466] 微生物可以是例如选自细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微寄生物中的任何一者或多者,并且可以是单个细胞、生物体或菌落。细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微粒可(例如,作为人或其他动物的肠道微生物组)存在于宿主生物体上或宿主生物体中,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/或微寄生物可以在是外、体内或离体的。

[0467] 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或预防免疫抑制受试者的微生物感染。

[0468] 当微生物存在于人或其他动物的细菌感染、真菌感染、病毒或微寄生物感染中时,感染可能与感冒、流感、结核病、SARS、COVID-19、肺炎或麻疹等疾病有关。

[0469] 1. 细菌细胞

[0470] 细菌可以是致病细菌种类。微生物感染可以由致病细菌种类引起的感染,该致病细菌种类包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、需氧菌和厌氧菌、抗生素敏感菌和耐抗生素菌。

[0471] 可以使用本发明靶向的细菌种类的示例包括放线菌属、芽孢杆菌属、巴尔通体属、博德特氏菌属、疏螺旋体菌属、布鲁氏菌属、弯曲杆菌属、衣原体属、嗜衣原体属、梭菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、埃希氏菌属、弗朗西丝氏菌属、嗜血杆菌属、螺杆菌属、军团杆菌属、钩端螺旋体属、李斯特氏菌属、分枝杆菌属、支原体属、奈瑟菌属、假单胞菌属、立克次氏体属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、链球菌属、密螺旋体属、脲原体属、弧菌属或耶尔森氏菌属的种类。本发明也可以靶向它们的任何组合。

[0472] 在具体的实施方案中,微生物可以是棒状杆菌属、分枝杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属的致病细菌种类或它们的任何组合。

[0473] 在更具体的实施方案中,待靶向的微生物可以选自衣氏放线菌、炭疽芽孢杆菌、脆弱拟杆菌、百日咳杆菌、伯氏疏螺旋体、伽氏疏螺旋体;阿氏疏螺旋体;回归热疏螺旋体;流产布鲁氏菌;犬布鲁氏菌;羊布鲁氏菌;猪布鲁氏菌;空肠弯曲杆菌;肺炎衣原体;沙眼衣原体;鹦鹉热嗜衣原体;肉毒梭菌;艰难梭菌;产气荚膜梭菌;破伤风梭菌;白喉棒状杆菌;犬埃里希体;查菲埃里希体;粪肠球菌;尿肠球菌;大肠杆菌,诸如肠产毒性大肠杆菌(ETEC)、肠致病性大肠杆菌、肠侵袭性大肠杆菌(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;流感嗜血杆菌;幽门螺杆菌;肺炎克雷伯氏菌;嗜肺军团菌;钩端螺旋体种;单核细胞增多性李斯特氏菌;麻风分枝杆菌;结核分枝杆菌;脓肿分枝杆菌;溃疡分枝杆菌;肺炎支原体;淋病奈瑟氏菌;脑膜炎奈瑟氏菌;铜绿假单胞菌;星状诺卡氏菌;立克次体;伤寒沙门氏菌;鼠伤寒沙门氏菌;索氏志贺氏菌;痢疾志贺氏菌;金黄色葡萄球菌;表皮葡萄球菌;腐生葡萄球菌;无乳链球菌;肺炎链球菌;酿脓链球菌;绿色链球菌;梅毒密螺旋体梅毒亚种;霍乱弧菌;鼠疫耶尔森氏菌;以及它们的任何组合。

[0474] 特别地,微生物可以选自肺炎衣原体、炭疽杆菌、白喉棒状杆菌、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、肺炎链球菌或它们的任何组合。

[0475] 微生物可以是耐抗生素或抗生素敏感性致病细菌种类或耐抗生素或抗生素敏感性细菌种类菌株。一氧化氮治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)的用途描述于例如WO 02/20026中,其公开内容通过引用方式并入本文。因

此,可以使用本发明杀死或治疗的耐抗生素或抗生素敏感性致病细菌种类的示例是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(MSSA)。

[0476] 2. 真菌细胞

[0477] 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。

[0478] 可以使用本发明靶向的真菌种类的示例包括曲霉属、芽生菌属、假丝酵母属(例如,耳假丝酵母)、球孢子菌属、隐球菌属(特别是新型隐球菌或格特隐球菌)、组织胞浆菌属、毛霉菌属、肺囊虫属(例如,耶氏肺囊虫)、孢子丝菌属、踝节菌属或它们的任何组合的种类。

[0479] 真菌感染的示例包括曲霉病(诸如变应性支气管肺曲霉病)、足癣(脚气)、念珠菌属的致病种类引起的感染(诸如阴道酵母感染、真菌趾甲感染和尿布疹)、股癣和体癣(癣菌病)。

[0480] 3. 病毒颗粒

[0481] 微生物可以是病毒颗粒。感染可以由致病病毒引起。

[0482] 可以使用本发明靶向的病毒的示例包括流感病毒、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)、星状病毒和肝病毒。特别地,本发明的组合物可用于治疗或预防由选自H1N1流感病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒、牛副流感3型病毒、SARS-CoV-2及它们的任何组合中的一者引起的感染。

[0483] 特别地,本发明可以用于治疗由病毒感染引起的疾病或病症。可以用本发明靶向的此类疾病的示例包括呼吸道病毒疾病、胃肠道病毒疾病、出疹性病毒疾病、肝病毒疾病、皮肤病毒疾病、出血性病毒疾病和神经系统病毒疾病。

[0484] 呼吸道病毒感染包括流感病毒、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和严重急性呼吸综合症(SARS)。胃肠道病毒性疾病包括诺如病毒感染、轮状病毒感染、腺病毒感染和星状病毒感染。出疹性病毒疾病包括麻疹、风疹、水痘、带状疱疹、红疹、天花、第五病和基孔肯雅病毒疾病。肝病毒疾病包括甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎。皮肤病毒疾病包括疣,诸如生殖器疣、口腔疱疹、生殖器疱疹和接触传染性软疣。出血性病毒疾病包括埃博拉、拉沙热、登革热、黄热病、马尔堡出血热和克里米亚-刚果出血热。可以使用本发明靶向的神经系统病毒疾病包括脊髓灰质炎、病毒性脑膜炎、病毒性脑炎和狂犬病。

[0485] 4. 寄生性微生物

[0486] 微生物可以是寄生性微生物(微寄生虫)。感染可以由致病寄生性微生物引起。

[0487] 可以使用本发明靶向的寄生性微生物的示例包括原生动物。

[0488] 特别地,本发明可以靶向肉足纲(例如阿米巴,例如内阿米巴属,诸如溶组织内阿米巴或迪斯帕内阿米巴)、鞭毛纲(例如鞭毛虫,例如贾第鞭毛虫和利什曼虫)、纤毛亚门(例如纤毛虫,例如肠袋虫属)、孢子虫纲(例如疟原虫属和隐孢子虫属)及它们的任何组合的原生动物组。

[0489] 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)。

[0490] 人/动物宿主或受试者

[0491] 受试者可以是动物或人受试者。本文的术语“动物”通常可以包括人；然而，当术语“动物”出现在短语“动物或人受试者”等中时，根据上下文应当理解为特别指非人动物，或者对“人”的提及仅特别说明动物可以是人的选项以免生疑问。

[0492] 在具体的实施方案中，受试者是人受试者。人受试者可以是婴儿或成人受试者。

[0493] 在具体的实施方案中，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）或哺乳纲（哺乳动物）。在具体的实施方案中，受试者是哺乳纲或鸟纲中的动物受试者。

[0494] 在具体的实施方案中，受试者是家养动物种类。家养动物种类可以是下列种类之一：

[0495] -适合于人类生态位的共生体（例如，狗、猫、豚鼠）

[0496] -猎食的猎物或养殖的农场动物（例如，奶牛、绵羊、猪、山羊）；和

[0497] -主要用于驮运重物的动物（例如，马、骆驼、驴）

[0498] 家养动物的示例包括但不限于：羊驼、曲角羚羊、北美野牛、骆驼、金丝雀、水豚、猫、牛（包括巴厘牛）、鸡、领西獾、鹿（包括黇鹿、梅花鹿、白唇鹿和白尾鹿）、狗、驴、野鸽、鸭、大羚羊、麋鹿、鹌鹑、雪貂、大额牛、山羊、鹅、珍珠鸡、豚鼠、大旋角羚、马、美洲驼、貂、驼鹿、小鼠、骡、麝牛、鸵鸟、鸚鵡、猪、鸽、鹌鹑、兔、大鼠（包括大甘蔗大鼠）、驯鹿、弯角大羚羊、绵羊、火鸡、水牛、牦牛和瘤牛。

[0499] 动物/人宿主或受试者的器官、结构和内部空间

[0500] 本发明的组合物或多组分体系所施用的器官不受限制。器官的示例包括皮肤和呼吸系统、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、表皮系统、肌肉系统、神经系统、生殖系统和骨骼系统的器官。

[0501] 心血管系统的器官的示例包括心脏、肺、血液和血管。消化系统的器官的示例包括唾液腺、食管、胃、肝、胆囊、胰腺、小肠、结肠、直肠和肛门。内分泌系统的器官的示例包括下丘脑、垂体、松果体或松果腺、甲状腺、甲状旁腺和肾上腺，即肾上腺体。排泄系统的器官的示例包括肾脏、输尿管、膀胱和尿道。淋巴系统的器官的示例包括淋巴、淋巴结和血管。免疫系统的器官的示例包括扁桃体、腺样体、胸腺和脾。表皮系统的器官的示例包括哺乳动物的皮肤、毛发和指甲，以及鱼类、爬行动物和鸟类的鳞，和鸟类的羽毛。神经系统的器官的示例包括脑、脊髓和神经。生殖系统的器官的示例包括性器官，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。骨骼系统的器官的示例包括骨、软骨、韧带和肌腱。

[0502] 人受试者的腔体包括但不限于口、鼻、耳、咽喉、呼吸道、肺、胃肠道、背体腔（诸如颅腔或脊椎腔）或腹体腔（诸如胸腔、腹腔或盆腔）。

[0503] 表面的体外抗微生物处理

[0504] 本发明的组分和组合物以及从根据本发明的NO_x生成反应逸出的气体可用于体外抗微生物治疗。“体外”是指经处理的表面不是活的生物体，即使它最终可能用于医学应用。

[0505] 这种用途的示例包括在使用前对手术器械、皮下注射针和其他医疗设备进行消毒，以及在医院、诊所或其他任何地方对表面进行清洁或处理以减少或防止病原体传播的方法。

[0506] 其他示例包括在将假体和可植入装置装入受试者体内之前对这些设备进行灭菌

的方法,该可植入装置诸如支架(例如,冠状动脉支架),手术螺钉、杆、板和夹板、整形外科植入物、心脏起搏器、胰岛素输注装置、导管、造口术装置、人工晶状体、耳蜗植入物、电疼痛减轻植入物、可植入避孕装置、神经刺激器、人造心脏瓣膜、电极、静脉滴注和药物递送装置等。

[0507] 如有需要,本发明的组分或组合物可以涂覆在假体或可植入设备的表面上,由此在 NO_x 生成反应中逸出的 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发挥其他生理作用。

[0508] 用于假体或可植入装置的表面的生物相容的技术,包括掺入功能性涂层诸如包含本发明的组分或组合物的涂层,是本领域技术人员公知的。参见例如,Gultepe等人,Advanced Drug Delivery Reviews,2010年3月8日,第62卷(第3期),第305-315页;以及美国专利5702754和6270788以及其中提及的出版物,它们所有的公开内容通过引用方式并入本文。

[0509] 用于无生命表面的更普遍的抗微生物处理的组合物和方法是本领域公知的,并且在此不需要广泛描述。抗菌组合物例如用于保健行业、食品服务行业、肉类加工业和个体消费者的私营单位。抗菌清洁组合物通常在水性和/或醇载体中含有一种或多种活性抗菌剂或其组分、表面活性剂和一种或多种其他成分,例如染料、香料、pH调节剂、增稠剂、皮肤调理剂等。广谱抗菌或抗微生物组合物旨在减少表面上一系列病原体的病原体负荷。通常,组合物是液体(或在使用前由固体预混合物制成液体),液体在适当地通过加水进行任何所需的浓度调节后,通常借助于布或其他擦拭设备涂抹或喷洒到待处理的表面上,然后晾干或擦掉。常规的组合物和表面处理方法原则上适于与本发明一起使用,其中活性抗微生物剂是或包含根据本发明的 NO_x 生成组合物或其组分。

[0510] 关于可与本发明联合使用的已知抗微生物组合物和使用方法的进一步讨论和示例,可参见例如美国专利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EP 0505935;和PCT专利申请WO 98/01110;WO 95/32705;WO95/09605;和WO 98/55096;这些专利的内容通过引用方式全文并入本文。

[0511] 改善人和/或动物健康的用途

[0512] 除了上述医学用途之外,本发明还可用于人或动物受试者的非治疗应用。非治疗应用与治疗应用的区别在于受试者是健康的,或者该应用不靶向治疗受试者确实具有的任何诊断疾病、病症或病况。

[0513] 非治疗应用可以包括旨在改善受试者的健康或健康感觉,或提高受试者的代谢效率或免疫系统活性,以便受试者能够更好地发挥正常功能或抵抗未来感染的治疗。非治疗应用还包括有助于受试者的认知功能或产生信心和控制感的治疗。

[0514] 为了用于这种非治疗应用,本发明的组合和组合物可以与药物制剂类似的方式或以非药物方式配制。关于与药物制剂类似的制剂的进一步细节,请参见上文题为“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、胶囊或可口服摄取的液体的形式。

[0515] 如在上文题为“在治疗或手术中的用途”的部分中所提及的,本发明的医疗和/或手术用途可在改善健康或增强信心方面向患者提供次要益处。

[0516] 植物用途

[0517] 一氧化氮对活的或死的植物的有益效果是已知的。本发明包括应用方法、装置、组合、试剂盒、组合物、用途和从其逸出的气体以提供对活的或死的植物的有益效果。

[0518] 一氧化氮和一氧化氮生成体系对植物的已知用途的示例包括：

[0519] 通过一氧化氮预防或延迟切花和植物的萎蔫(参见Siegel-Itzkovich,BMJ,1999年;第319卷(第7205期),第274页;以及Mur等人,2013年;“植物中的一氧化氮:当前知识状态的评估(Nitric oxide in plants:an assessment of the current state of knowledge)”,AoB PLANTS doi:10.1093/aobpla/pls052(<https://doi.org/10.1093%2Faobpla%2Fpls052>));

[0520] 通过一氧化氮调节植物-病原体相互作用,促进植物超敏反应,与生物体在固氮根瘤中共生,发育侧根和不定根以及根毛,并控制气孔开口(参见Mur等人,2013年;同上);

[0521] 一氧化氮在植物中的抗氧化剂和活性氧物质应答中的作用(参见Verma等人,2013年;“一氧化氮(NO)抵消在芥菜中由活性氧(ROS)介导的镉诱导的细胞毒性过程:ROS、NO和抗氧化剂应答之间的相互干扰(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)”;*BioMetals*);

[0522] 一氧化氮在生长素、细胞分裂素和其他植物激素的信号传导途径中的作用(参见Liu等人,Proceedings of the National Academy of Sciences,2013年;第110卷(第4期),第1548-1553页)。

[0523] 以上引用的出版物中的每一篇的公开内容通过引用方式并入本文。

[0524] 此外,上述本发明的一氧化氮生成体系和从其逸出的气体的抗微生物效果特别但不完全描述于“在治疗或手术中的用途”、“局部抗微生物用途”、“鼻、口、呼吸道和肺用途”和“抗微生物用途的靶标”的部分中,同样适用于靶向植物的微生物感染,并且本发明也扩展至此类用途。

[0525] 当与使用本发明的一氧化氮生成反应和/或由此生成的一氧化氮、任选的其他氮氧化物和/或任选的其前体一起使用时,一氧化氮和一氧化氮生成体系对植物的上述已知的用途和所有其他用途构成了本发明的其他方面。

[0526] 经处理的植物可以特别是作物或家养植物,即由人类栽培的植物种类。

[0527] 作物包括但不限于粮食作物,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,诸如玫瑰和郁金香。

[0528] 供人类食用的作物的另外的示例包括但不限于生产水稻、小麦、甘蔗和其他糖料作物的作物、玉米、大豆油、马铃薯、棕榈油、木薯、豆类作物、葵花籽油、菜油、芥子油、高粱、小米、落花生、豆类、甘薯、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、山竹果、番石榴、辣椒、胡椒、茶叶、黄瓜、橙子、核桃、杏仁、胡萝卜、芜菁、椰子、柑橘、柠檬、酸橙、草莓和榛子。

附图说明

[0529] 在附图中:

[0530] 图1示出了在实施例1的不同反应条件下随时间推移逸出的一氧化氮(nmol NO/mg 亚硝酸盐)的累积曲线图。

[0531] 图2至图16示出了实施例2中所述的各种试验的结果。

[0532] 图17示出了用于SIFT-MS测量的装置的示意图。

[0533] 图18至图21示出了实施例3中所述的关于已知抗生素、羧酸溶液、羧酸-亚硝酸盐溶液和羧酸-亚硝酸-多元醇溶液的组合对脓肿分枝杆菌的抗微生物活性的各种试验的结果。

[0534] 图22示出了实施例4中所述的关于对含有柠檬酸、亚硝酸钠和甘露糖醇的溶液中大量临床分离培养物的最低抑菌浓度(MIC)的试验的结果。

[0535] 图23示出了实施例5中所述的关于对含和不含多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液中铜绿假单胞菌的抗微生物活性的试验的结果。

[0536] 图24至图27示出了实施例6中所述的关于对THP-1细胞中结核分枝杆菌HN 878的抗微生物活性的试验的结果。

[0537] 图28示出了实施例7中所述的关于以下项的试验的结果:(a)在一系列稀释度下(横轴为亚硝酸盐摩尔浓度),在MOI=0.002(●)和MOI=0.02(■)时对MDCK细胞中甲型H1N1流感病毒的细胞毒性(LDH细胞毒性测定)和抗微生物活性,其中细胞毒性以灰色表示,细胞毒性标度在右侧(在测量的亚硝酸盐浓度达到并包括0.015M时,细胞毒性≤LDH对照的1%);和(b)在MOI=0.002并且亚硝酸盐浓度为0.15M、0.015M和0.0015M时与奥司他韦(1μM)相比的平板照片。前一句中所述的平板的顺序与图中平板从左到右的顺序相同(有两个实验,并且各次实验中相应的平板上下对应显示)。最右侧紧靠奥司他韦对板的右侧的一对平板是病毒对照。细胞毒性显示在每对试验平板下面,为LDH对照的百分比(%) (在感染后24小时3次LDH测定的平均值)。

[0538] 图29示出了亚硝酸钠、用氢氧化钠缓冲至pH 5.8的柠檬酸和甘露糖醇的酸化溶液在类似条件下(描述于实施例3中)与阿米卡星和阴性对照相比杀死脓肿分枝杆菌的有效性的试验结果。

[0539] 图30和图31以示意图的形式(图30)示出了实施例10中所述的用于治疗人受试者的肺部感染的本发明的实施方案,和与吸入性气体一氧化氮(图31的左侧)相比,根据本发明的液态NO生成制剂与肺组织之间的接触点(图31的右侧)的视图(图31)。

[0540] 图32示出了实施例8的LDH细胞毒性测定的结果(试验1和2)。数据表示为两次实验的平均值±标准偏差(SD)。SD显示为灰色误差条。将最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设定为100%,并且所有样品结果均为相对于该值的值。LDH阳性对照是来自试剂盒的阳性对照。黑色条(2小时温育)是在每种情况下每对条的左侧条,并且红色条(24小时温育)是在每种情况下每对条的右侧条。

[0541] 图33示出了实施例8(试验1)在MOI 3.0时对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。在试验1中,使用SARS-CoV-2在四个感染复数(MOI)下进行一次病毒减产测定,使用接种病毒的返滴定法进行确认。对于接种MOI 3的细胞,滴定后在病毒对照孔中发现log₁₀TCID₅₀/mL为2.1。对于一些试验条件,可能观察到SARS-CoV-2产量的降低。在温育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。可能是因为在Vero E6细胞上24小时的复制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显示为误差棒。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)。

[0542] 图34示出了实施例8 (试验2) (a) 在MOI 0.3时和 (b) 在MOI 3.0时对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。该方法对应于试验1在这些MOI时的部分,不同之处在于制剂是试验2制剂并且温育进行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显示为误差棒。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)。

[0543] 图35示出了实施例9在MOI 3.0时对SARS-CoV的抗病毒测试的结果。在用结晶紫进行细胞单层染色之前,在显微镜下检查2个平板,并对细胞病变效应 (CPE) 进行评分。在这些平板中发现存在细胞碎片形式的CPE,其位于底层单层上。示出了在显微镜下检查的两个平板的结果。数据是每个条件的单次滴定。对于其余的板,由于细胞单层太致密,在结晶紫染色后无法对CPE进行评分。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)。

[0544] 实施例

[0545] 提供以下非限制性实施例以进一步阐述本发明。

[0546] 实施例1和2中使用的材料、装置和方法

[0547] 溶液

[0548] 通过将适当的物质溶解在去离子水中,制备0.1M和1M柠檬酸 (Health Supplies Limited,英国桑顿希思)、0.1M柠檬酸钠 (飞世尔科技,英国拉夫堡)、1M亚硝酸钠 (西格玛奥德里奇,英国多塞特)、0.5M和1M山梨糖醇 (Special Components,英国切斯特菲尔德)、0.5M和1M D-甘露糖醇 (西格玛奥德里奇,英国多塞特)、3M氢氧化钠 (飞世尔科技,英国拉夫堡) 以及0.1M和1M L-抗坏血酸 (ICN Biomedicals公司,美国俄亥俄州) 的储备液。去离子水 (18.2M Ω) 获自Arium Mini实验室水系统 (德国赛多利斯)。

[0549] 柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液通过两种方法制备:

[0550] 1.使用西格玛奥德里奇于2018年说明的体积 (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>) 滴定0.1M柠檬酸和0.1M柠檬酸钠的储备液;

[0551] 2.将已知质量的柠檬酸溶解在少量去离子水中,以制备0.1M或1M的柠檬酸溶液,然后滴定3M氢氧化钠和去离子水的储备液,以达到所需的缓冲液pH (pH 3至pH 6.2)。

[0552] 以类似方法制备抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液,其中使用抗坏血酸代替方法1中的柠檬酸,并且使用抗坏血酸钠代替方法1中的柠檬酸钠。

[0553] 通过用多元醇 (例如,山梨糖醇或甘露糖醇) 的储备液溶解已知质量的亚硝酸钠来掺入多元醇。

[0554] 缓冲液和储备液的成分加入的顺序并不重要,因此可以使用任何混合顺序。

[0555] 所有标准溶液在制备48小时内使用。使用溶解在去离子水中的邻苯二甲酸酯 (pH 4) 和磷酸盐 (pH 7) 片剂 (Fisher Scientific UK Ltd,英国莱斯特郡) 制备校准缓冲液。

[0556] 选择离子流动管质谱仪 (SIFT-MS) 启动和验证

[0557] Voice200选择离子流动管质谱仪 (SIFT-MS) (Syft Technologies Ltd,新西兰) 用于该报告中描述的所有气体分析。该仪器使用氦气 (BOC,英国萨里) 作为载气。

[0558] 在分析之前,SIFT-MS通过简单的启动程序准备使用。将仪器从待机模式中取出,并进行一系列压力检查以确保毛细管流动处于可接受的操作范围内。然后使用制造商的含有苯、甲苯、乙苯和二甲苯的校准气体标准(Syft Technologies Ltd,新西兰)进行自动验证程序。最后,使用10ppm二氧化氮标准(空气产品公司,英国萨里)进行内部性能检查。

[0559] NO的生成程序

[0560] SIFT-MS设备、反应腔室和气体通道的设置如图17所示。

[0561] 用HT1温度智能传感器(SensorPush,美国纽约)连续监测反应腔室中的温度。将反应腔室,即带有硅胶密封条(乐购,英国韦林加登城)的670mL塑料(不含双酚A(不含BPA))夹锁槽连接到泵,该泵使加湿空气不断循环通过该反应腔室并经过SIFT-MS入口毛细管。以类似于Vernon,W.和Whitby,L.(1931年)，“实验室实验中空气的定量加湿(The quantitative humidification of air in laboratory experiments)”Trans.Faraday Soc.,第27卷,第248-255页中所述的方法,通过泵送空气通过两个装有去离子水的德雷克塞尔瓶(Dreschel bottle)来实现加湿。在使用前使该系统平衡30分钟。开始连续的SIFT-MS扫描,以便实时检测和定量NO、NO₂和HONO。观察到这些化合物的稳定基线读数后(浓度>2分钟保持不变),立即将样品置于反应腔室中并监测三小时。

[0562] 在SIFT-MS验证之后,加热到120℃的毛细管入口延伸部分通过T形接头连接到反应腔室的出口,以便SIFT-MS能够对从反应腔室流出的气体进行实时取样。

[0563] 通过在称量盘中称量来自德国弗兰肯塔尔RKW集团的大约0.3cm×0.3cm的梳理非织造20克/平方米(20gsm)聚丙烯网(约3mg)来制备样品。在将10μL试验或对照溶液液滴加到网中心(确保液滴浸入筛网)之后,重新称重。最后,将称量盘中载有溶液的网置于反应腔室中,并吸取最终的10μL缓冲液液滴加入到网的中心。迅速密封反应腔室,并可在SIFT-MS界面上瞬时观察到含氮物质的生成。

[0564] 生成气体的分析

[0565] 使用SIFT-MS的选定离子模式分析所生成的气体,并按顺序分批进行扫描,每次持续1000秒。下列产物质量进行重复扫描:亚硝酸30m/z,亚硝酸48m/z,二氧化氮46m/z,以及一氧化氮30m/z。这些测量使用所有三种正前体离子实现:水合氢(H₃O⁺)、亚硝酸鎗(NO⁺)、双氧基(O₂⁺)。空气以660mL/min的流速流过反应室,SIFT-MS入口以2.7mL/min的流速对该空气流进行取样。

[0566] 所有实施例的pH测量

[0567] 使用具有玻璃电极LE438探头的Five EasypH计(梅特勒-托利多,瑞士)进行所有pH测量。用第二pH计确保该电极的精度;手持式205探头(Testo,美国奥尔顿)。每天用新鲜的缓冲液校准pH计。

[0568] 实施例1

[0569] 使用pH为3的1M柠檬酸与含有含或不含1M多元醇的吸入1M亚硝酸钠的网接触生成一氧化氮

[0570] SIFT-MS设备、反应腔室和气体通道的设置如上所述并且如图17所示。

[0571] 如上所述将分别含有1M甘露糖醇和1M山梨糖醇的两种1M亚硝酸钠试验溶液吸入网中,以制备两种试验网。

[0572] 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。

[0573] 在每个试验中,将通过上述两种方法1和2中的任一种方法制备的pH约为3的1M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的缓冲液加入到各试验和对照网中,以引发如上所述的气体生成。

[0574] 结果示于图1中。

[0575] 数据显示,当与pH为3的1M柠檬酸接触的吸入1M亚硝酸钠的网还含有1M甘露糖醇或1M山梨糖醇(甘露糖醇具有比山梨糖醇更大的作用)时,其产生比不存在多元醇时明显更大量的二氧化氮。

[0576] 实施例2

[0577] 不同羧酸、酸浓度、pH和多元醇对一氧化氮生成的作用的研究

[0578] 如上所述制备样品,如下改变有机酸、pH和多元醇:

[0579]

实验	在每次试验中吸入筛网的试验溶液	在对照试验中吸入筛网的对照溶液	加入网的缓冲液(其中指出了另选的缓冲液,它们用于独立的试验,如相关图中所示)
A(图2)	1M亚硝酸钠	-	1M柠檬酸/柠檬酸盐(pH约3) 1M抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH约3)
B(图3)	含1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含1M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含1M木糖醇的1M亚硝酸钠 含1M阿糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M柠檬酸/柠檬酸盐(pH约3)
C(图4)	含1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含1M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含1M木糖醇的1M亚硝酸钠 含1M阿糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH约3)
D(图5)	含0.5M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M木糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M阿糖醇的1M亚硝酸钠	-	1M柠檬酸/柠檬酸盐(pH约3)
E(图6)	含0.5M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M木糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M阿糖醇的1M亚硝酸钠	-	1M抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH约3)

[0580]

F (图7)	含1M阿糖醇的1M亚硝酸钠	-	0.5M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约3) 0.5M抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH约3)
G (图8)	含1M甘露糖醇的1M亚硝酸钠	-	0.5M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约3) 0.5M抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH约3)
H (图9)	含1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含1M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含1M木糖醇的1M亚硝酸钠 含1M阿糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约3) 1M抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH约3)
I (图10)	含0.5M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M木糖醇的1M亚硝酸钠 含0.5M阿糖醇的1M亚硝酸钠	-	1M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约3) 1M抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH约3)
J (图11)	含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	0.5M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约3)
K (图12)	含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	0.5M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约4.8)
L (图13)	含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	0.5M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约6.2)
M (图14)	含1M甘油的1M亚硝酸钠 含2M甘油的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约2)
N (图15)	含1M甘露糖醇的1M亚硝酸钠 含1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠 含1M甘露糖醇和1M甘油的1M亚硝酸钠 含1M山梨糖醇和1M甘油的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH约2)
O (图16)	含0.5M甘露糖醇的1M亚硝酸钠	1M亚硝酸钠	1M柠檬酸/柠檬酸盐 (pH 5.8)

[0581] SIFT-MS设备、反应腔室和气体通道的设置如上所述并且如图17所示。

[0582] 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。

[0583] 在使用时,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。

[0584] 将通过上述两种方法1和2中的任一种方法制备的具有上述pH的上述或每种缓冲液加入到各试验中,并且加入到各试验中的对照网(如有使用)中,以引发如上所述的气体生成。

[0585] 结果示于图2至图13中。图中的“正常”是指不存在多元醇。

[0586] 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约3)产生的NO的逸出速率。该图清楚地显示,与抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液相比,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液产生更高的初始突释,并且逸出持续时间更长,水平更高。柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的痕量峰值为约55000ppb,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液的

痕量峰值约为28000ppb。

[0587] 图3涉及含和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。与无多元醇相比,在存在多元醇的情况下,逸出、初始突释和随后释放的速率随着时间的推移发生改变。木糖醇和甘露糖醇产生最高峰,其次是山梨糖醇,然后是无多元醇,再是阿糖醇。在500s-1000s区,木糖醇和阿糖醇具有最高产量,其次是甘露糖醇、山梨糖醇,然后是无多元醇。峰突变:甘露糖醇=木糖醇(约64000ppb) > 山梨糖醇(约53000ppb) > 无多元醇(约50000ppb) > 阿糖醇(约40000ppb)。

[0588] 图4涉及含和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。峰突变:甘露糖醇(约40000ppb) > 阿糖醇(约35000ppb) > 木糖醇=无多元醇(约30000ppb) > 山梨糖醇(约23000ppb),即与图3的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲体系不同的顺序。

[0589] 图5涉及含和不含有多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和亚硝酸盐体系(为了清楚起见,省略了具有与甘露糖醇线大致相同峰突变的“无多元醇”线)。多元醇浓度为0.5M。峰突变:阿糖醇(约76000ppb) > 无多元醇=甘露糖醇(约48000ppb) > 木糖醇=山梨糖醇(约40000ppb)。可以看出,其与类似的1M多元醇柠檬酸/柠檬酸盐缓冲体系(图3)相比顺序不同,表明多元醇的作用与多元醇浓度有关。

[0590] 图6涉及含和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,省略了具有与山梨糖醇线大致相同峰突变的“无多元醇”线)。多元醇浓度为0.5M。峰突变:木糖醇(约50000ppb) > 甘露糖醇(约38000ppb) > 山梨糖醇=无多元醇(约30000ppb) > 阿糖醇(约23000ppb)。同样,观察到其与类似的柠檬酸/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)相比顺序不同。因此证明了多元醇的作用与多元醇化学/立体化学和多元醇摩尔浓度有关。

[0591] 图7和图8比较了在存在多元醇(0.5M)的情况下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液中NO的逸出速率。这些图强调了在图2至图6中观察到的一些差异。图7中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的痕量峰值为约76000ppb,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液的痕量峰值为约22000ppb。图8中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的痕量峰值为约48000ppb,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液的痕量峰值为约38000ppb。

[0592] 图9比较了1M多元醇浓度下的累积产出。对于抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液,3000秒时的差异很小,顺序为甘露糖醇>山梨糖醇=阿糖醇>木糖醇。对于3000秒时的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,顺序为木糖醇>阿糖醇>甘露糖醇>山梨糖醇>无多元醇。数据显示,一氧化氮的产出可以增加至多或甚至超过约100%,例如在无多元醇(曲线E,3000秒后获得了为约10000nmol/mg亚硝酸盐的累积一氧化氮逸出,之后还在增加)和木糖醇(曲线A,相同时间后获得了为约20000nmol/mg亚硝酸盐的累积一氧化氮逸出,之后也还在增加)之间。

[0593] 图10比较了0.5M多元醇浓度下的累积产出。对于3000秒时的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,顺序为阿糖醇>甘露糖醇=木糖醇>山梨糖醇>无多元醇(为了清楚起见,省略了位于山梨糖醇线以下的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的“无多元醇”线)。对于3000秒时的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液,顺序为木糖醇>甘露糖醇>山梨糖醇>阿糖醇。同样,该顺序与1M多元醇不同(图9)。

[0594] 图11至图13比较了含和不含甘露糖醇(0.5M)的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液1M和亚硝酸钠(1M)在不同pH下的累积曲线。随着pH值的增加,差异变小,并且在pH值为6.2时,差异消

失。因此从这些实验可以看出,多元醇的作用也与pH有关。

[0595] 图14示出了在1M亚硝酸钠溶液中存在和不存在甘油(1M和2M)的情况下,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH约2)的累积NO(nmol/cm²网面积)产出。在前2000秒内,1M和2M甘油的NO产出略低于不存在多元醇时的NO产出。在较长的时间下,含甘油的制剂具有更大的产出,其中2M甘油具有更大的产出。

[0596] 图15示出了在亚硝酸盐溶液中存在或不存在多元醇的情况下,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH约2)和1M亚硝酸钠溶液的累积NO(nmol/cm²网面积)产出。该图显示,与不存在甘油时相比,在甘露糖醇/亚硝酸盐溶液中包含甘油降低了产出。然而,令人惊奇的是,与甘露糖醇的情况不同,与不存在甘油时的NO产量相比,在山梨糖醇/亚硝酸盐溶液中包含甘油提高了NO产出。

[0597] 当使用甘油时,首先用制备的1M甘油溶液制备1M山梨糖醇或1M甘露糖醇溶液,接着制备1M亚硝酸盐溶液。

[0598] 图16示出了在亚硝酸钠(1M)溶液中存在甘露糖醇(0.5M)和不存在甘露糖醇的情况下,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)。该图显示,在约2000秒的反应时间后,包含多元醇产生了更大的NO产出。

[0599] 图16显示,在生理学上重要的pH水平大于约5,特别是大于约5.5时,与不含甘露糖醇的相同体系相比,甘露糖醇增强了一氧化氮的生成,在10000秒(167分钟)后提供了1400nmol NO/mg亚硝酸盐的累积水平。

[0600] 实施例3

[0601] 各种有机酸以及含或不含多元醇的亚硝酸盐溶液对脓肿分枝杆菌培养物的活性

[0602] 材料

[0603] 将4.7g Middlebrook 7H9肉汤基(西格玛奥德里奇)用900mL蒸馏水重构,并在121℃高压灭菌15分钟。将Middlebrook ADC生长添加剂(西格玛奥德里奇)加入高压灭菌的7H9溶液中(每450mL溶液中加入50mL,共加入100mL)。

[0604] 1M亚硝酸钠(Emsure):在洁净的螺口玻璃瓶中,将6.9g亚硝酸钠粉末溶解在100mL蒸馏水中。将混合物在121℃高压灭菌15分钟。

[0605] 1M柠檬酸(西格玛奥德里奇):在洁净的螺口玻璃瓶中,将19.2g柠檬酸粉末溶解在100mL蒸馏水中。将混合物在121℃高压灭菌15分钟。

[0606] 1M抗坏血酸(西格玛奥德里奇):将17.6g抗坏血酸粉末加入无菌玻璃瓶中。使其完全溶解在100mL灭菌蒸馏水中。由于其半衰期短,因此使用严格的无菌技术每天制备。由于其固有的不稳定性,不进行高压灭菌,但在使用前通过0.2μm的过滤器过滤。

[0607] 1M柠檬酸三钠二水合物(西格玛奥德里奇):在干净的螺口玻璃瓶中,将29.4g柠檬酸钠粉末溶解在100mL蒸馏水中。将混合物在121℃高压灭菌15分钟。

[0608] 1M L-抗坏血酸钠盐(Acros Organics):在干净的螺口玻璃瓶中,将19.8g抗坏血酸钠粉末溶解在100mL蒸馏水中。将混合物在121℃高压灭菌15分钟。

[0609] 对于含多元醇的实验,使用D-甘露糖醇(西格玛奥德里奇)。将多元醇加入到上述亚硝酸钠储备液中以形成以下储备液:

[0610] 储备液A—1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇

[0611] 储备液B—1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇

[0612] 还制备了1.5M柠檬酸的储备液。

[0613] 根据稀释倍数调整每种组分的摩尔浓度以确保每种实验溶液的最终摩尔浓度正确。

[0614] 脓肿分枝杆菌 (MAB)

[0615] 在本实施例中,所有实验条件均使用实验室参照菌株脓肿分枝杆菌ATCC 19977lux。

[0616] 方法

[0617] 将50mL falcon管标记为管T(试验悬浮液)、管A(酸对照)和管C(对照)。

[0618] 向每个管中加入8mL 7H9+ADC添加剂。然后加入100 μ L MAB悬浮液(先前生长至约3-4McFarland标准)。读取MAB悬浮液的基线相对光单位(RLU)读数。通过涡旋混合内容物。

[0619] 不存在多元醇(甘露糖醇)时的管内容物

[0620] 管T:向管中加入1mL亚硝酸钠(1M)溶液,然后立即加入1mL柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M),得到最终浓度为0.1M的10mL溶液。通过轻轻颠倒混合内容物,并在37°C下温育24小时。

[0621] 管A:向管中加入1mL柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M),并加入1mL无菌蒸馏水以产生10毫升的最终体积来测试0.1M浓度的酸。通过轻轻颠倒混合内容物,并在37°C下温育24小时。

[0622] 管C:向管中加入2mL无菌蒸馏水,使总体积为10mL。这是评估最佳条件下生长的对照。通过轻轻颠倒混合内容物,并在37°C下温育24小时。

[0623] 存在多元醇(甘露糖醇)时的管T内容物

[0624] 当存在甘露糖醇时,管T内容物如下:

[0625] 1.管T:1mL亚硝酸钠(1M)和甘露糖醇(0.5M)以及1mL柠檬酸(1M)

[0626] 2.管T:1mL亚硝酸钠(1.5M)和甘露糖醇(0.5M)以及1mL柠檬酸(1M)

[0627] 3.管T:1mL亚硝酸钠(1M)和甘露糖醇(0.5M)以及1mL柠檬酸(1.5M)

[0628] 在温育30分钟、60分钟和24小时时测量RLU以评估T、A和C溶液的活性。

[0629] 温育24小时后,将管C、管A和管T内容物铺板于哥伦比亚血琼脂培养基(VWR Chemicals)上。将平板在37°C温育72小时。在温育第3天、第5天和第7天读取菌落形成单位(CFU)。所有工作都在CL2实验室设施中的CL2生物安全柜中进行。

[0630] 结果示于图18至图21中。

[0631] 图18显示,0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液(管T)在pH为5和5.5的条件下温育7天后有效消除了脓肿分枝杆菌培养物,并且与0.1M纯柠檬酸溶液(管A)相比,在pH值为6.0、6.5、7.0和7.4的条件下减少了脓肿分枝杆菌培养物。图18还显示,0.1M抗坏血酸和0.1M亚硝酸盐的溶液(管T)在pH值为5.0、5.5和6.0的条件下温育7天后有效消除了脓肿分枝杆菌培养物,并且纯抗坏血酸的溶液(管A)相比,在pH值为6.5、7.0和7.4的条件下减少了脓肿分枝杆菌培养物。

[0632] 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有效减少了脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并且含0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育三天后几乎完全消除了脓肿分枝杆菌培养物。图19b)显示,不含甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育五天后仍能有效保持脓肿分枝杆菌CFU的减少。该图还显示,含

0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育五天后有效减少了脓肿分枝杆菌培养物的CFU。

[0633] 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有效减少了脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并且含0.05M甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育三天后有效消除了脓肿分枝杆菌培养物。图20b) 显示,不含甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育五天后仍能有效保持脓肿分枝杆菌CFU的减少。该图还显示,含0.05M甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液在温育五天后有效消除了脓肿分枝杆菌培养物。

[0634] 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有效降低了脓肿分枝杆菌培养物的CFU,并在温育5天后保持脓肿分枝杆菌培养物CFU的减少。该图还显示,含0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.15M亚硝酸盐的溶液在温育三天和五天后有效消除了脓肿分枝杆菌培养物。

[0635] 实施例4

[0636] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液在一系列临床分离培养物中对脓肿分枝杆菌 (Mabs) 和结核分枝杆菌 (Mtb) 的最低抑菌浓度 (MIC)

[0637] 健康志愿者

[0638] 外周血样品取自提供了书面知情同意书 (伦理批准参考REC编号12/WA/0148) 的健康志愿者。

[0639] 分枝杆菌菌株

[0640] 脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977) 和结核分枝杆菌 (H37RV) 菌株都含有细菌荧光素酶 (lux) 基因盒 (luxCDABE), 其能够测量相对光单位 (RLU), 以及细菌存活的常规菌落形成单位 (CFU)。

[0641] 通用试剂

[0642]		货号	供应商
	24孔细胞培养板	3526	Costar, 康宁, 美国
	CD14微珠, 人	130-150-201	美天旎生物技术, 英国
	柠檬酸	791725	西格玛, 英国
	哥伦比亚血琼脂平板	100253ZF	vWR, 英国
	癸醛	D7384	西格玛, 英国
	杜氏改良Eagle培养基-高糖	D6429	西格玛, 英国
	FLUOstar Omega		BMG Labtech, 英国
	胎牛血清	P30-3702	Pan-Biotech
	GloMax-96光度计		Promega, 英国
	甘露糖醇	M4125	西格玛, 英国
	Middlebrook 7H11琼脂平板	PP4080	E&O Labs, 英国
	Middlebrook 7H9肉汤	M0178	西格玛, 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	西格玛, 英国

重组人GM-CSF	300-03	PeproTech EC, 英国
重组人IFN γ	300-02	PeproTech EC, 英国
亚硝酸钠	1.06549.0500	默克, 德国

[0643] 处理条件

[0644] 处理1: 柠檬酸0.15M、亚硝酸钠0.1M和甘露糖醇0.05M

[0645] 处理2: 柠檬酸0.1M、亚硝酸钠0.15M和甘露糖醇0.05M

[0646] 肉汤最低抑菌浓度 (MIC)

[0647] 根据临床和实验室标准协会制定的抗微生物药敏感性测试指南 (M07-A9), 测定各处理对脓肿分枝杆菌和结核分枝杆菌的MIC。在各平板上对各处理进行加倍稀释, 并将平板在37℃温育, 在第3天和第7天读取Mabs, 在第14天和第21天读取Mtb。测试重复进行两次。

[0648] 所有工作都在CL2实验室设施中的CL2生物安全柜中进行。

[0649] 研究发现1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度为4.7mM。研究还发现1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度为2.3mM。

[0650] 研究发现1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度为3.1mM。研究还发现1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度为1.6mM。

[0651] 还通过肉汤微量稀释法确定了来自英国剑桥大学Floto实验室 (<https://www.flotolab.com/>) 脓肿分枝杆菌临床分离菌株库的分离菌株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的最低抑菌浓度。每个单独的分离菌株评估两次。

[0652] 对临床分离菌株的试验的结果示于图22a) 和图22b)。这些图显示了两次评估的一氧化氮对脓肿分枝杆菌的MIC, 其中读数在分离物温育三、四和五天后读取。在温育的第7天也进行了读板, 但与第5天相比并无差异。在两次实验中, 实验室菌株ATCC 19977lux都用作对照, 并显示与临床分离菌株的比较结果。

[0653] 图22显示, 柠檬酸-亚硝酸盐-甘露糖醇溶液对大部分临床分离菌株有作用。对于0.1M柠檬酸、0.15M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇溶液, 大多数临床分离菌株的最低抑菌浓度在0.02M内 (图22a), 而对于0.15M柠檬酸、0.1M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇溶液, 大多数临床分离株的最低抑菌浓度在0.04M内 (图22b)。

[0654] 在这两张图中, 某些样品的MIC在不同天数不同。这些样品是在分离样品的识别码上方显示具有多于一个点的样品。一般而言, 在这种情况下, 在温育的较晚几天观察到的是较高的MIC, 而非较低的MIC。总之, 较低柠檬酸 (0.1M) 和较高亚硝酸钠 (0.15M) 的组合 (图22 (a)) 与较高柠檬酸 (0.15M) 和较低亚硝酸钠 (0.1M) 的组合 (图22 (b)) 相比更有效。

[0655] 图29示出了显示羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液体外杀伤脓肿分枝杆菌的其他数据。在该图中, 在类似条件下24小时内, 亚硝酸钠、用氢氧化钠溶液缓冲至pH 5.8的柠檬酸和甘

露糖醇的水性制剂与阿米卡星和阴性对照相比的脓肿分枝杆菌杀伤效力得到证实。

- [0656] 实施例5
- [0657] 含和不含多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液对抗铜绿假单胞菌的抗微生物活性
- [0658] 设备和培养基
- [0659] UKAS校准的移液器 (100 μ L-1000 μ L范围) — Proline® Plus
- [0660] UKAS校准的多通道移液器 (P300和P20) — Gilson®, 英国
- [0661] 通用试管—SLS, 英国
- [0662] 校准天平—HR-100A
- [0663] 微生物培养箱—Heratherm™, 赛默飞世尔科技, 英国
- [0664] 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) — 南方集团实验室, 英国
- [0665] 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) — Acumedia®, SLS, 英国
- [0666] 麦芽琼脂—Acumedia®, SLS, 英国
- [0667] 脑心浸液肉汤 (BHIB) — Acumedia®, SLS, 英国
- [0668] 沙氏葡萄糖肉汤 (SDB) — Acumedia®, SLS, 英国
- [0669] Dey-Engley中和剂 (DE-N) — Acumedia®, SLS, 英国
- [0670] 柠檬酸—西格玛, 英国
- [0671] 亚硝酸钠—西格玛, 英国 甘露糖醇—西格玛, 英国
- [0672] 山梨糖醇—西格玛, 英国
- [0673] 试验微生物
- [0674] 铜绿假单胞菌NCTC 13618—从囊性纤维化患者中分离

[0675]	制剂			
	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	含甘露糖醇的亚硝酸钠
	制剂4	液体	柠檬酸 pH 6.0	含甘露糖醇的亚硝酸钠
	制剂5	液体	柠檬酸 pH 5.2	含山梨糖醇的亚硝酸钠
	制剂6	液体	柠檬酸 pH 6.0	含山梨糖醇的亚硝酸钠
	阳性对照	液体	N/A	N/A
	阴性对照	液体	N/A	N/A

- [0677] 浓度1—1M柠檬酸加1M亚硝酸钠 (含或不含0.5M多元醇)
- [0678] 浓度2—0.5M柠檬酸加1M亚硝酸钠 (含或不含0.5M多元醇)
- [0679] 浓度3—0.5M柠檬酸加0.5M亚硝酸钠 (含或不含0.5M多元醇)
- [0680] Dey-Engley中和剂的验证

[0681] 从胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 收获二十四小时铜绿假单胞菌培养物, 并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ 悬浮液。将其进一步在脑心浸液肉汤 (BHIB) 中稀释以制备 $1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ 工作悬浮液。

[0682] 通过连续稀释和铺板来确认起始接种物。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) 和中和剂效力 (8mL 中和剂、1mL 试验药剂和 1mL 接种物) 样品进行中和剂验证。处理5分钟后, 从每个试管中取出 200 μ L 悬浮液连续稀释, 并将 100 μ L 铺板于 TSA 上。将琼脂平板在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 温育 18-24 小时。

[0683] 对浮游生物的抗微生物效力

[0684] 从TSA收获二十四小时铜绿假单胞菌培养物,并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹悬浮液。将其进一步在BHIB中稀释以制备 $1 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹工作悬浮液。通用试管中装入8mL细菌溶液。

[0685] 向各试验药剂中加入1mL柠檬酸溶液和1mL亚硝酸钠溶液,以得到如上所述的所需浓度。将溶液在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 温育24小时。温育期之后,从每个试管中取出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定量活生物体。

[0686] 结果示于图23中。

[0687] 数据显示以下制剂对假单胞菌的抗微生物效力:

[0688] -与含或不含多元醇(0.5M)的亚硝酸盐(1M)混合的柠檬酸(1M) (“浓度1”);

[0689] -与含或不含多元醇(0.5M)的亚硝酸盐(1M)混合的柠檬酸(0.5M) (“浓度2”);和

[0690] -与含或不含多元醇(0.5M)的亚硝酸盐(0.5M)混合的柠檬酸(1M) (“浓度3”)。

[0691] 柠檬酸溶液的pH为5.2(制剂1、3和5)和6.0(制剂2、4和6)。制剂1和2不含多元醇;制剂3和4包含甘露糖醇;而制剂5和6含有山梨糖醇。

[0692] 所有制剂在pH 5.2时都显示出良好的效力。在pH 6时,包含甘露糖醇的制剂库稍微有效一些。

[0693] 实施例6

[0694] 评估了包含亚硝酸盐、有机酸和多元醇的制剂对THP-1细胞中结核分枝杆菌HN878的效力。

[0695] 制剂

[0696] 如下表中所示制备制剂。当制备方法表述为“浓缩”,在样品参照中用后缀FC表示时,这意味着制剂最初被制成含有所有三种成分,即亚硝酸钠(0.75M)、多元醇(0.25M)和酸(0.5M)的浓缩预混合物,然后用蒸馏水稀释以达到如表中所述的每种成分的所需浓度。当制备方法表述为“稀释”,在样品参照中用后缀FD表示时,这意味着制剂最初被制成含有最初所需浓度的所有三种成分的预混合物,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如表中所述的每种成分的所需浓度。

[0697] 在每种制剂中,通过系列稀释制备一系列浓度的亚硝酸钠,即16 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$,用于针对结核分枝杆菌HN878的体外细菌抑制测定。

[0698]

	样品参照	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	30RESP001FC	浓缩	亚硝酸钠0.15M	甘露糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
	30RESP001FD	稀释	亚硝酸钠0.15M	甘露糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
制剂2	30RESP002FC	浓缩	亚硝酸钠0.15M	乳糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
	30RESP002FD	稀释	亚硝酸钠0.15M	乳糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
制剂3	30RESP003FC	浓缩	亚硝酸钠0.1M	甘露糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
	30RESP003FD	稀释	亚硝酸钠0.1M	甘露糖醇0.05M	柠檬酸/柠檬酸盐0.1M
制剂4	30RESP004FC	浓缩	亚硝酸钠0.1M	甘露糖醇0.05M	抗坏血酸/抗坏血酸盐0.1M
	30RESP004FD	稀释	亚硝酸钠0.1M	甘露糖醇0.05M	抗坏血酸/抗坏血酸盐0.1M

[0699] MIC巨噬细胞测试使用THP-1巨噬细胞(1)化合物筛选测定进行。

[0700] 巨噬细胞的制备和培养:将THP-1细胞扩增2周。然后,将THP-1细胞以 5×10^5 个细

胞/mL的浓度悬浮在巨噬细胞的DMEM完全培养基中。将细胞以2mL/孔(1×10^6 个细胞/孔)接种到24孔组织培养板中。可以在24孔细胞板上对7个药物浓度加未处理对照进行三次试验。除了药物测定板,还额外接种一个板(或至少3个另外的孔)用于测定感染当天的细菌摄取。将细胞于37℃、5%CO₂在加湿培养室中温育。在3天的测定过程中,无抗生素/抗真菌药DMEM完全培养基不变。

[0701] 巨噬细胞的DMEM完全培养基:

[0702] 杜氏改良Eagle培养基(Cellgro 15-017-cv),其中补加了:

[0703] 热灭活胎牛血清(Atlas Biologicals,科罗拉多州科林斯堡,F-0500-A)(10%)

[0704] L929条件培养基(10%)

[0705] L-谷氨酰胺(西格玛G-7513)(2mM)

[0706] HEPES缓冲液(西格玛H-0887)(10mM) 抗生素/抗真菌药(西格玛A-9909)(1×)

[0707] MEM非必需氨基酸(西格玛M-7145)(1×)

[0708] 2-巯基乙醇(西格玛M-6250)(50nM)

[0709] L-929条件培养基:

[0710] 将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。使细胞生长3天,得到THP-1细胞。在第3天,收集上清液,并通过0.45μm过滤器过滤,等分试样,并在-20℃冷冻。将无细胞滤液用于DMEM培养基中进行THP-1感染。

[0711] THP-1细胞的感染:

[0712] 在第0天,从细胞中移除培养基,并用0.2mL含结核分枝杆菌HN878的无抗生素/抗真菌药DMEM替换,其MOI为1个巨噬细胞与10个细菌之比。将组织培养板置于封闭的拉链袋(Ziploc baggies)中,以便运回培养箱中。放入培养箱后,立即拉开袋子。将细胞与细菌共同温育2小时。感染后,移除附着在细胞外部的细菌,将每个孔用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤一次,并加入2mL具有不同药物浓度的无抗生素/抗真菌药DMEM完全培养基。为了制备药物浓度,通过将10mL的前一悬浮液加入到下一试管中的10mL的完全培养基加血清中,进行2倍连续稀释。将组织培养板放回37℃+5%CO₂的培养箱中(药物在孔中保留3天)。在三个复孔中测试每种药物浓度。

[0713] 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细胞的细胞活力评价。从所有孔中移除组织培养基,并将细胞用1mL PBS洗涤两次。接着向每个孔中加入1mL无菌双蒸水+0.05%Tween-80;将细胞在室温下放置5-10分钟。细胞裂解物在24孔组织培养板中以1:10的比例在无菌盐水中连续稀释。将稀释的细胞裂解物通过1/1,000稀释级铺板在7H11/OADC琼脂上。(每个24孔TC细胞板需要四块用于制备系列稀释液的24孔TC板和24块琼脂“四边形”板)。将板在32℃温育30天,并对菌落进行计数以测定CFU/mL。

[0714] 结果:

[0715] 体外THP-1HN878光密度结果

[0716] 最低抑菌浓度(MIC),报告为抑制细菌的最稀组合物(即,特定制剂在表示为16μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL、0.25μg/mL、0.125μg/mL的标度上的最大稀释水平)

[0717]

化合物	MIC ($\mu\text{g/mL}$) 第0天	MIC ($\mu\text{g/mL}$) 第1天	MIC ($\mu\text{g/mL}$) 第2天	MIC ($\mu\text{g/mL}$) 第5天
制剂1 (30RESP001FC) 浓缩	16	16	16	16
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

[0718] 结果示于图24至图27中。

[0719] 图24: 在THP-1细胞中评估30RESP001FC和FD (浓缩和稀释) 对结核分枝杆菌HN878的效力。在感染后2小时 (第0天)、1天、2天和5天, 用 $16\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)、 $8\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)、 $4\mu\text{g/mL}$ ($\diamond$)、 $2\mu\text{g/mL}$ ($\circ$)、 $1\mu\text{g/mL}$ ($\square$)、 $0.5\mu\text{g/mL}$ ($\blacklozenge$)、 $0.25\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$) 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$) 处理后, 评估了制剂30RESP001FC (浓缩) (A) 和30RESP001FD (稀释) (B) 对THP-1巨噬细胞中结核分枝杆菌HN878 ($\square$) 的细胞内杀伤作用的效力。在图24的各曲线图中, 分别用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线可与分别用 $0.25\mu\text{g/mL}$ 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线区分, 原因是用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 进行的处理更有效。换句话说, 用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的曲线显示出比用 $0.25\mu\text{g/mL}$ 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ 进行的处理显著更低的CFU值, 特别是在第5天。类似地, 用 $1\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\square$ 曲线可易于与未进行处理的 $\square$ 曲线区分, 原因是 $1\mu\text{g/mL}$ 时的处理更有效。未进行处理的 $\square$ 曲线的CFU值在第1天后升高并保持在 1×10^4 以上。

[0720] 在上述MIC表和图24中提到的描述为“ $16\mu\text{g/mL}$ ”的30RESP001FC和FD组合物包括 0.15M 亚硝酸钠、 0.05M 甘露糖醇和 0.1M 柠檬酸/柠檬酸盐 (稀释后的最终摩尔浓度), 并且 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\mu\text{g/mL}$ 、 $0.25\mu\text{g/mL}$ 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ 组合物各自分别为按 $16\mu\text{g/mL}$ 至 $0.125\mu\text{g/mL}$ 的顺序将前一组合物稀释50% (即浓度减半) 得到的组合物。

[0721] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI用结核分枝杆菌感染, 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) 测定细胞内细菌的数量。所示的值是来自一次独立实验的平均值 $\pm$ SD。特别地, 用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 的30RESP001FC和FD (浓缩和稀释) 进行的处理, 其对结核分枝杆菌HN878的效力相对于未进行处理的对照增加 (*, $P < 0.05$)。

[0722] 图25: 在THP-1细胞中评估30RESP002FC和FD (浓缩和稀释) 对结核分枝杆菌HN878的效力。在感染后2小时、1天、2和5天, 用 $16\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)、 $8\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)、 $4\mu\text{g/mL}$ ($\diamond$)、 $2\mu\text{g/mL}$ ($\circ$)、 $1\mu\text{g/mL}$ ($\square$)、 $0.5\mu\text{g/mL}$ ($\blacklozenge$)、 $0.25\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$) 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$) 处理后, 评估了制剂30RESP002FC (浓缩) (A) 和30RESP002FD (稀释) (B) 对THP-1巨噬细胞中结核分枝杆菌HN878 ($\square$) 的细胞内杀伤作用的效力。在图25的各曲线图中, 分别用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线可与分别用 $0.25\mu\text{g/mL}$ 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线区分, 原因是

用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理更有效。换句话说,用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,用1 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\square$ 曲线可易于与未进行处理的 $\square$ 曲线区分,原因是1 $\mu\text{g/mL}$ 时的处理更有效。未进行处理的 $\square$ 曲线的CFU值在第1天后升高并保持在 1×10^4 以上。

[0723] 在上述MIC表和图25中提到的描述为“16 $\mu\text{g/mL}$ ”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),并且8 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 组合物各自分别为按16 $\mu\text{g/mL}$ 至0.125 $\mu\text{g/mL}$ 的顺序将前一组合物稀释50%(即浓度减半)得到的组合物。

[0724] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI用结核分枝杆菌感染,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)测定细胞内细菌的数量。所示的值是来自一次独立实验的平均值 $\pm$ SD。用16 $\mu\text{g/mL}$ 的30RESP002FC(浓缩)以及16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 的30RESP002FD(稀释)进行的处理,其对结核分枝杆菌HN878的效力相对于未进行处理的对照增加(*, $p < 0.05$)。

[0725] 图26:在THP-1细胞中评估30RESP003FC和FD(浓缩和稀释)对结核分枝杆菌HN878的效力。在感染后2小时(第0天)、1天、2天和5天,用16 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)、8 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)、4 $\mu\text{g/mL}$ ($\diamond$)、2 $\mu\text{g/mL}$ ($\circ$)、1 $\mu\text{g/mL}$ ($\square$)、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacklozenge$)、0.25 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)和0.125 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)处理后,评估了30RESP003FC(浓缩)(A)和30RESP003FD(稀释)(B)对THP-1巨噬细胞中结核分枝杆菌HN878($\square$)的细胞内杀伤作用的效力。在图26的各曲线图中,分别用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线可与分别用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线区分,原因是用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理更有效。换句话说,用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。类似地,用1 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\square$ 曲线可易于与未进行处理的 $\square$ 曲线区分,原因是1 $\mu\text{g/mL}$ 时的处理更有效。未进行处理的 $\square$ 曲线的CFU值在第1天后升高并保持在 1×10^4 以上。

[0726] 在上述MIC表和图26中提到的描述为“16 $\mu\text{g/mL}$ ”的30RESP003FC和FD组合物包括0.1M亚硝酸钠、0.05M甘露糖醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),并且8 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 组合物各自分别为按16 $\mu\text{g/mL}$ 至0.125 $\mu\text{g/mL}$ 的顺序将前一组合物稀释50%(即浓度减半)得到的组合物。

[0727] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI用结核分枝杆菌感染,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)测定细胞内细菌的数量。所示的值是来自一次独立实验的平均值 $\pm$ SD。用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 的30RESP003FC(浓缩)以及16 $\mu\text{g/mL}$ 的30RESP003FD进行的处理,其对结核分枝杆菌HN878的效力相对于未进行处理的对照增加(*, $p < 0.05$)。

[0728] 图27:在THP-1细胞中评估30RESP004FC和FD(浓缩和稀释)对结核分枝杆菌HN878的效力。在感染后2小时(第0天)、1天、2天和5天,用16 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)、8 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)、4 $\mu\text{g/mL}$ ($\diamond$)、2 $\mu\text{g/mL}$ ($\circ$)、1 $\mu\text{g/mL}$ ($\square$)、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacklozenge$)、0.25 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangle$)和0.125 $\mu\text{g/mL}$ ($\blacktriangledown$)处理后,评估了制剂30RESP004FC(浓缩)(A)和30RESP004FD(稀释)(B)对THP-1巨噬细胞中结核分枝杆菌HN878($\square$)的细胞内杀伤作用的效力。在图27的各曲线图中,分别用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线可与分别用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的 $\blacktriangle$ 和 $\blacktriangledown$ 曲线区分,原因是用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理更有效。换句话说,用16 $\mu\text{g/mL}$ 和8 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的曲线显示出比用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和0.125 $\mu\text{g/mL}$ 进行的处理显著更低的CFU值,特别是在第5天。

类似地,用 $1\mu\text{g/mL}$ 进行的处理的□曲线可易于与未进行处理的□曲线区分,原因是 $1\mu\text{g/mL}$ 时的处理更有效。未进行处理的□曲线的CFU值在第1天后升高并保持在 1×10^4 以上。

[0729] 在上述MIC表和图27中提到的描述为“ $16\mu\text{g/mL}$ ”的30RESP004FC和FD组合物包括 0.1M 亚硝酸钠、 0.05M 甘露糖醇和 0.1M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(稀释后的最终摩尔浓度),并且 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\mu\text{g/mL}$ 、 $0.25\mu\text{g/mL}$ 和 $0.125\mu\text{g/mL}$ 组合物各自分别为按 $16\mu\text{g/mL}$ 至 $0.125\mu\text{g/mL}$ 的顺序将前一组合物稀释50% (即浓度减半) 得到的组合物。

[0730] THP-1巨噬细胞以1:10的MOI用结核分枝杆菌感染,在感染后1天、2天和5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)测定细胞内细菌的数量。所示的值是来自一次独立实验的平均值 $\pm$ SD。用 $16\mu\text{g/mL}$ 和 $8\mu\text{g/mL}$ 的30RESP004FC(浓缩)进行的处理,其对结核分枝杆菌HN878的效力相对于未进行处理的对照增加(*, $p<0.05$)。

[0731] 结果表明,制剂在MIC以上的适当剂量下显示出对结核分枝杆菌HN878的体外抑制作用。

[0732] 还应当注意,制备制剂的方式对实施例6的试验中它们在体外对结核分枝杆菌HN878的抗菌效力有影响。

[0733] 这种影响通过比较 $8\mu\text{g/mL}$ 浓度的制剂1在其FC和FD形式之间的效力来说明(图24A相对于图24B)。FC形式的效力在温育后至少5天大大增加,而FD形式的效力在相同的时间内增加得不那么明显。这与 $16\mu\text{g/mL}$ 浓度相反,该浓度在相同的时间内显示出与FC和FD形式非常相似和良好的效力。

[0734] 用制剂2观察到不同的行为(图25A相对于图25B)。 $16\mu\text{g/mL}$ 浓度的FD形式的效力在温育后的前2天比FC形式增加得更明显,然后不变,尽管在温育后的5天,FD形式的效力良好,FC的效力则非常好。在 $8\mu\text{g/mL}$ 浓度的情况下,FD形式的效力在温育后至少5天大大增加,达到良好效力,而FC形式的效力在相同的时间内增加得不那么明显。

[0735] 因此结果表明,至少在较高浓度下,加入水以达到最终抑制性制剂的阶段在初始抗菌作用和超过5天的细菌杀伤程度方面均可以显著影响制剂的抗菌作用。一般而言,但非普遍情况,最初将制剂制成预混合物,其中亚硝酸钠、多元醇和酸成分以它们所需的相对摩尔比例混合,但它们的浓度比使用所需的浓度高(例如,是使用所需的浓度的至少3倍,例如至少5倍;例如是使用所需的浓度的约3倍至约80倍),然后仅稀释浓缩物以获得使用的制剂,从而在温育后0至5天的时间内产生更好的抗菌作用。

[0736] 实施例7

[0737] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对甲型H1N1流感病毒的细胞毒性和抗病毒活性

[0738] 将分别对应于实施例6中的制剂30RESP001FC、其10倍稀释液和其100倍稀释液指定为F1C1、F1C2和F1C3的试验制剂与奥司他韦溶液($1\mu\text{M}$)和病毒对照一起使用,以获得在MDCK细胞中24小时后比较的细胞毒性和甲型H1N1流感病毒杀伤作用。细胞毒性的测定通过类似于实施例8的LDH细胞毒性测定进行。在一系列稀释度下(横轴为亚硝酸盐摩尔浓度),在 $\text{MOI}=0.002(\bullet)$ 和 $\text{MOI}=0.02(\blacksquare)$ 时测量对MDCK细胞中甲型H1N1流感病毒的抗微生物活性,其中细胞毒性以灰色表示,细胞毒性标度在右侧(在测量的亚硝酸盐浓度达到并包括 0.015M 时,细胞毒性 $\leq$ LDH对照的1%)。在 $\text{MOI}=0.002$ 并且亚硝酸盐浓度为 0.15M 、 0.015M 和 0.0015M 时与奥司他韦($1\mu\text{M}$)比较获得平板照片。结果示于图28中。倒数第二句中所述的平板的顺序与图中平板从左到右的顺序相同(有两次实验,并且各次实验中相应的平板上下

对应显示)。最右侧紧靠奥司他韦对板的右侧的一对平板是病毒对照。细胞毒性显示在每对试验平板下面,为LDH对照的百分比(%) (在感染后24小时3次LDH测定的平均值)。

[0739] 结果表明,在亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂的合适剂量下,病毒完全被根除,并且效力明显优于奥司他韦。亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂对鼻病毒和呼吸道合胞病毒(RSV)的抗病毒活性相似。

[0740] 这些结果表明,通过本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂提供了人和动物受试者中呼吸道病毒感染的治疗和预防治疗。

[0741] 实施例8

[0742] 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

[0743] 材料

[0744] 试验制剂F1 (pH5.8)

[0745] 通过下述方法,由1.5M亚硝酸钠、0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(pH 5.8)和0.5M甘露糖醇溶液的储备液制备六种试验浓度的制剂1(F1)(亚硝酸钠、柠檬酸(pH 5.8)和甘露糖醇(多元醇)的水溶液),得到下列试验组合物:

[0746] 制剂1(F1)

试验药剂	试验制剂中亚硝酸钠的浓度(M)	试验制剂中柠檬酸(pH 5.8)的浓度(M)	试验制剂中多元醇的浓度(M)
[0747] F1试验浓度1(F1C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇
F1试验浓度2(F1C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇
F1试验浓度3(F1C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 甘露糖醇
F1试验浓度4(F1C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 甘露糖醇
F1试验浓度5(F1C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 甘露糖醇
F1试验浓度6(F1C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇

[0748] 与F1一起使用的对照

[0749] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH 5.8的对照制剂。

[0750] 阴性对照是测定缓冲液+细胞。

[0751] 阳性对照是氯喹+细胞。

[0752] 试验制剂F2 (pH5.4)

[0753] 通过下述方法,由1.5M亚硝酸钠、0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(pH 5.4)和0.5M甘露糖醇溶液的储备液制备六种试验浓度的制剂2(F2)(亚硝酸钠、柠檬酸(pH 5.4)和甘露糖醇(多元醇)的水溶液),得到下列试验组合物:

[0754] 制剂2(F2)

试验药剂	试验制剂中亚硝酸钠的浓度(M)	试验制剂中柠檬酸(pH 5.4)的浓度(M)	试验制剂中多元醇的浓度(M)
[0755] F2试验浓度1(F2C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇
F2试验浓度2(F2C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇
F2试验浓度3(F2C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 甘露糖醇
F2试验浓度4(F2C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 甘露糖醇
F2试验浓度5(F2C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 甘露糖醇
F2试验浓度6(F2C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ 甘露糖醇

[0756] 与F2一起使用的对照

[0757] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH 5.4的对照制剂。

[0758] 阴性对照是测定缓冲液+细胞。

[0759] 阳性对照是氯喹+细胞。

[0760] 化学试剂

[0761] 亚硝酸钠:

[0762] 等级:亚硝酸钠超纯级Ph Eur、USP。亚硝酸钠CAS号7632-00-0,EC号231-555-9,超纯级Ph Eur、USP,来自西格玛奥德里奇,产品代码1.065441000。

[0763] 柠檬酸:

[0764] 等级:柠檬酸无水粉末,EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur、BP、JP、USP、E 330、FCC,来自西格玛奥德里奇,产品代码1.002425000。

[0765] D-甘露糖醇:

[0766] 等级:符合EP、FCC、USP测试规范的D-甘露糖醇,来自西格玛奥德里奇,产品代码M8429-100G。

[0767] 磷酸氯喹:

[0768] 等级:药物二级标准,来自西格玛奥德里奇,产品代码PHR1258-1G。

[0769] 储备液的制备

[0770] 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,再用蒸馏水稀释以调节pH(加入160mL调节至pH 5.4或加入190mL调节至pH 5.8)。在另一种方法中,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,之后用10M氢氧化钠和蒸馏水100mL调节pH。使用0.22 μ m过滤器通过注射器过滤将溶液灭菌。

[0771] 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。

[0772] 在指定条件下,加入9.1g甘露糖醇以得到浓度为0.5M的使用0.22 μ m过滤器通过注射器过滤的灭菌溶液。

[0773] 制剂的制备

[0774] 在与亚硝酸盐和甘露糖醇溶液混合之前,将柠檬酸缓冲溶液的pH控制在所需值。所述的制剂的pH是在与亚硝酸盐和甘露糖醇溶液混合之前配制的柠檬酸缓冲溶液的pH。

[0775] 一种合适的配制制剂的方法如下:将含有0.5M甘露糖醇的亚硝酸钠(1.5M)加入混合容器中,随后立即加入pH受控的柠檬酸溶液1:1(亚硝酸盐+多元醇:柠檬酸)混合。通过轻轻颠倒混合溶液。混合后,立即将混合物在环境温度下在密封容器(例如50mL falcon管)中放置5分钟。然后将所得的含有0.75M亚硝酸盐、0.25M甘露糖醇和柠檬酸的溶液在测定缓冲液(1.2倍浓缩)中稀释5倍,得到亚硝酸盐0.15M、甘露糖醇0.05M和例如柠檬酸0.1M的最终测试浓度。1:1混合物(例如:起始为亚硝酸盐0.75M、甘露糖醇0.25M、柠檬酸0.5M的混合物)的系列稀释液用蒸馏水和/或测定缓冲介质制备。所有制剂浓度可在环境温度下储存。每次试验的溶液都现配。

[0776] 附加对照

[0777] 使用已知适合于其目的一系列浓度的S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺(SNAP)作为附加对照,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供体对照以提供NO在体外无细胞毒性的验证。为了控制对SNAP分子的N-乙酰基戊苯乙醇胺(NAP)部分测定的任何潜在影响,使用相应浓度的NAP作为NO空白

对照,并表示为NAP50、NAP100、NAP200、NAP300和NAP400。

[0778] 病毒

[0779] SARS-CoV-2临床分离菌株

[0780] 细胞系

[0781] Vero E6

[0782] 测定

[0783] LDH测定(细胞毒性):

[0784] CyQUANT™ LDH细胞毒性测定试剂盒,Invitrogen;货号C20300和C20301。测定(病毒滴定)半数组织培养感染量(TCID₅₀),以细胞病变效应(CPE)评分为读数。

[0785] 亚硝酸盐/对照加入Vero E6细胞后2小时和24小时,测试亚硝酸盐制剂(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, 第323卷, 第264-268页(2004年),其公开内容通过引用方式并入本文)。在2小时和24小时的时间点测量LDH的释放,作为读数。每次实验测试各种化合物/制剂三次。

[0786] SARS-CoV-2抑制:

[0787] 在0小时时,在存在制剂或对照的情况下将Vero E6细胞用病毒感染并温育1小时。在该温育期后,移除接种物并将细胞洗涤。然后将新鲜制剂或对照加入洗涤的细胞中。在感染后24小时,收获Vero E6细胞上清液并进行滴定,将病毒滴定液温育6天,然后进行读数以确定病毒产量是否降低。在包括3.0和0.3的四个MOI下进行单独的测试,尽管只有这2个MOI被滴定。通过结晶紫(细胞单层)染色,之后进行CPE评分来获得读数。

[0788] 结果

[0789] 结果示于图32至图34中。

[0790] 图32示出了LDH细胞毒性测定的结果(分别使用试验制剂1和2的试验1和2的组合图)。数据表示为两次实验的平均值±标准偏差(SD)。SD显示为灰色误差条。将最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设定为100%,并且所有样品结果均为相对于该值的值。LDH阳性对照是来自试剂盒的阳性对照。黑色条(2小时温育)是在每种情况下每对条的左侧条,并且红色条(24小时温育)是在每种情况下每对条的右侧条。

[0791] 图33示出了试验1在MOI 3.0时对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。在试验1中,使用SARS-CoV-2在四个感染复数(MOI)下进行一次病毒减产测定,使用接种病毒的返滴定法进行确认。对于接种MOI 3的细胞,滴定后在病毒对照孔中发现log₁₀ TCID₅₀/mL为2.1。对于一些试验条件,可能观察到SARS-CoV-2产量的降低。在温育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。可能是因为在Vero E6细胞上24小时的复制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显示为误差棒。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限(LOD)。

[0792] 图34示出了试验2(a)在MOI 0.3时和(b)在MOI 3.0时对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。该方法对应于试验1在这些MOI时的部分,不同之处在于制剂是试验2制剂(在其各种浓度下的试验制剂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显示为误差棒。氯喹和细胞对照

log₁₀TCID₅₀/mL值的水平虚线水平是该测定的检测限 (LOD)。

[0793] 讨论

[0794] 在LDH测定中,NO生成水性制剂没有细胞毒性(图32)。特别是在亚硝酸盐、酸和多元醇浓度较高时,针对SARS-CoV-2的体外抗病毒作用令人印象深刻,与氯喹相当(图33和图34)。

[0795] NO生成水性制剂在惊人的高pH值下是有效的。对pH值5.4和5.8进行了测试,但低至5.2甚至更低的pH,也会有效力。

[0796] 此外,数据显示,在不存在NO生成制剂的情况下,有机羧酸(诸如缓冲至pH 5.4或5.8的柠檬酸)具有惊人的低细胞毒性和对SARS-CoV-2的高体外抗病毒作用(图32至34;“柠檬酸pH 5.8”和“柠檬酸pH 5.4”条)。羧酸制剂的pH值相对较高,这使得此类制剂作为肺内活性剂具有吸引力,原因是它们有望对气道和肺部组织表面无毒。由于SARS-CoV-2属于与SARS-CoV相同的冠状病毒家族,并且病毒之间存在相似性,因此有理由预测此类有机羧酸将显示出针对SARS-CoV病毒的相应效力,该SARS-CoV病毒是引起严重急性呼吸综合征(SARS)的冠状病毒,在2002年和2003年曾有过充分记载的爆发。

[0797] 实施例9

[0798] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液对冠状病毒SARS-CoV的抗病毒活性

[0799] 为了研究本发明提供的对SARS-CoV-2的抗病毒活性和本发明提供的对SARS-CoV的抗病毒活性之间的相似性,进行了以下实验。

[0800] 在MOI 3.0时,测试制剂F1C1、F1C2、F1C3和F1C4对SARS-CoV的抗病毒活性。该方法类似于实施例8中所述的抗病毒测试。在用结晶紫进行细胞单层染色之前,在显微镜下检查2个平板,并对细胞病变效应(CPE)进行评分。在这些平板中发现存在细胞碎片形式的CPE,其位于底层单层上。

[0801] 图35示出了在显微镜下检查的两个平板的结果。数据是每个条件的单次滴定。对于其余的板,由于细胞单层太致密,在结晶紫染色后无法对CPE进行评分。细胞对照log₁₀TCID₅₀/mL值的水平虚线水平是该测定的检测限(LOD)。

[0802] 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。

[0803] 实施例10

[0804] 人用吸入器

[0805] 图30和图31示意性地示出了使用根据本发明的液体组合物的人用吸入器的实施方案。

[0806] 吸入器适当地由压缩气体提供动力,并且被配置为以一般常规方式响应于吸入器的一次手动致动,由吸入器中的储器递送一个剂量的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂的夹带液滴。受试者通常在致动吸入器的同时吸气,如哮喘病人在使用吸入器时的常规做法。如图30所示,每剂量约3分钟的治疗时间应该是合适的,在使用适当剂量的活性组合物的情况下,作用持续时间可达约2小时。

[0807] 气载液滴进入受试者受感染的肺部,在此与受感染(例如,病毒感染)的肺膜接触。图31在右侧示出了本发明在肺衬里上沉积水性一氧化氮(NO)生成组合物(“NO水溶液”)的多个液滴的作用。图31在左侧示出了受试者吸入气态一氧化氮(“吸入性一氧化氮”)而非水性一氧化氮(NO)生成组合物情况下的相应作用。

[0808] 如图所示,如果使用吸入性一氧化氮,则效力可能大大降低。吸入性一氧化氮不仅有一部分在其通过肺部的膜衬里进入血流之前被受试者呼出,而且还有另一部分被吸入空气中的氧气氧化成有毒的二氧化氮(NO_2)。除了使用用于治疗受试者的气态一氧化氮的可用性降低之外,二氧化氮还对受试者的肺具有不利影响。

[0809] 因此,通过使用根据本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂,可以更有效且高效地将一氧化氮递送至患者的肺部并经由肺部进入患者的血流。

[0810] 结论

[0811] 上述内容不受限制地概括性地描述了本发明。对于本领域技术人员来说显而易见的变动和修改都包括在所附权利要求的范围内。如果在授予本发明专利的任何特定管辖范围的法律规定对未经授权使用与所附权利要求相当的技术实施专利,则权利人希望专利涵盖这种等同技术。

[0812] 在适用法律允许的范围内,所附权利要求的保护范围的等效形式也被权利要求所涵盖。例如,一般而言,本文所述的 NO_x 生成反应的组分或组分的部分的混合顺序并不重要,只要 NO_x 生成反应不是过早地引发即可。本发明的任何组合、试剂盒或组合物的必要组分和非必要组分的任何混合顺序都打算涵盖在内。如果一种或多种组分以液体形式,例如作为溶液使用,则与一种或多种组分以固体形式或液体形式以不同体积或浓度使用的情况相比,该一种或多种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溶质(包括但不限于该一种或多种组分)的浓度的影响可能不同。在适用法律允许的范围内,使用所有等价浓度和/或物理形式(固体、液体、溶液)的组分形成本发明的组合、试剂盒和组合物,以及使用所有等价步骤和步骤顺序制备所述组合、试剂盒和组合物,即使在本文中并未描述或具体要求保护,也在本权利要求的范围内。

通过亚硝酸钠与酸（相同浓度、pH）在不同水性环境中的反应每mg亚硝酸钠逸出的一氧化氮（nmol/mg亚硝酸盐）的累积曲线图

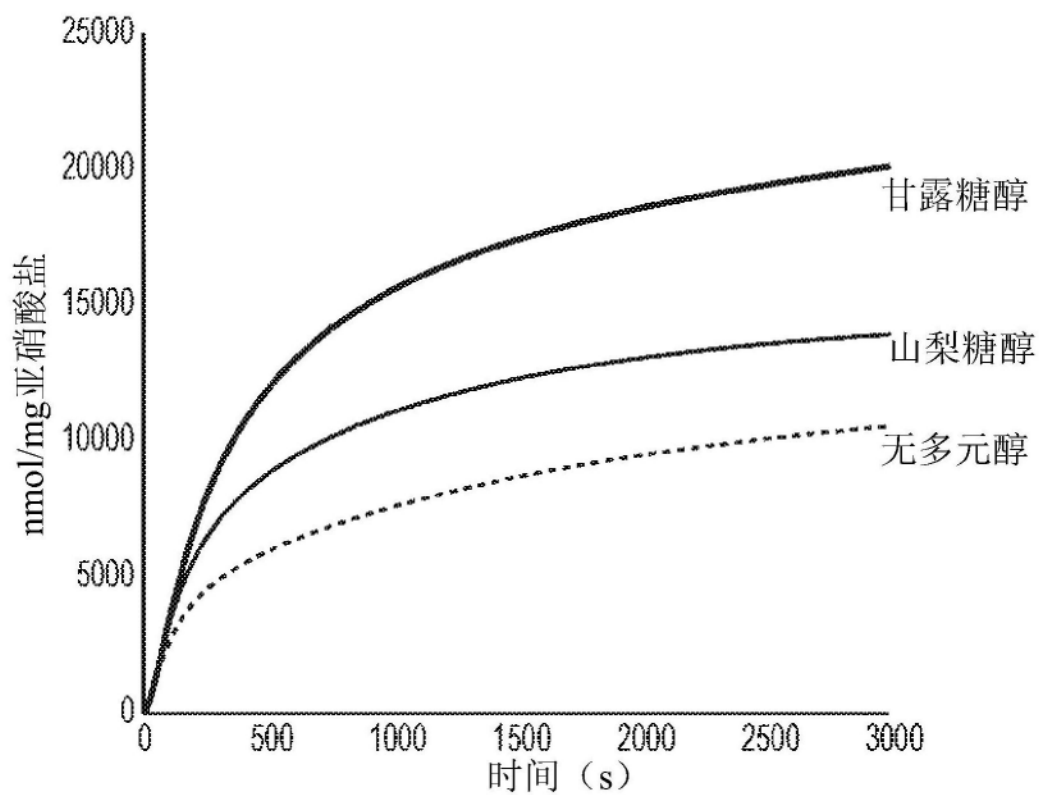


图1

在不存在多元醇的情况下通过柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液与亚硝酸钠反应生成的一氧化氮的逸出速率

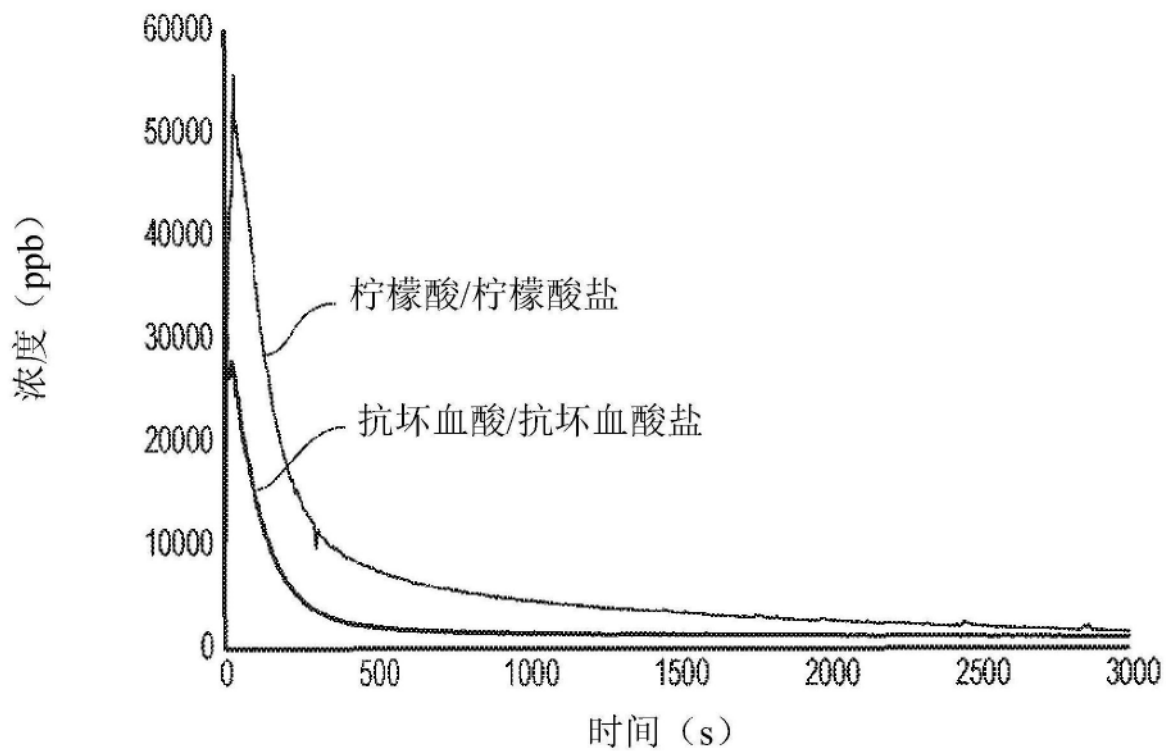


图2

在存在多元醇的情况下通过柠檬酸与亚硝酸钠反应
生成的一氧化氮的逸出速率

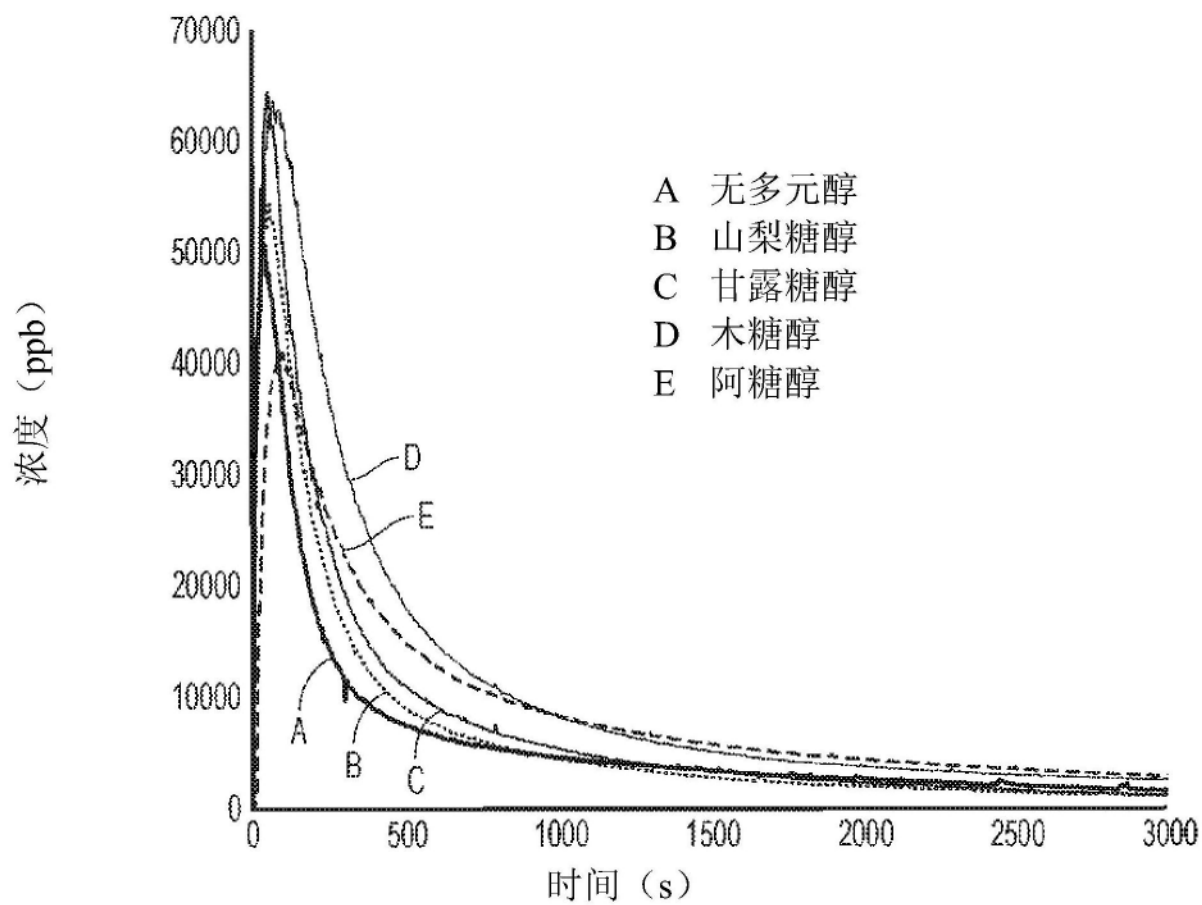


图3

在存在多元醇（1M）的情况下通过抗坏血酸与亚硝酸钠反应生成的一氧化氮的逸出速率

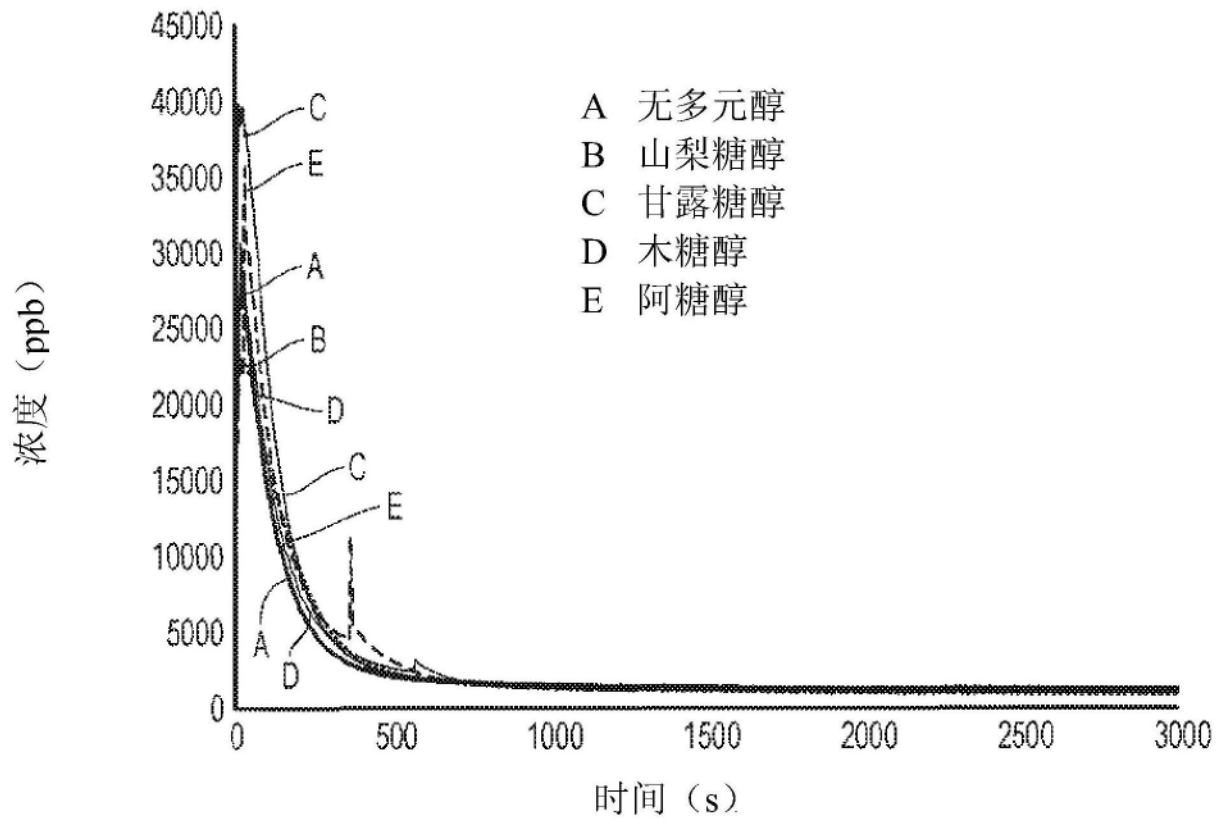


图4

在存在多元醇(0.5M)的情况下通过柠檬酸与亚硝酸钠反应产生的一氧化氮的逸出速率

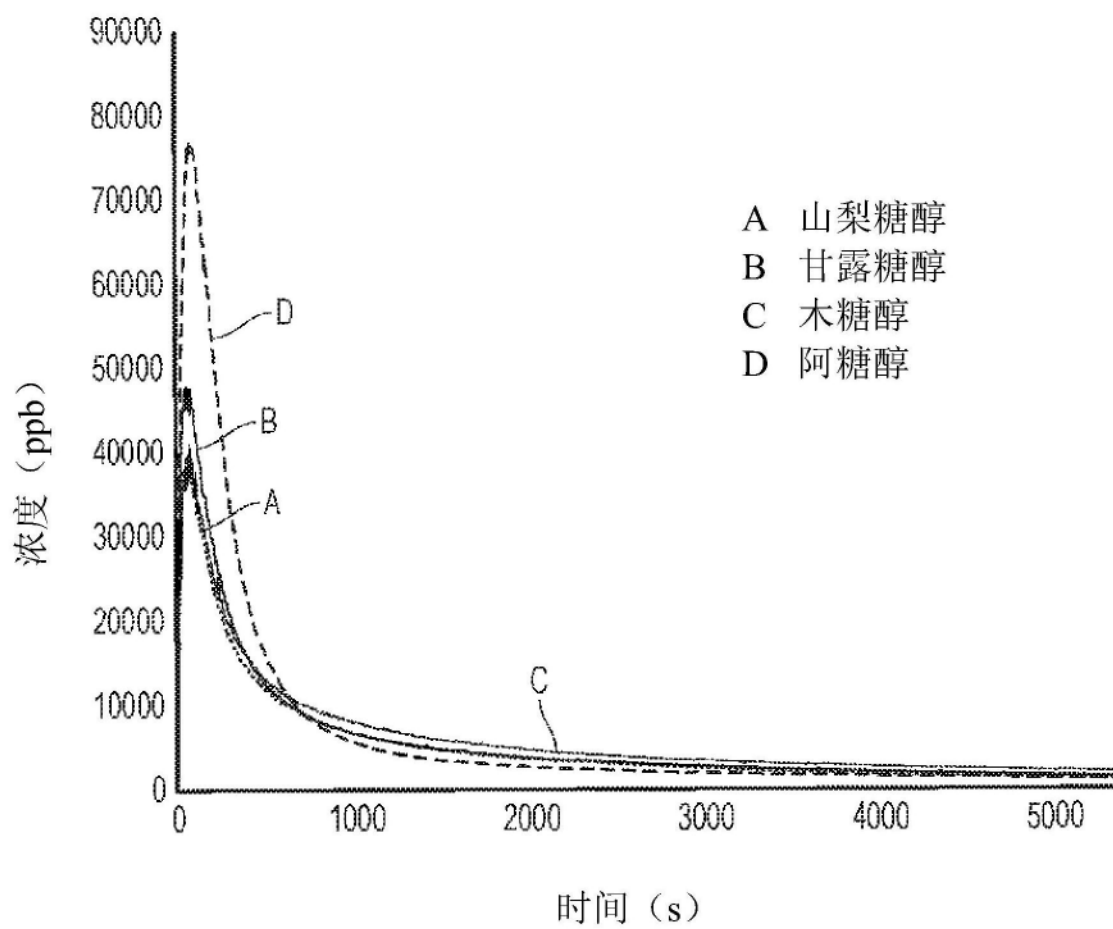


图5

在存在多元醇(0.5M)的情况下通过抗坏血酸与亚硝酸钠反应生成的一氧化氮的逸出速率

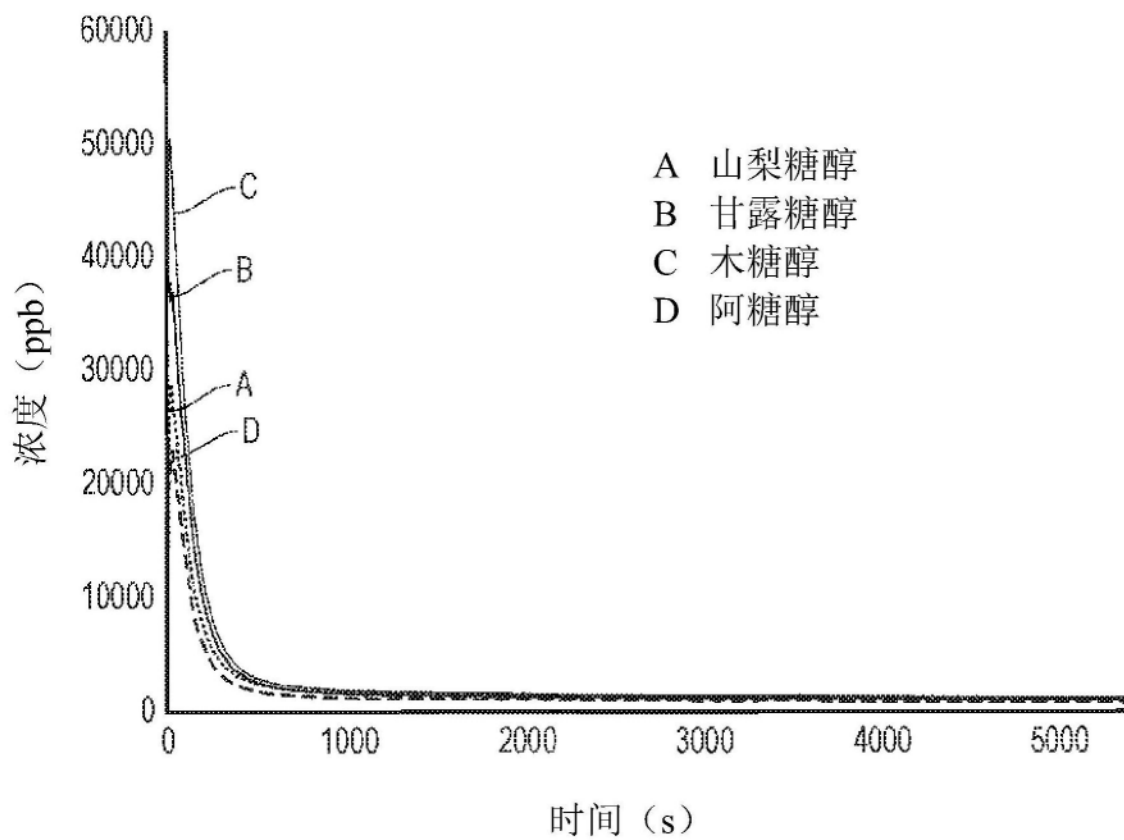


图6

在存在多元醇的情况下通过柠檬酸或抗坏血酸与亚硝酸钠反应生成的一氧化氮的逸出速率

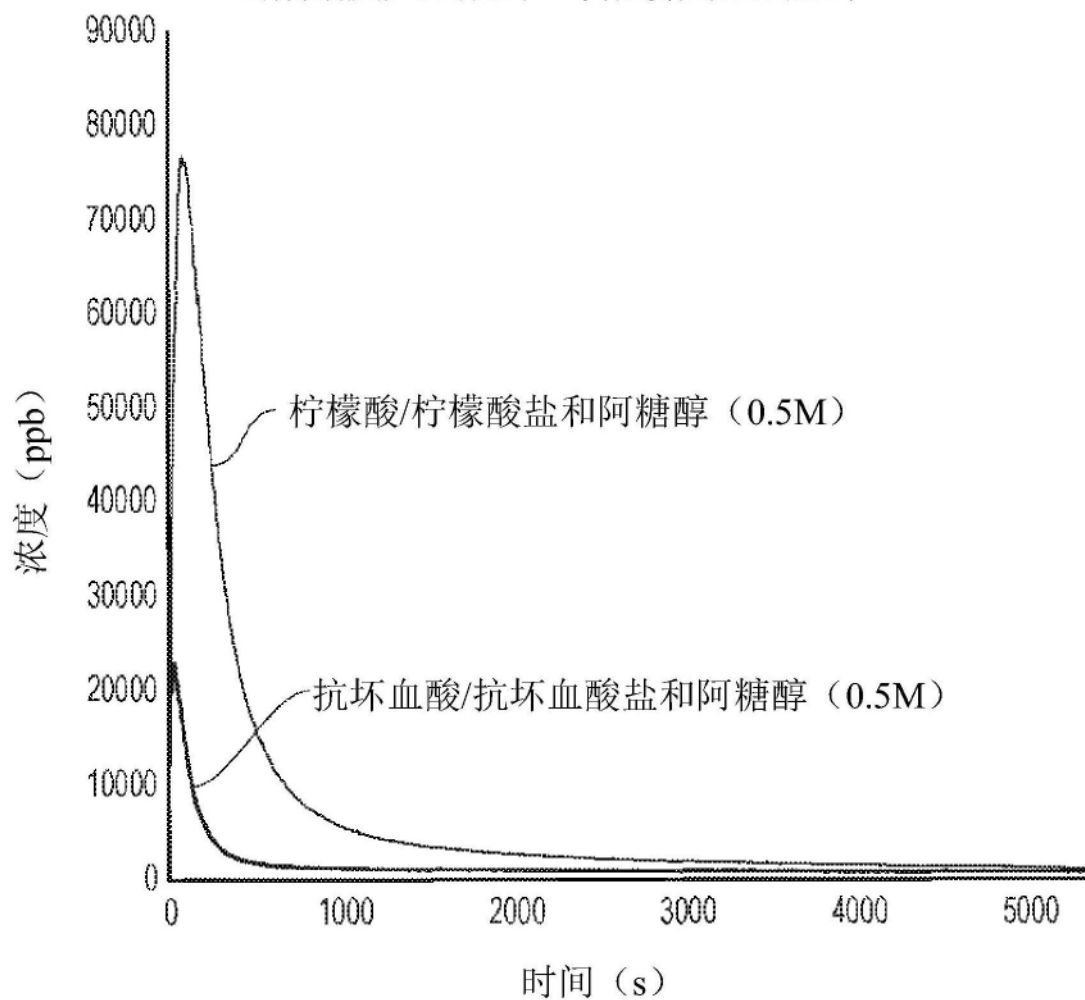


图7

在存在多元醇的情况下通过柠檬酸或抗坏血酸与亚硝酸钠反应生成的一氧化氮的逸出速率

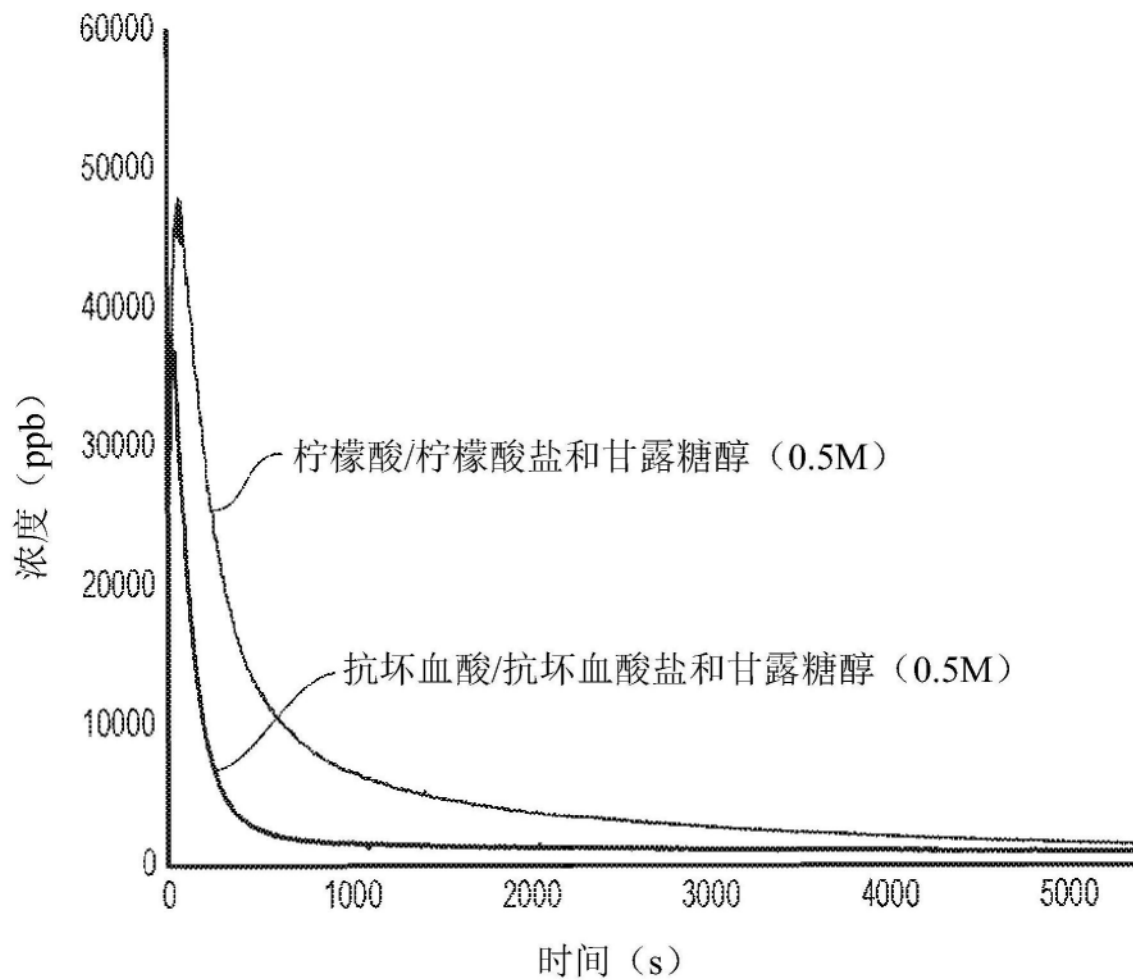
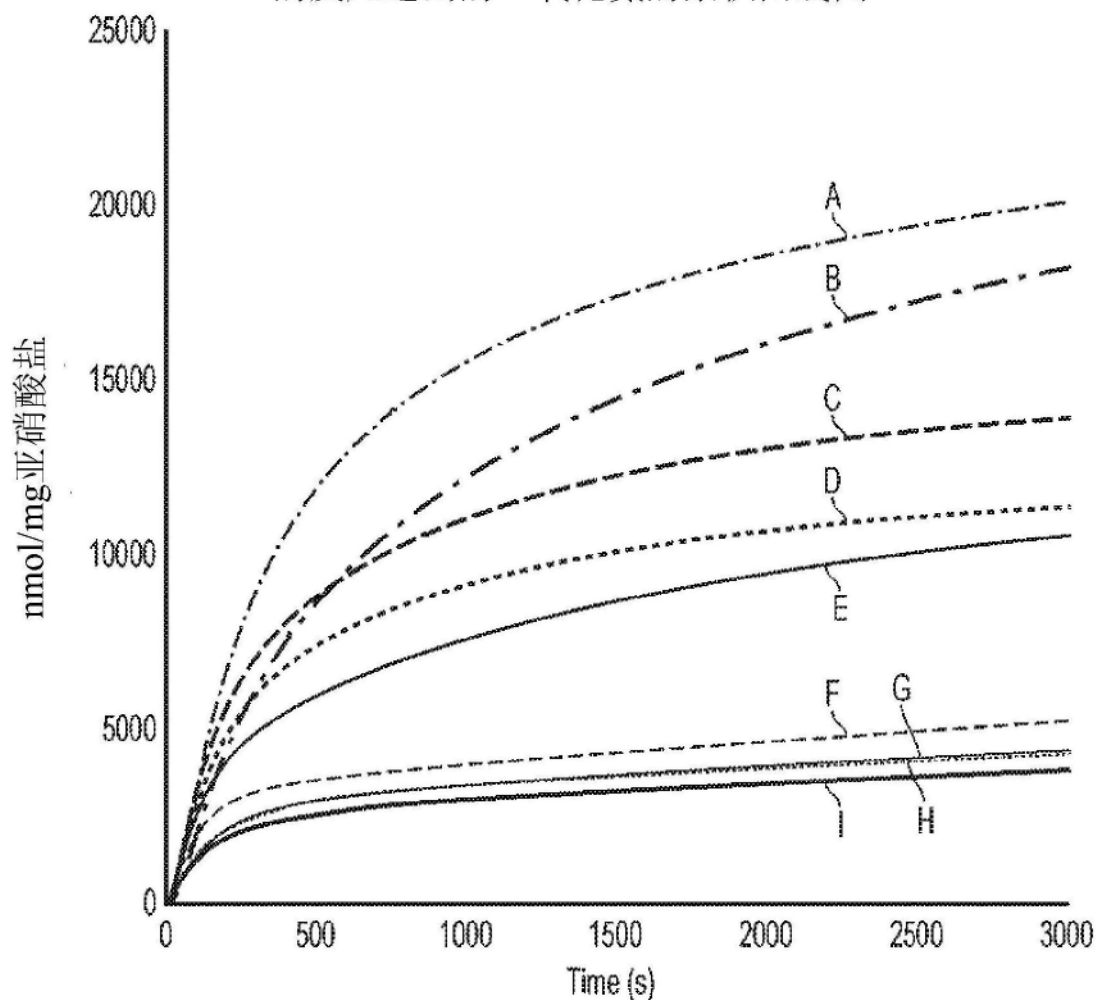


图8

每mg亚硝酸钠在存在多元醇（1.0M）的情况下通过亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗坏血酸盐的反应逸出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 含阿糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- C 含甘露糖醇的柠檬酸/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 含甘露糖醇的抗坏血酸/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

每mg亚硝酸钠在存在多元醇的情况下通过亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗坏血酸盐的反应逸出的一氧化氮的累积曲线图

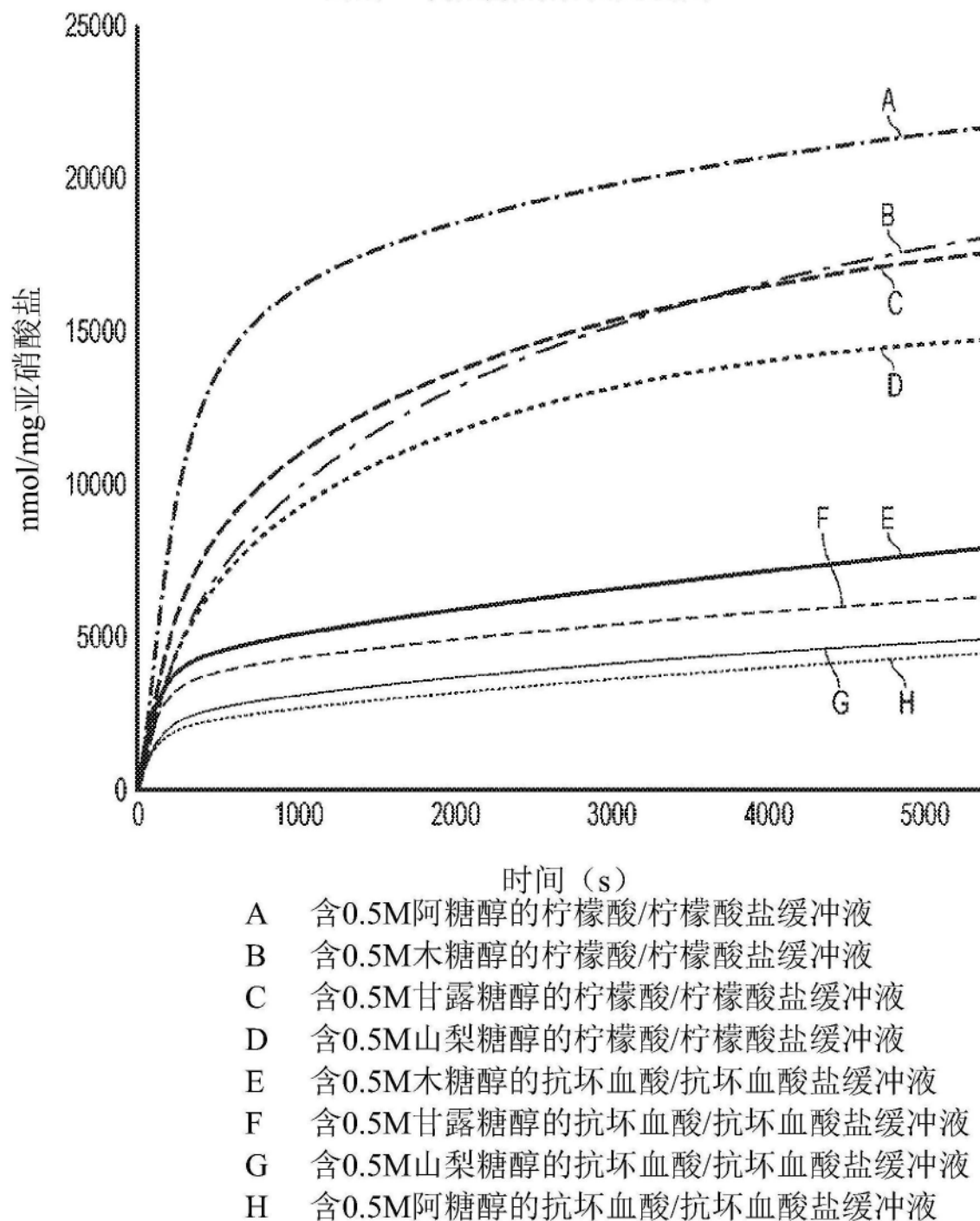


图10

在存在和不存在甘露糖醇的情况下通过亚硝酸钠与柠檬酸 (pH 3) 的反应逸出的一氧化氮的累积曲线图
(nmol NO/mg亚硝酸钠)

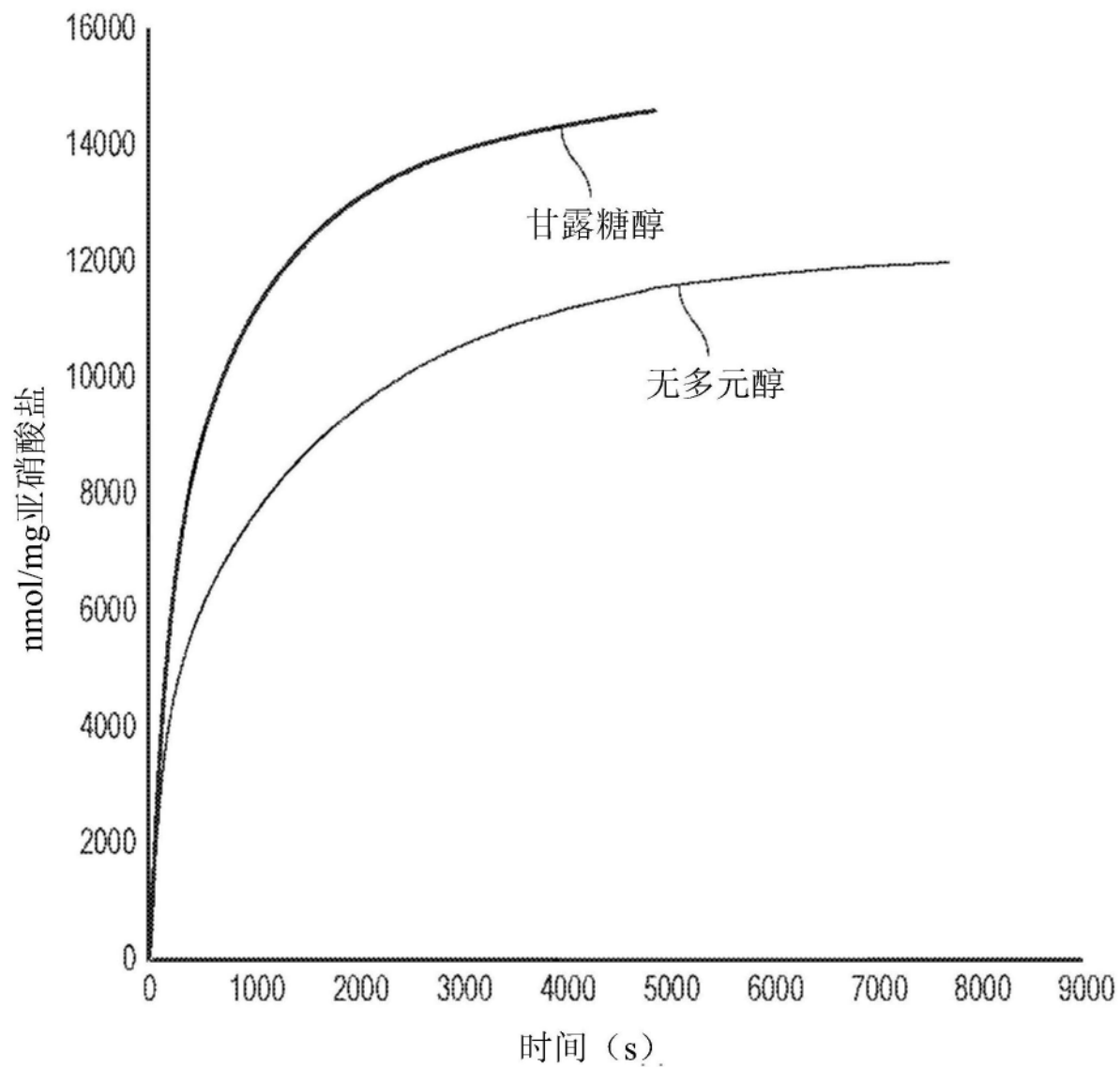


图11

pH 4.8时的一氧化氮逸出的累积曲线图

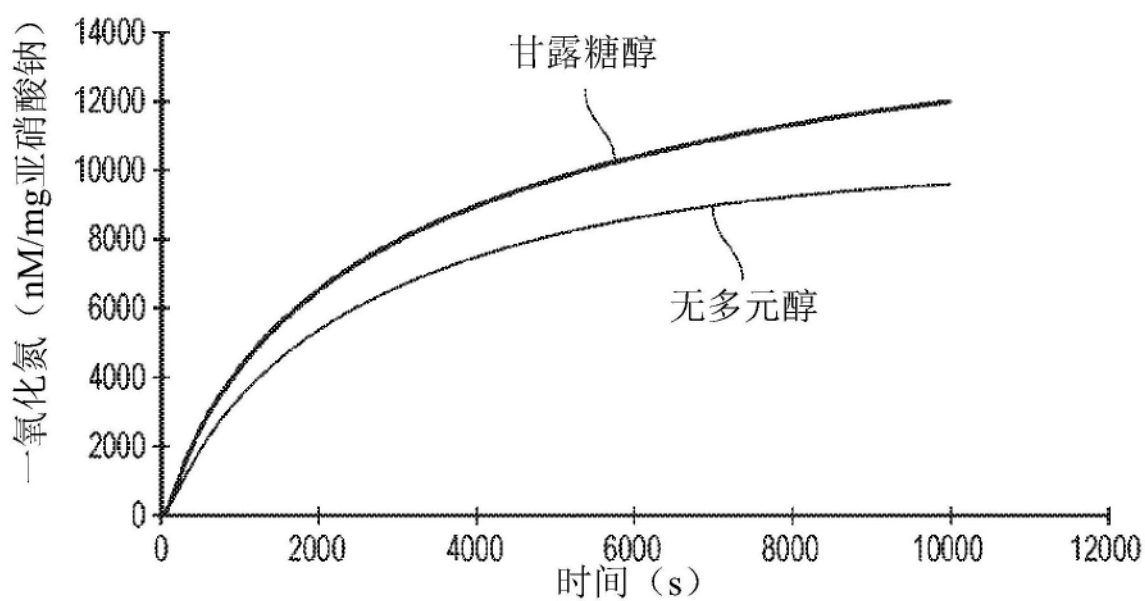


图12

pH 6.2时的一氧化氮逸出的累积曲线图

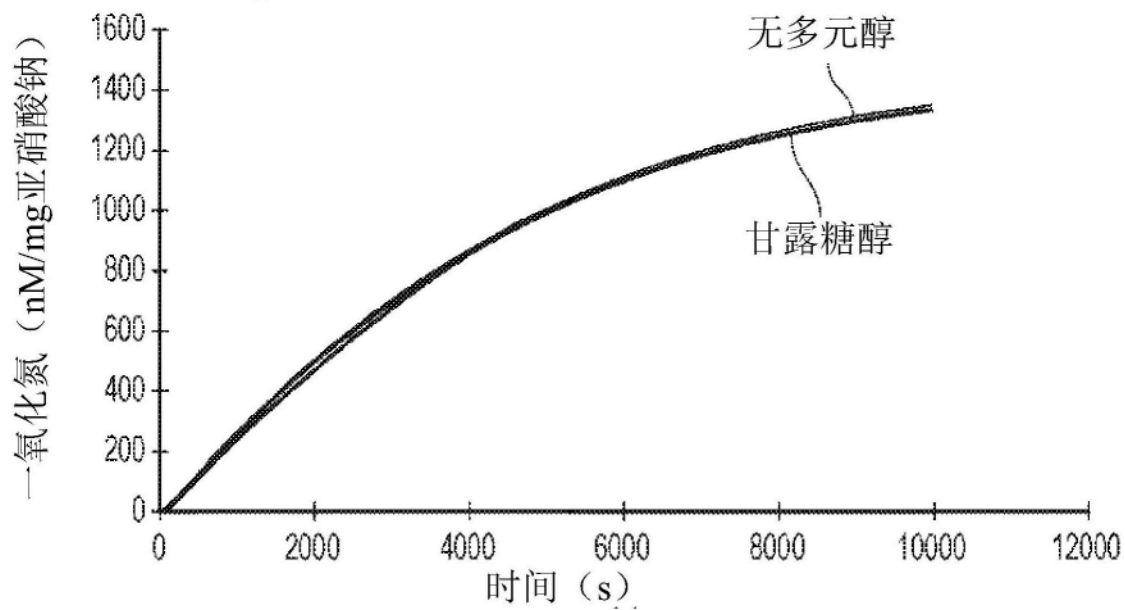


图13

每 cm^2 的网在存在多元醇的情况下通过亚硝酸钠与柠檬酸反应逸出的一氧化氮的累积曲线图

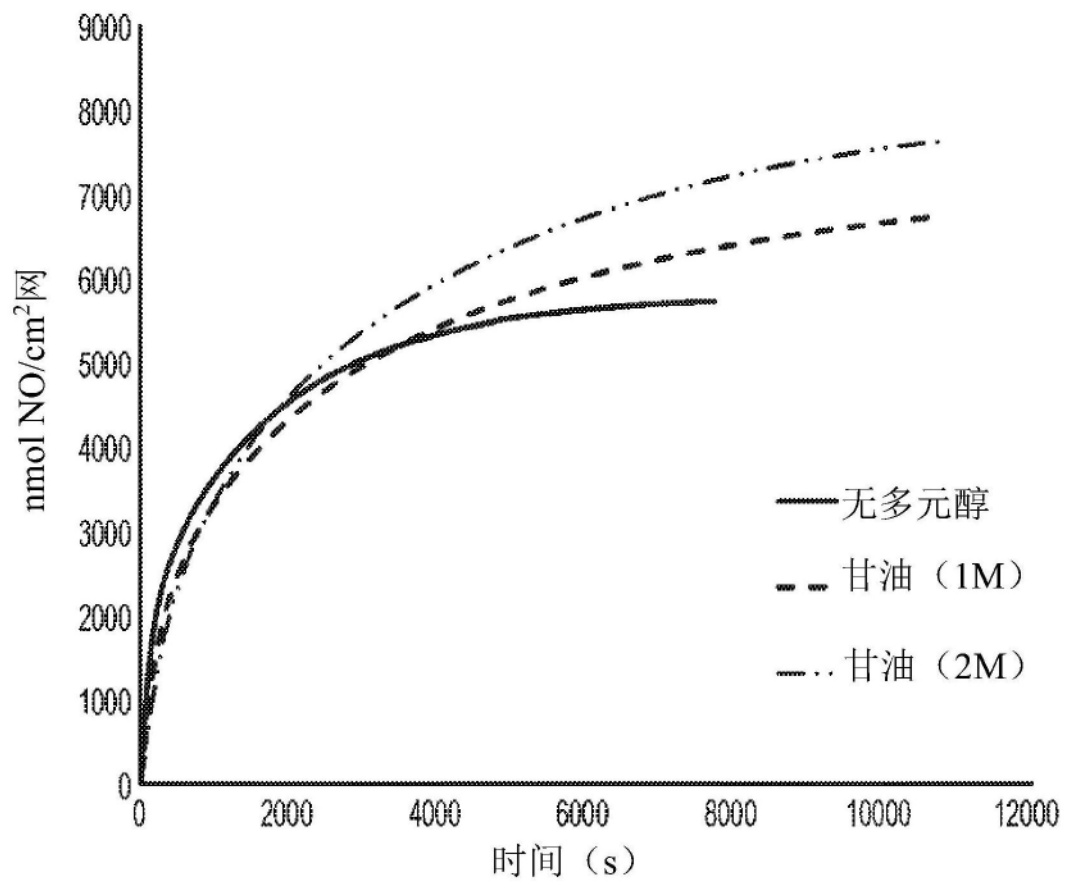


图14

每 cm^2 的网在存在多元醇的情况下通过亚硝酸钠与柠檬酸反应逸出的一氧化氮的累积曲线图

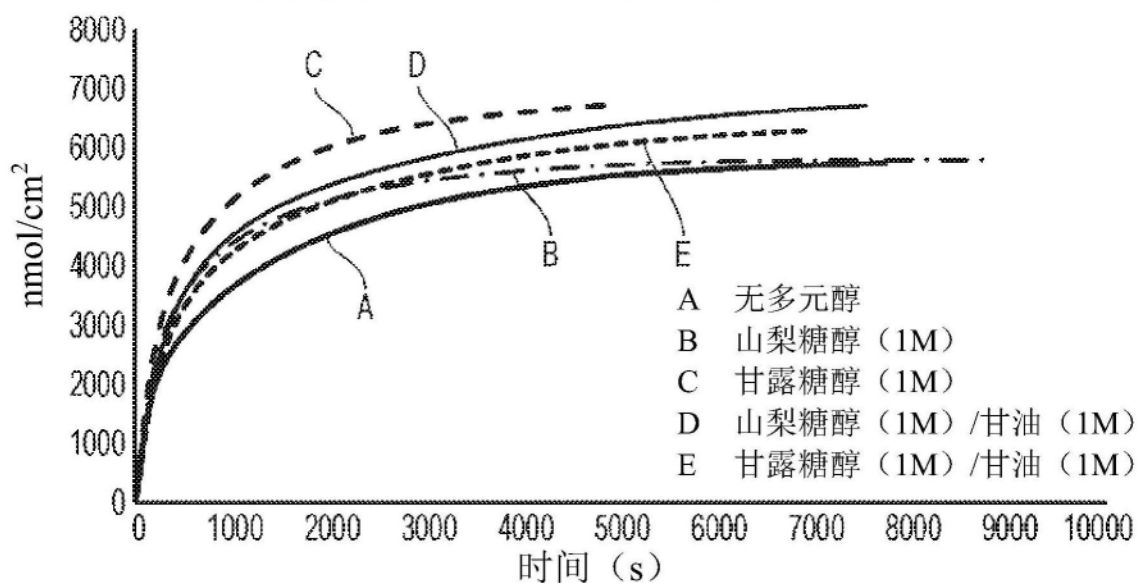


图15

每mg亚硝酸盐逸出的一氧化氮 (nmol) 的平均 (n=3) 累积图, 柠檬酸盐/柠檬酸盐pH 5.8

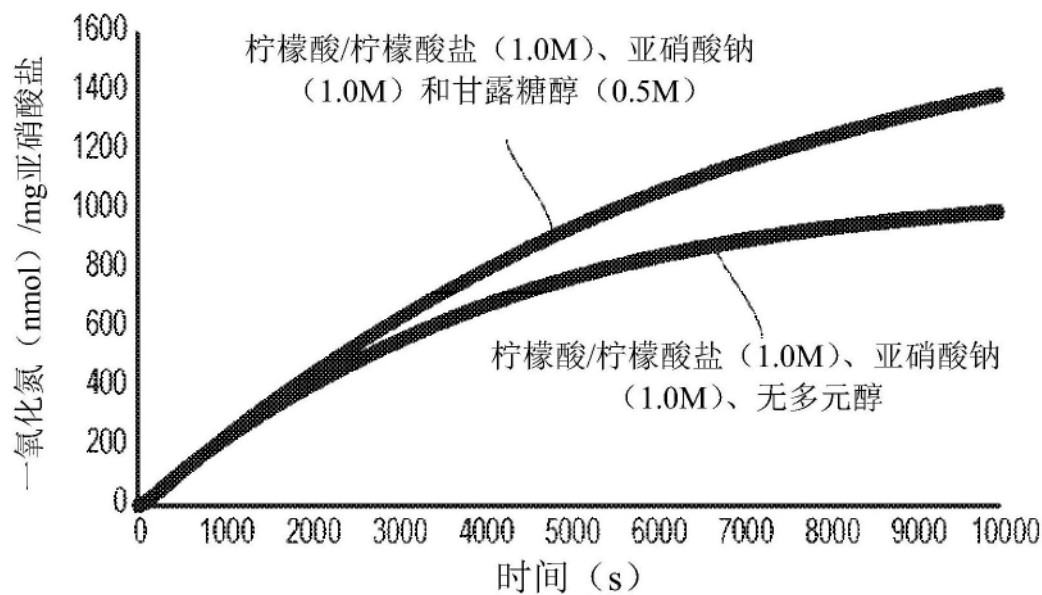


图16

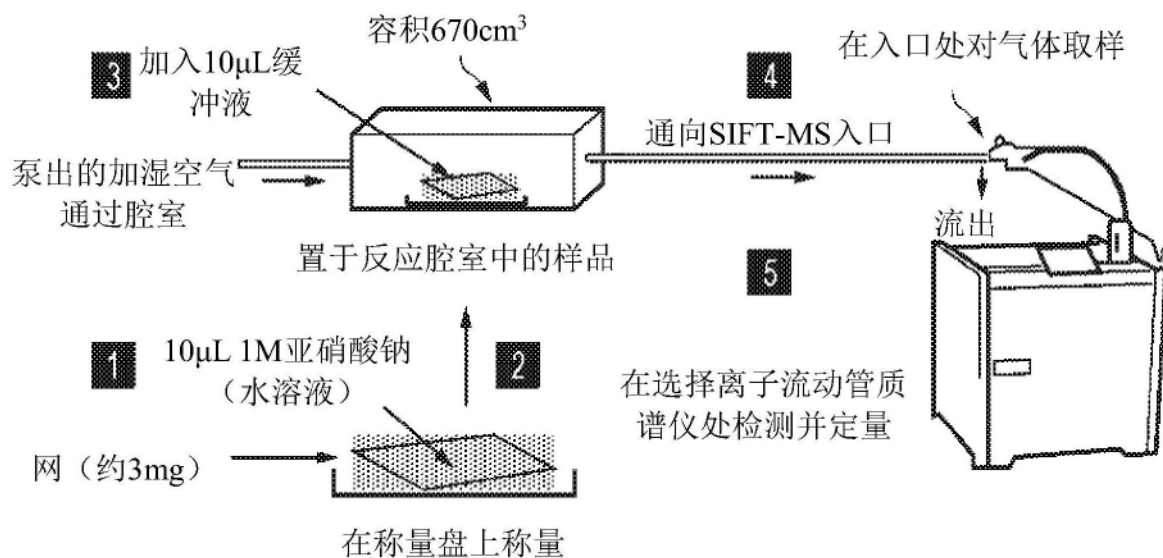


图17

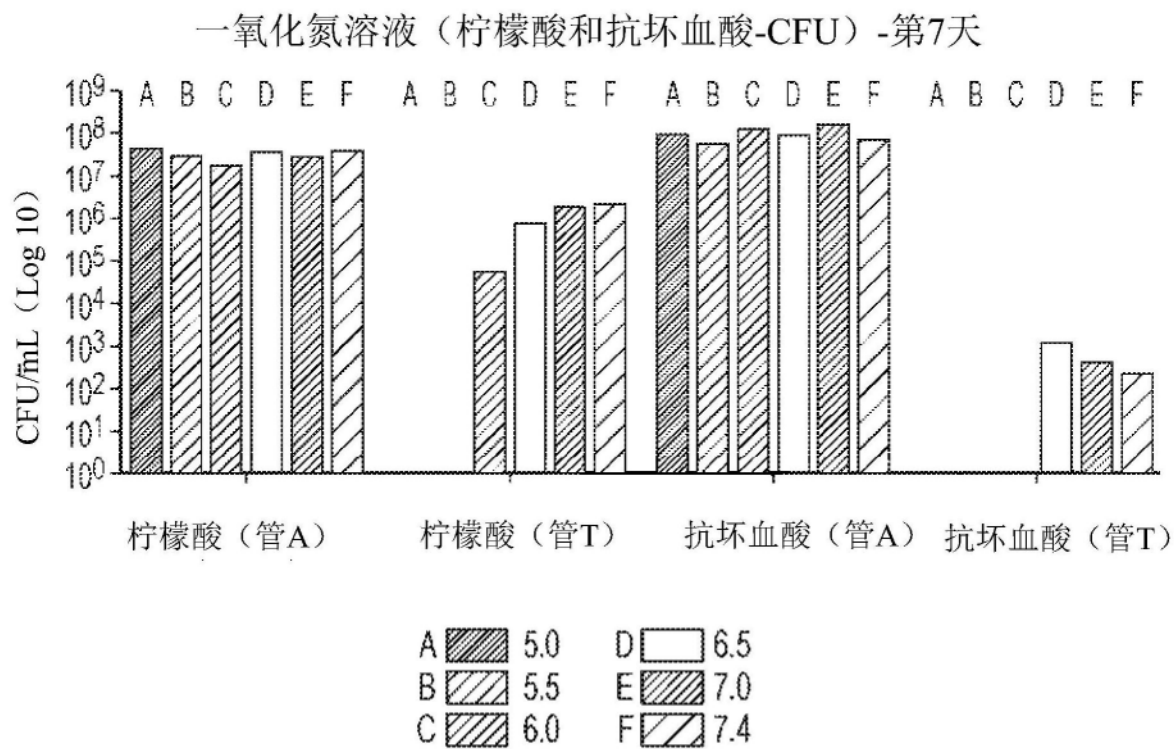


图18

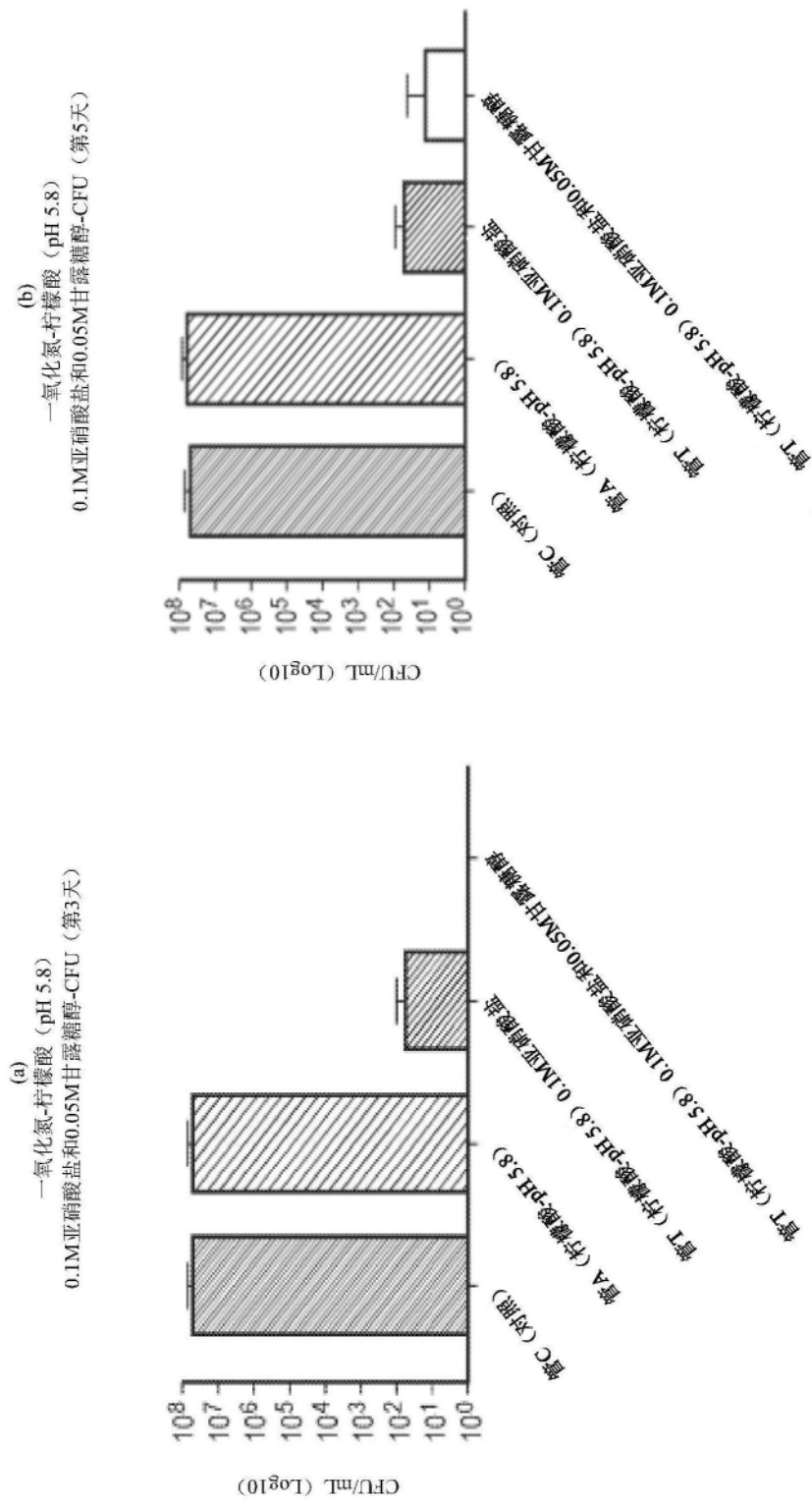


图19

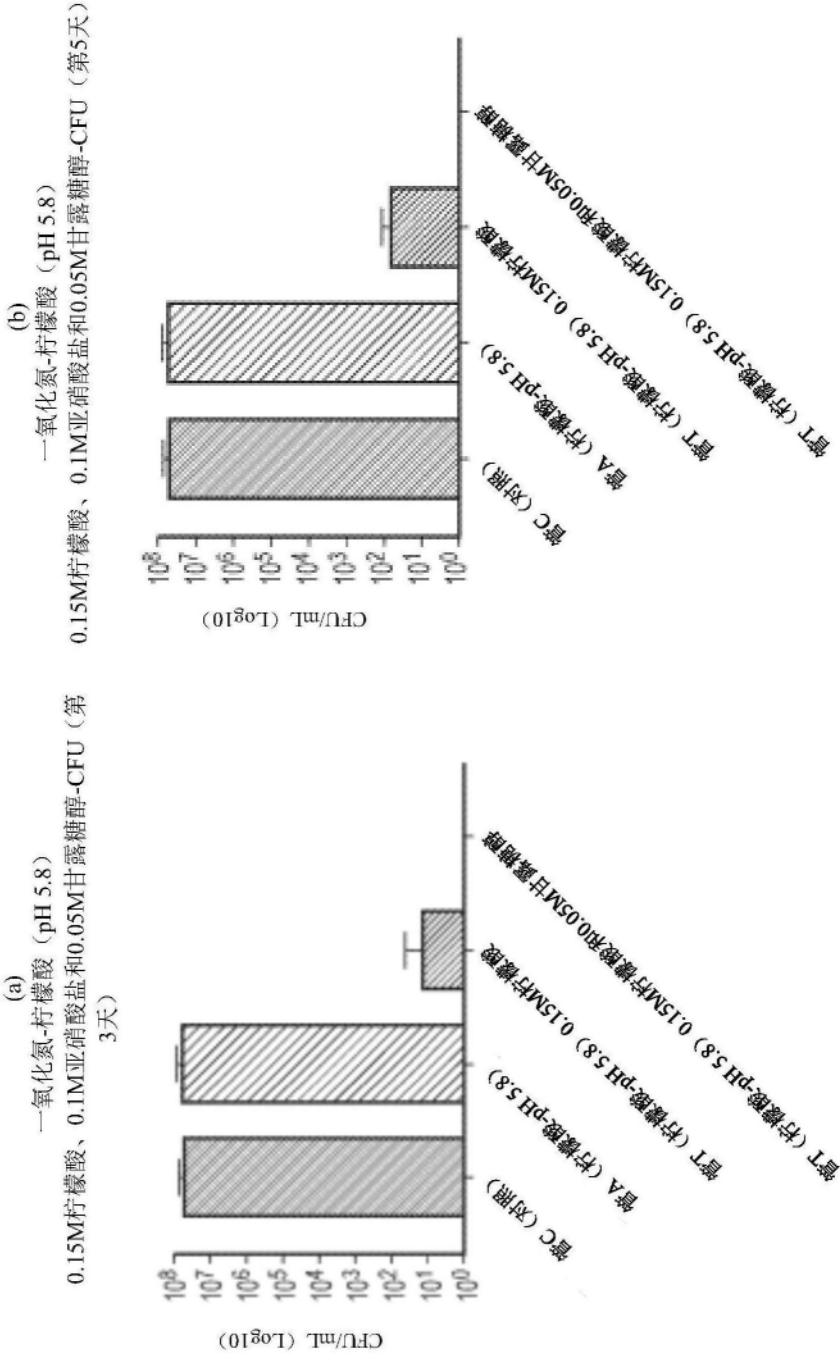


图20

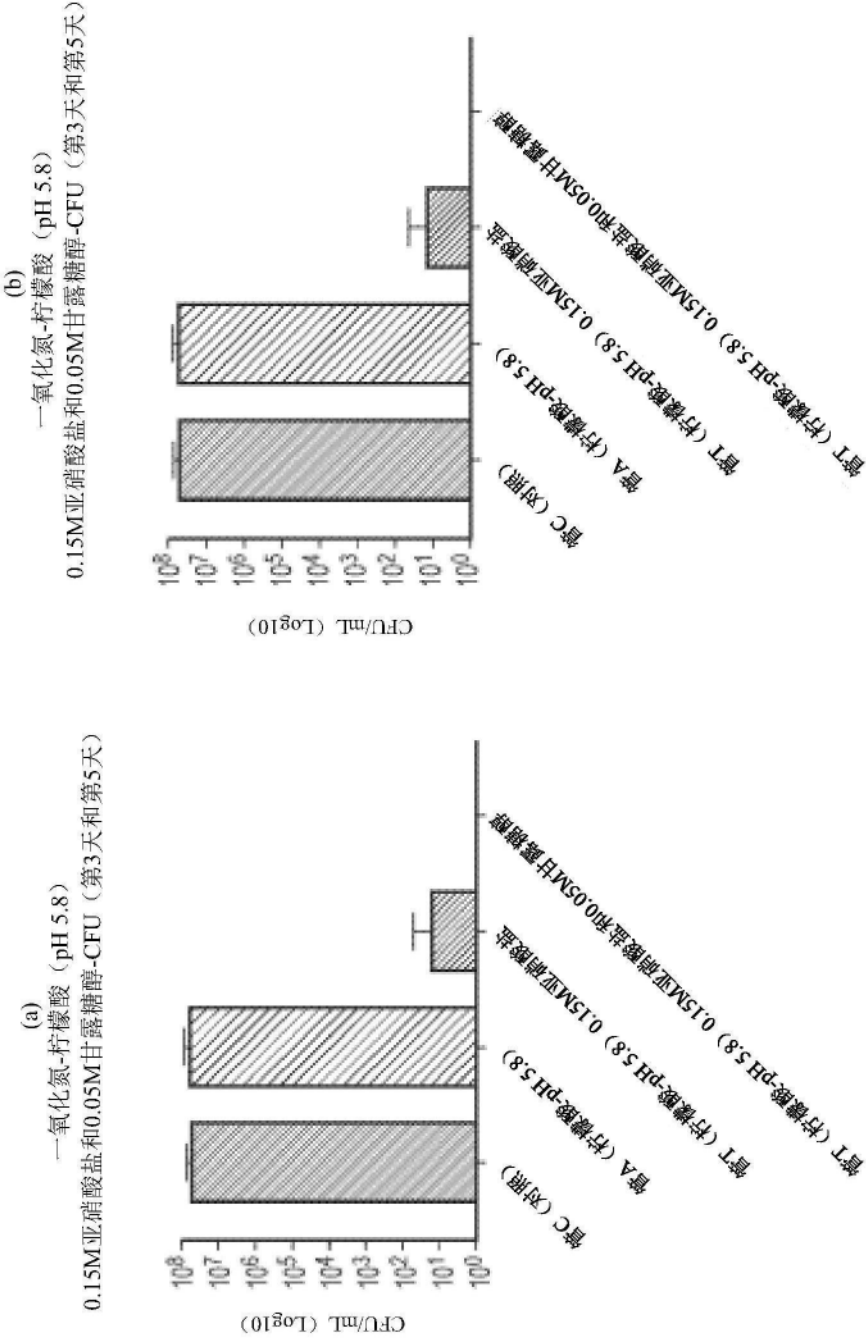


图21

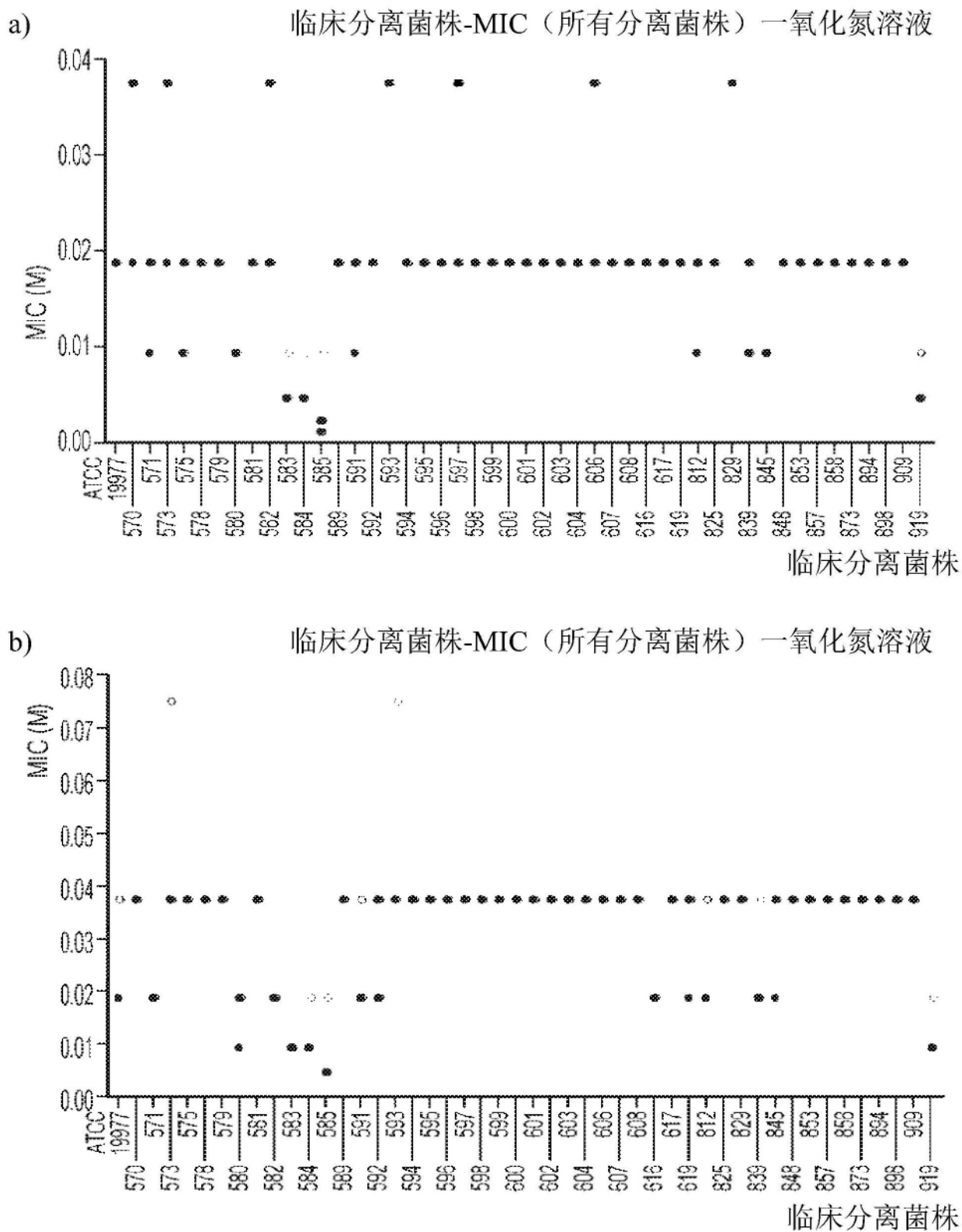
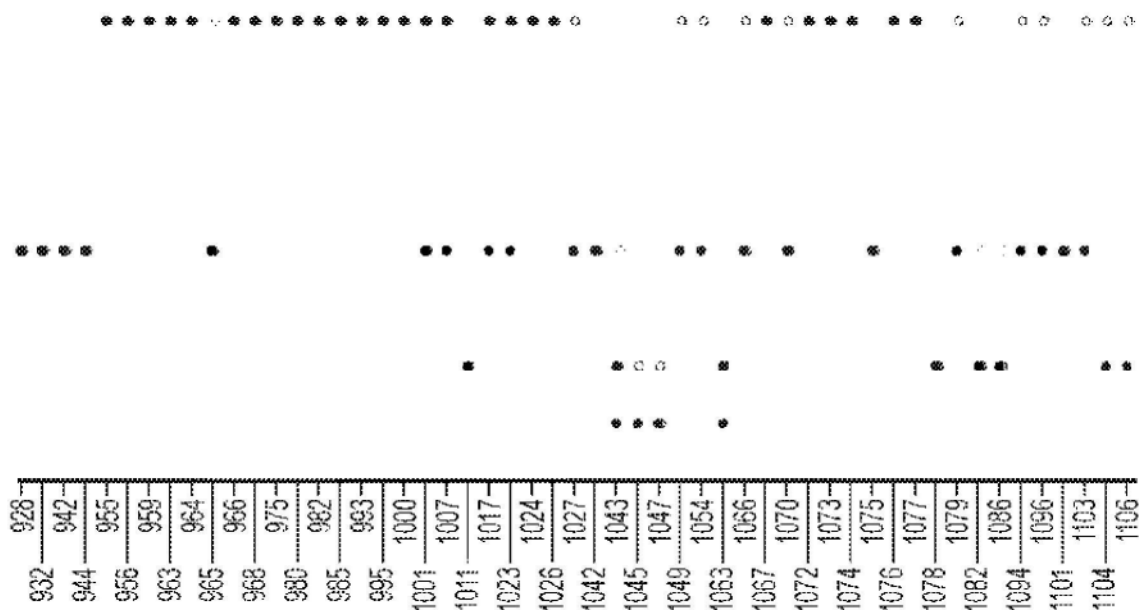


图22

- 0.1M柠檬酸、0.15M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇



- 0.15M柠檬酸、0.1M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇

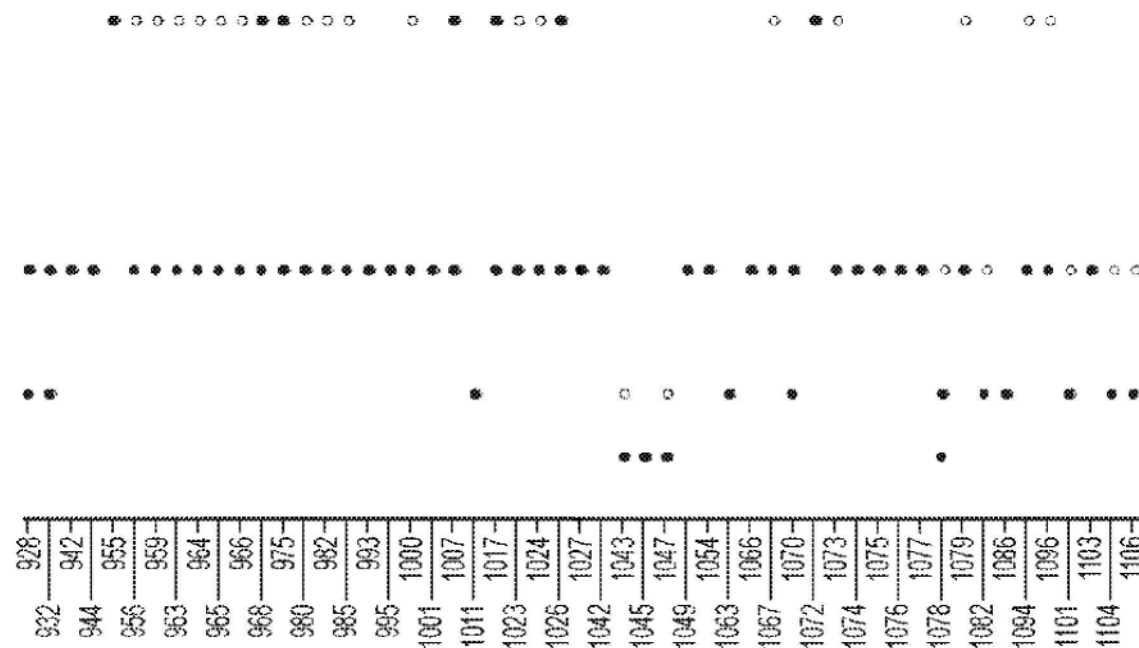


图22(续)

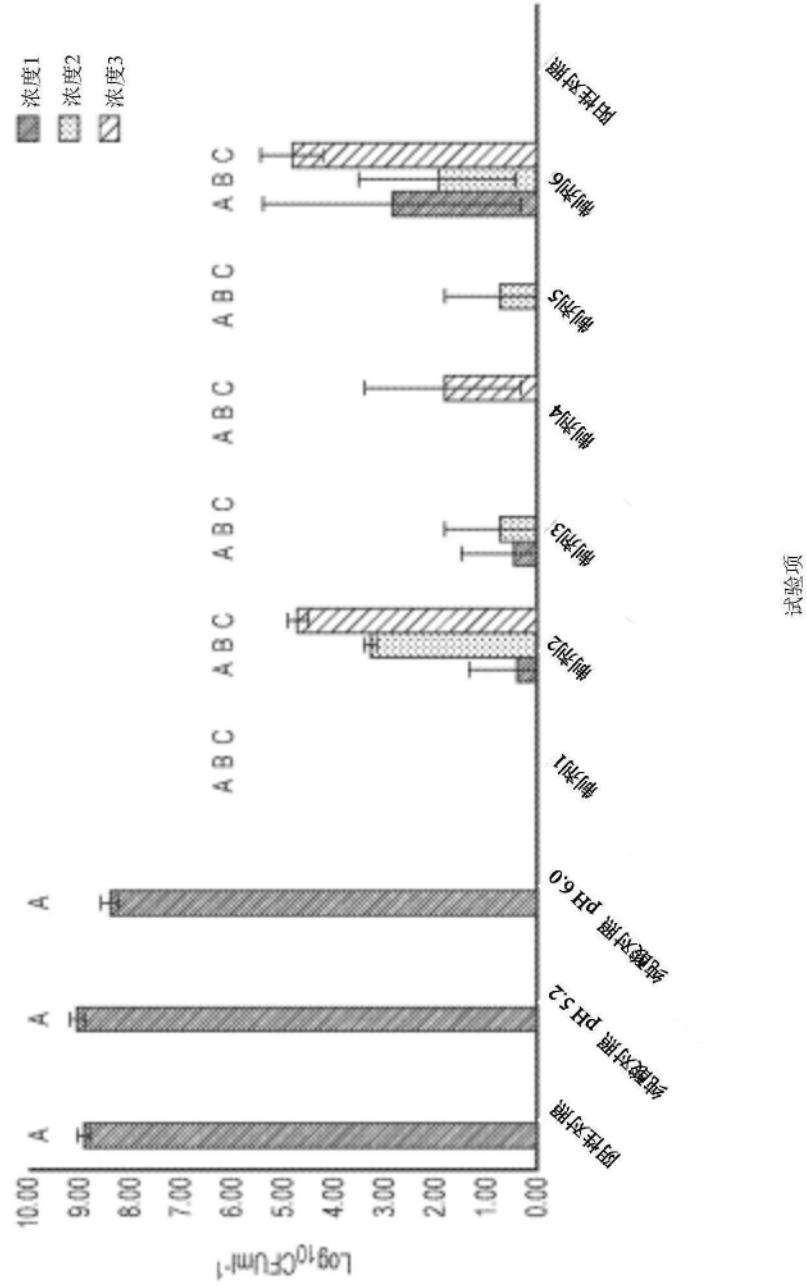


图23

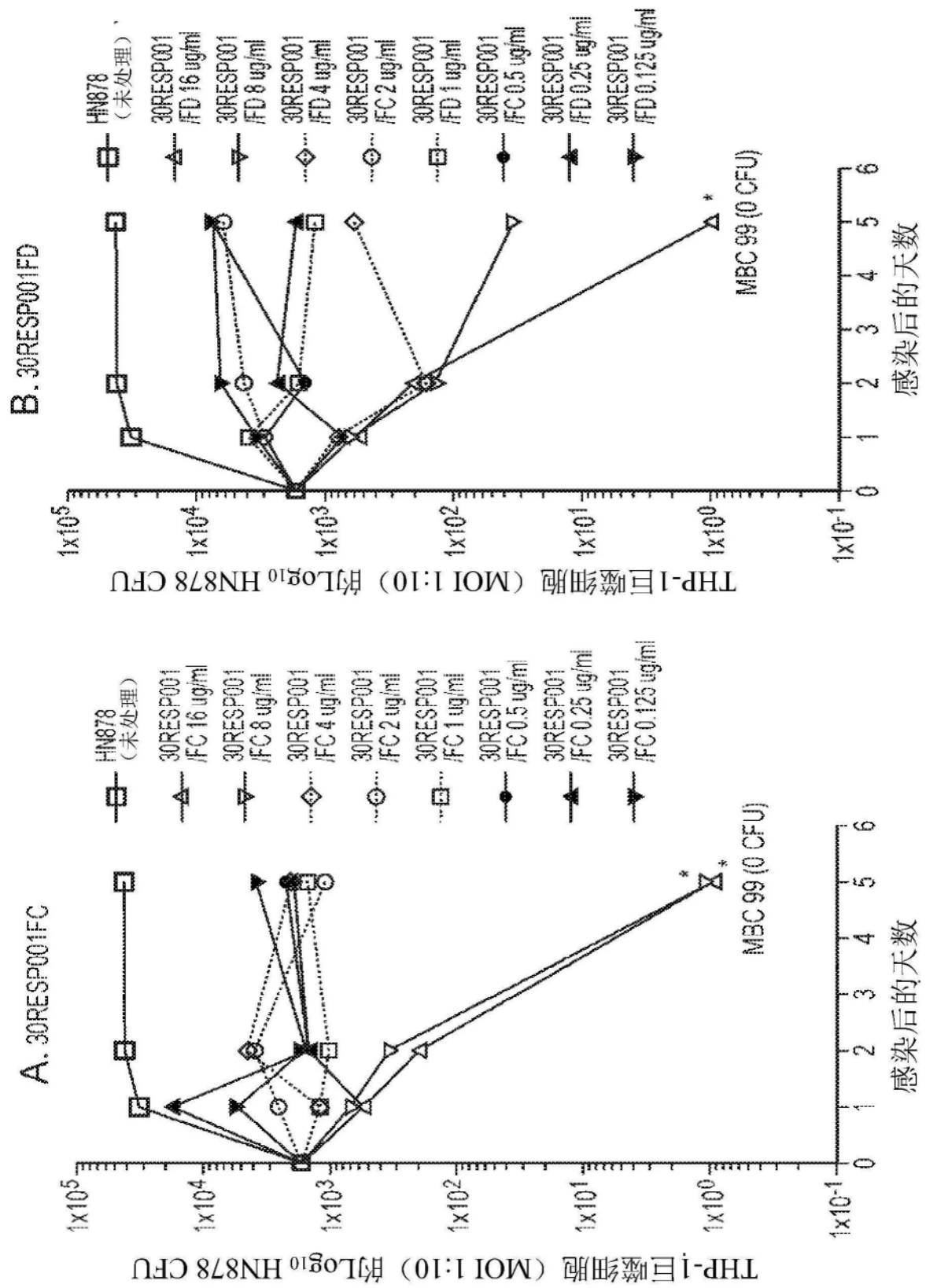


图24

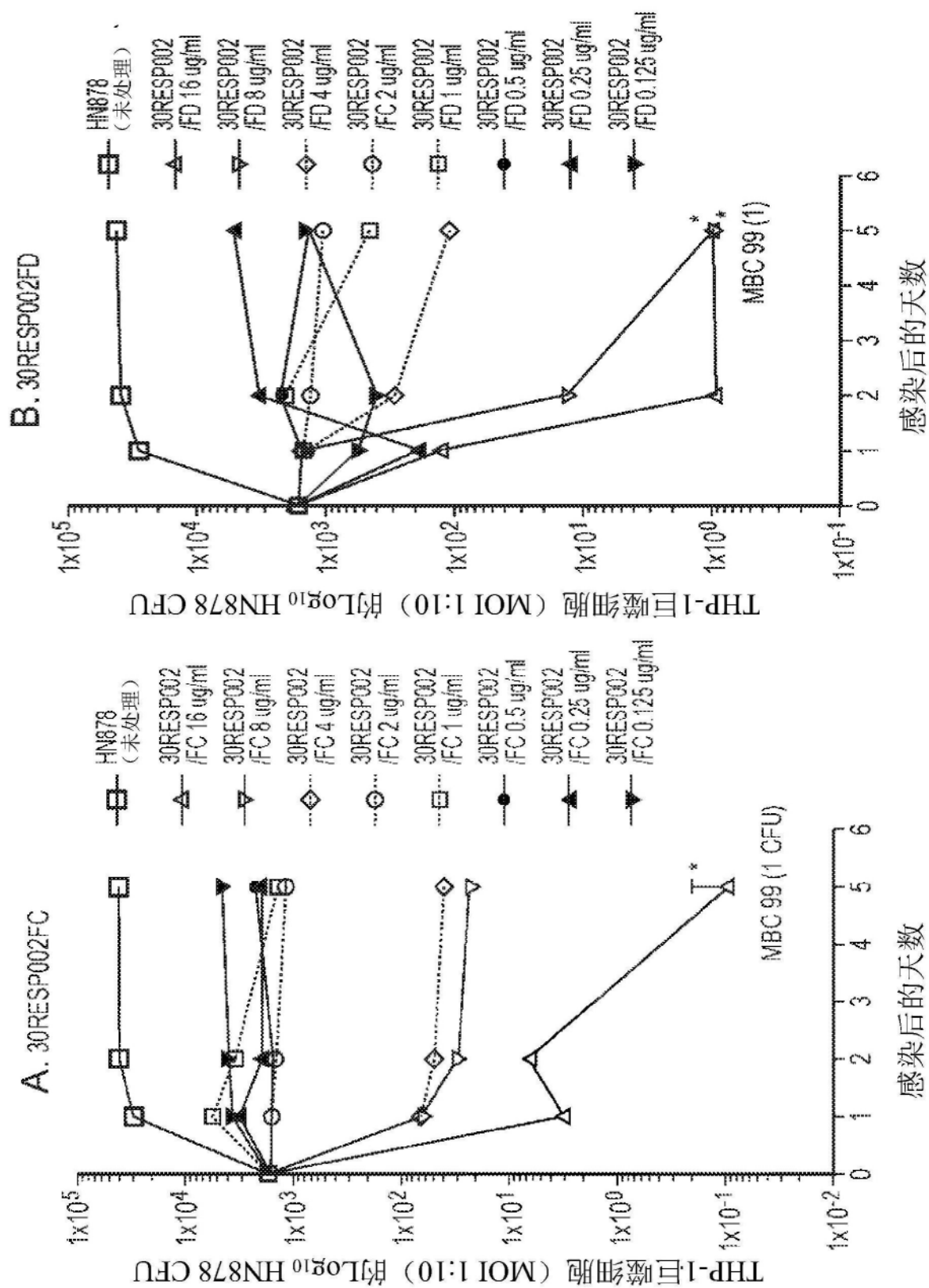


图25

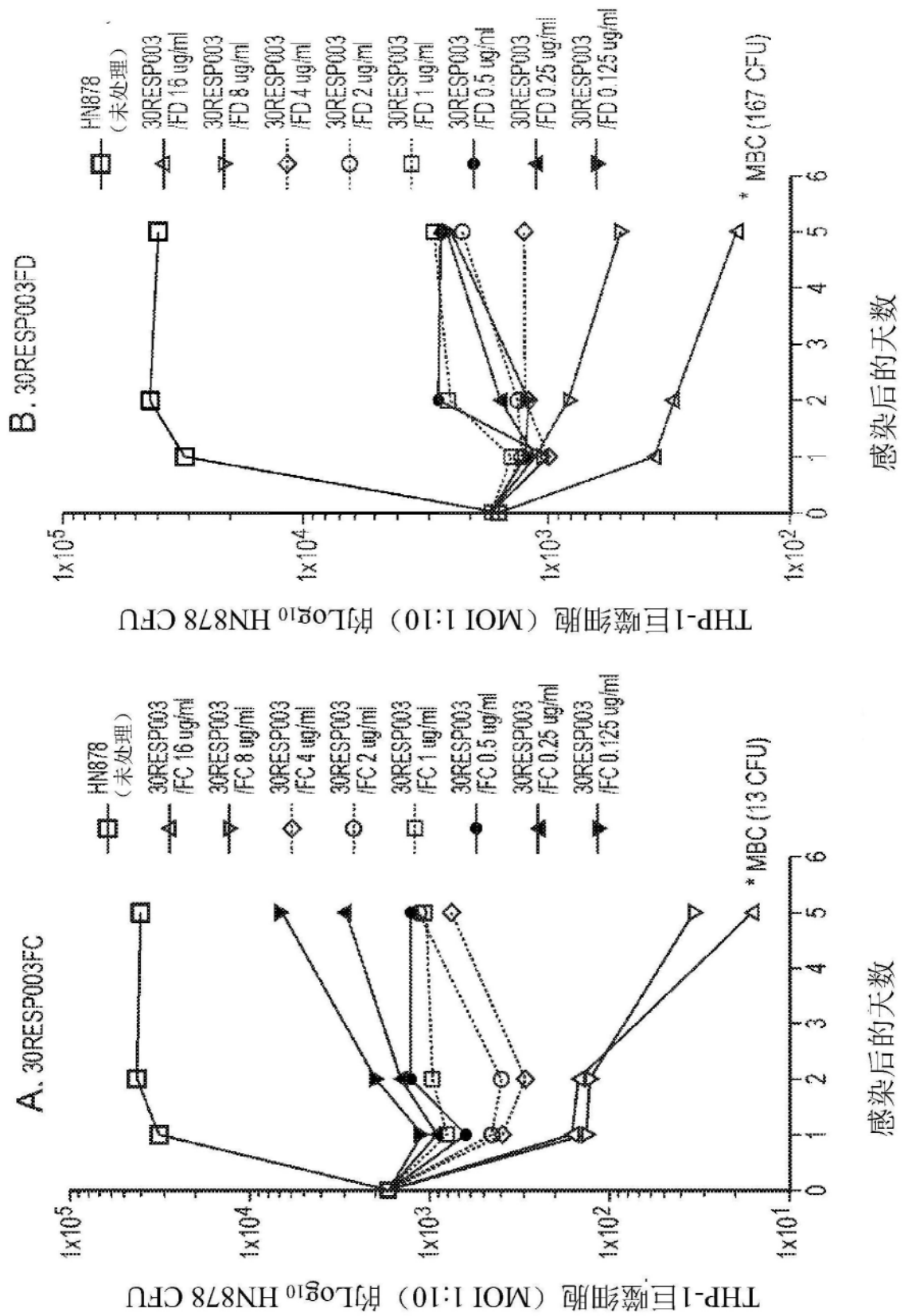


图26

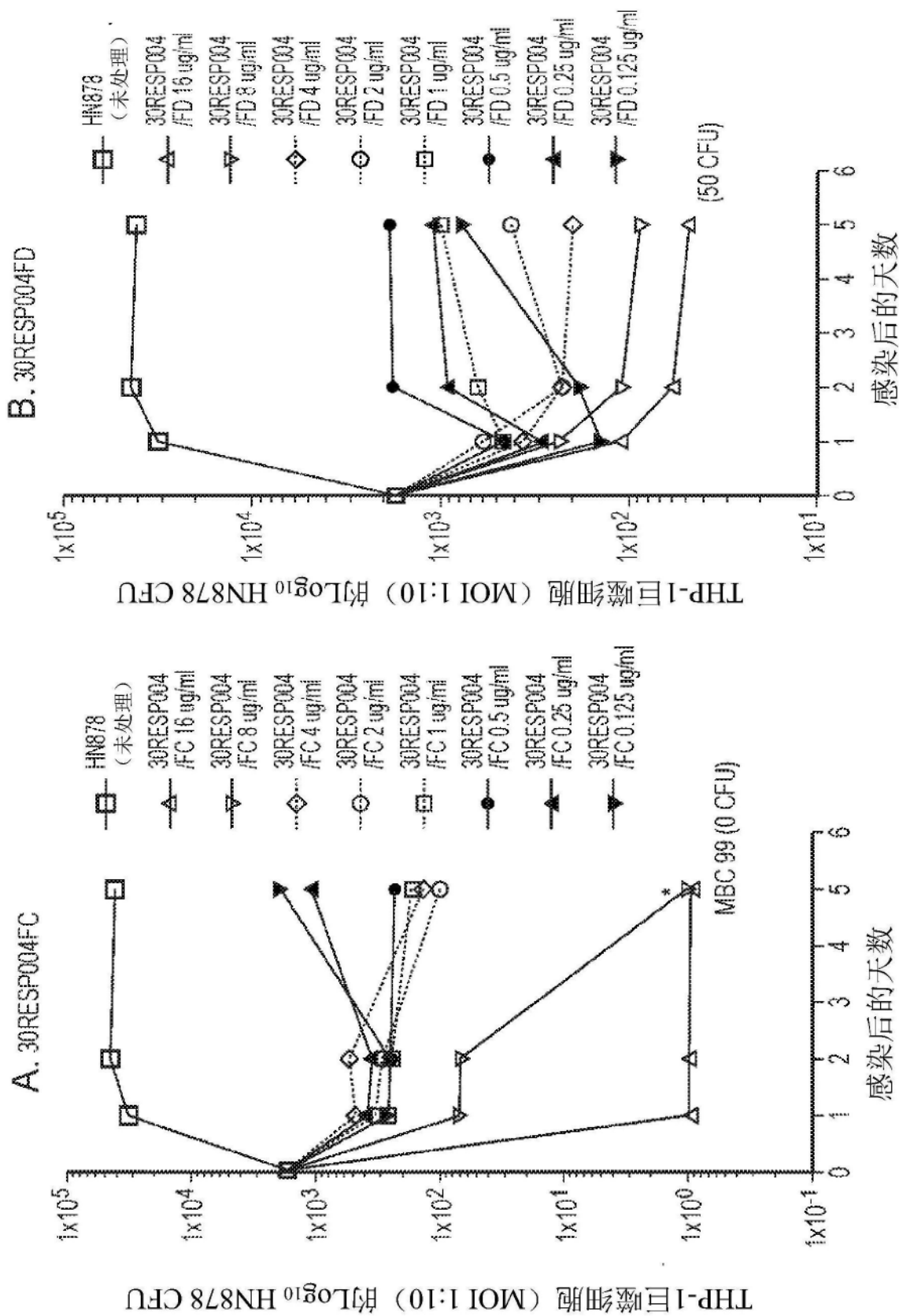
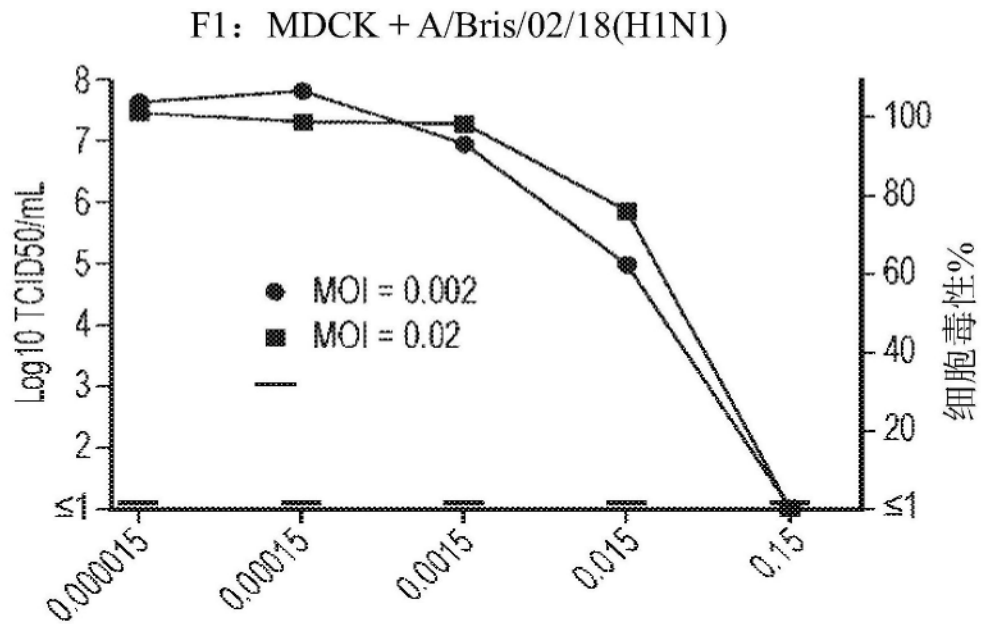


图27

(a)



(b)

亚硝酸盐 柠檬酸盐 甘露糖醇	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 (1μM)	病毒对照
MOI = 0.002 约 30PFU/30,000细胞					
LDH阳性对照的细胞 毒性% (3次LDH测定的 平均值, 24小时)	16%	0%	0%	0%	NA

图28

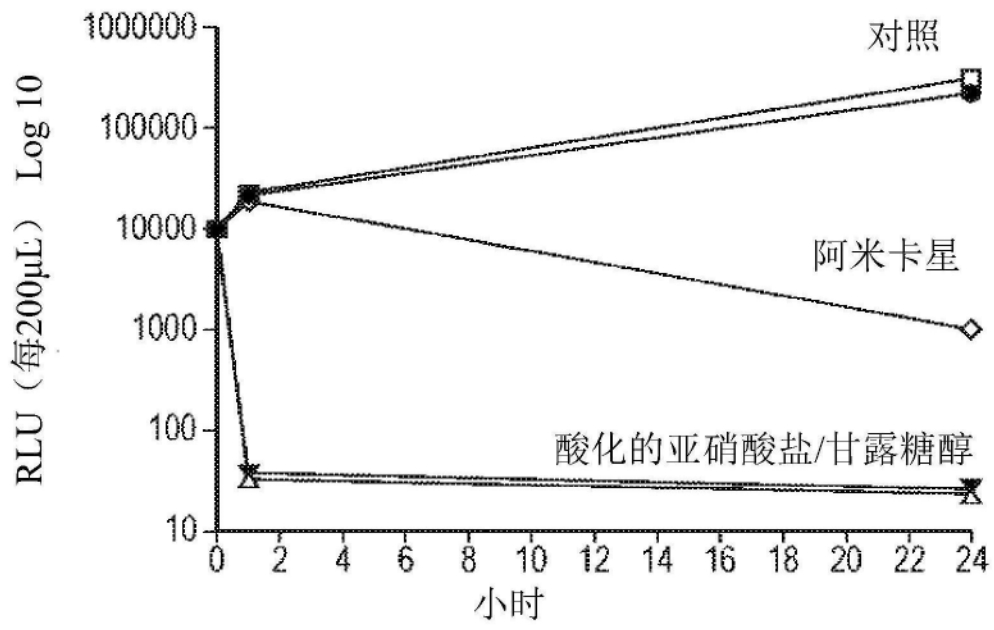


图29

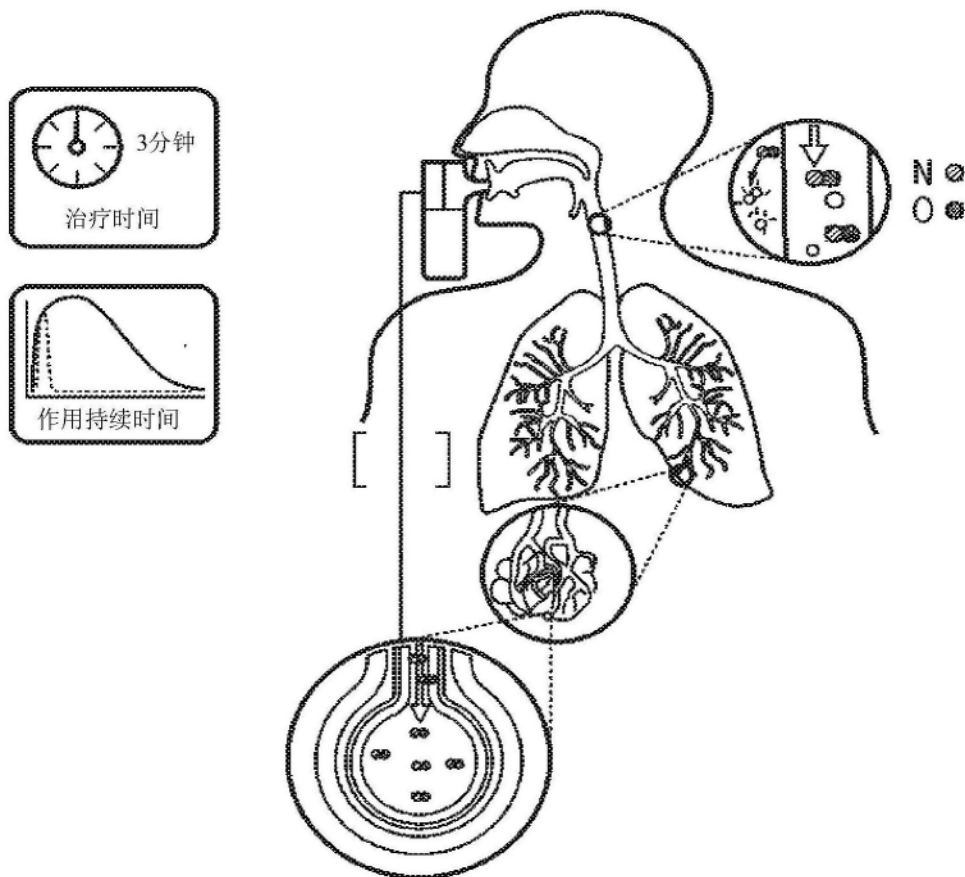


图30

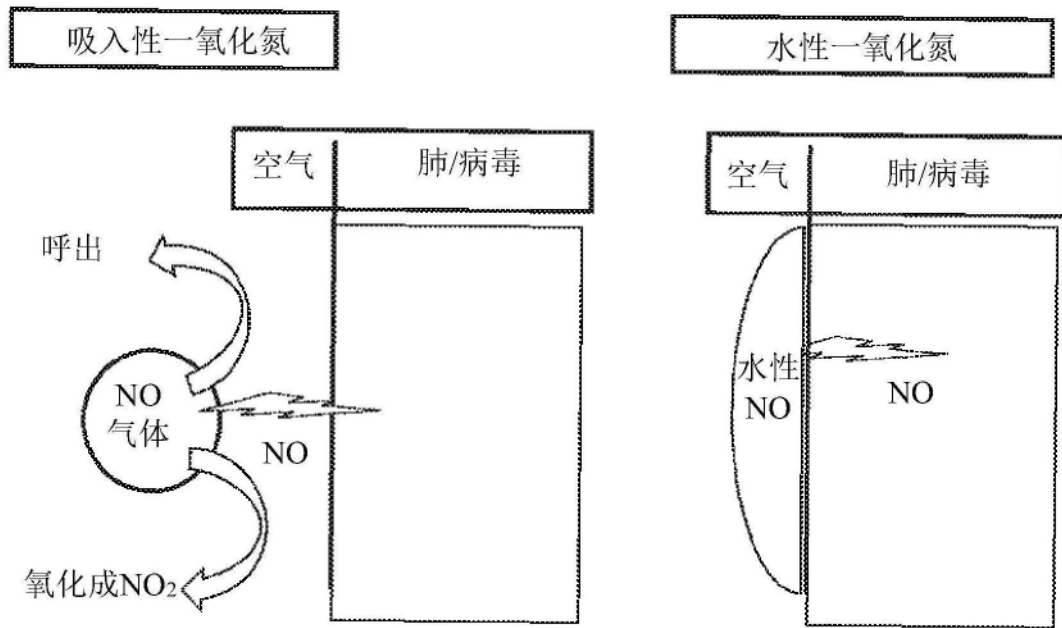


图31

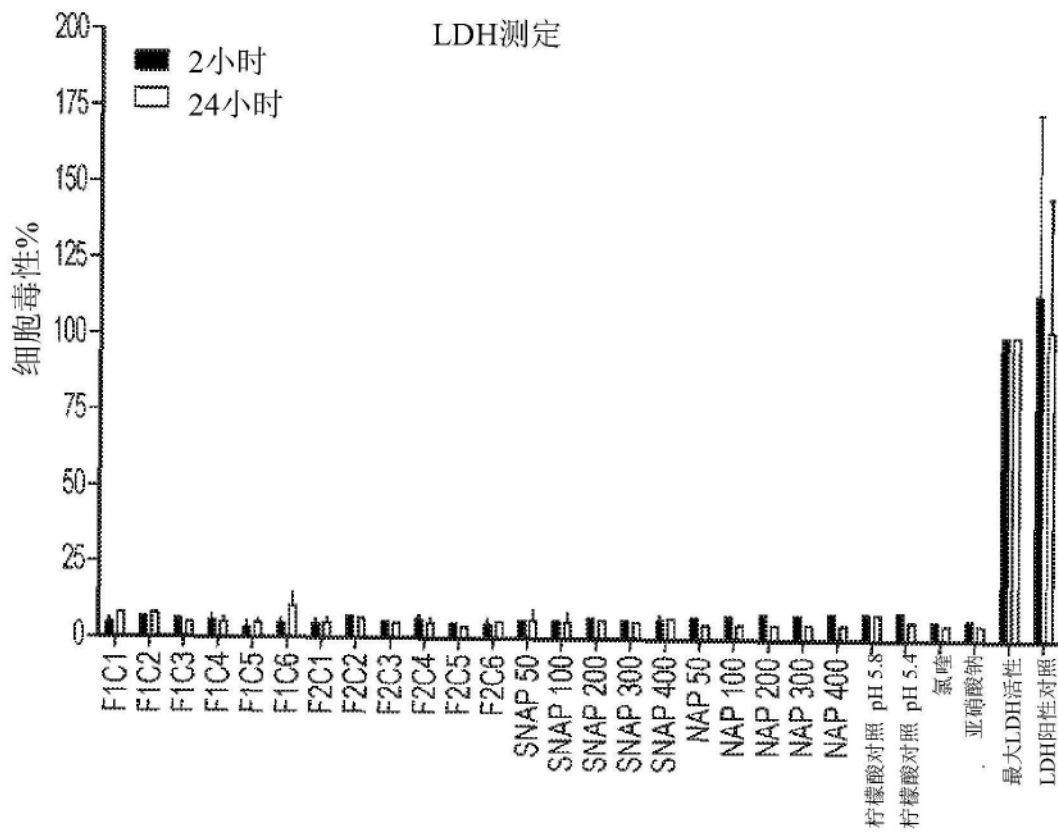


图32

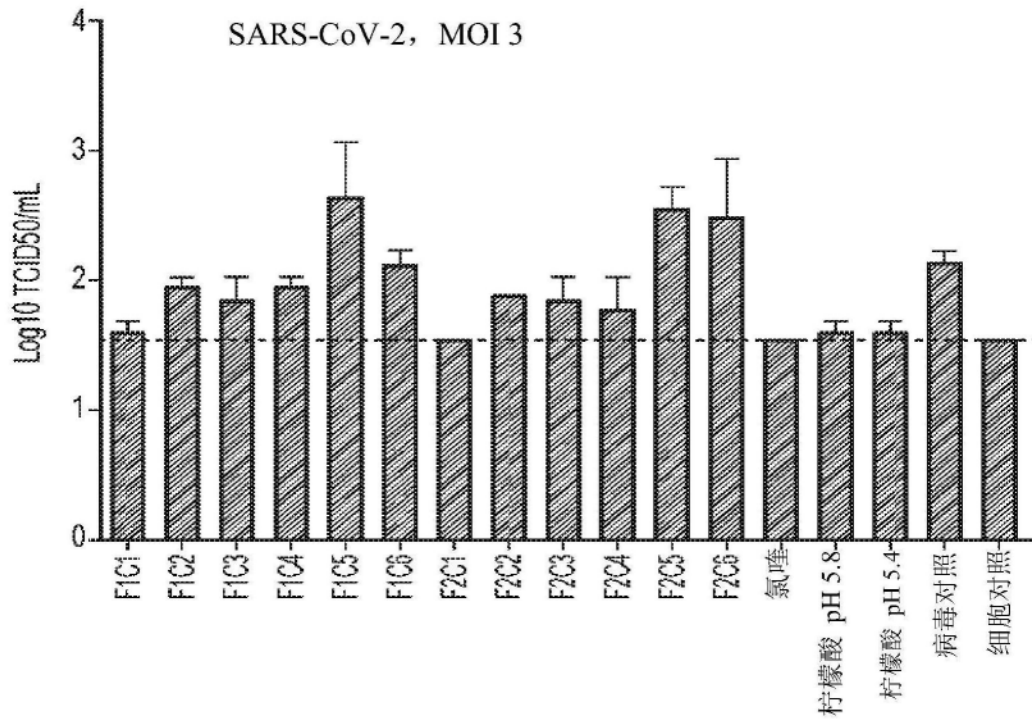


图33

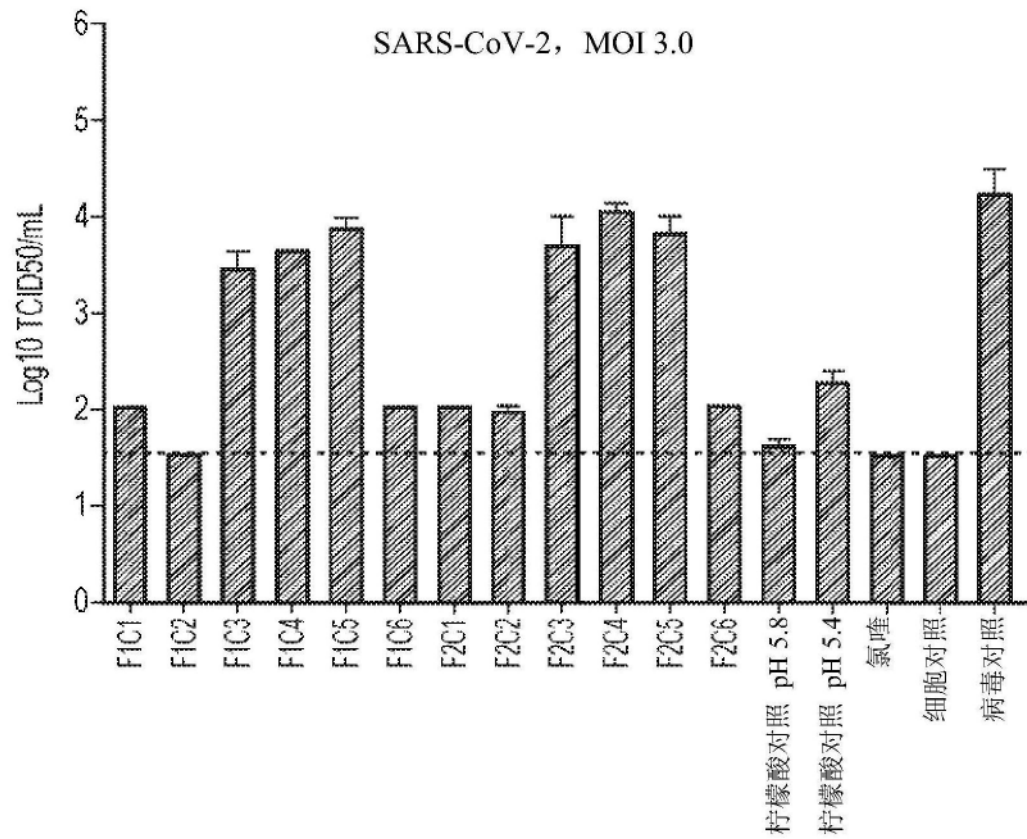


图34(a)

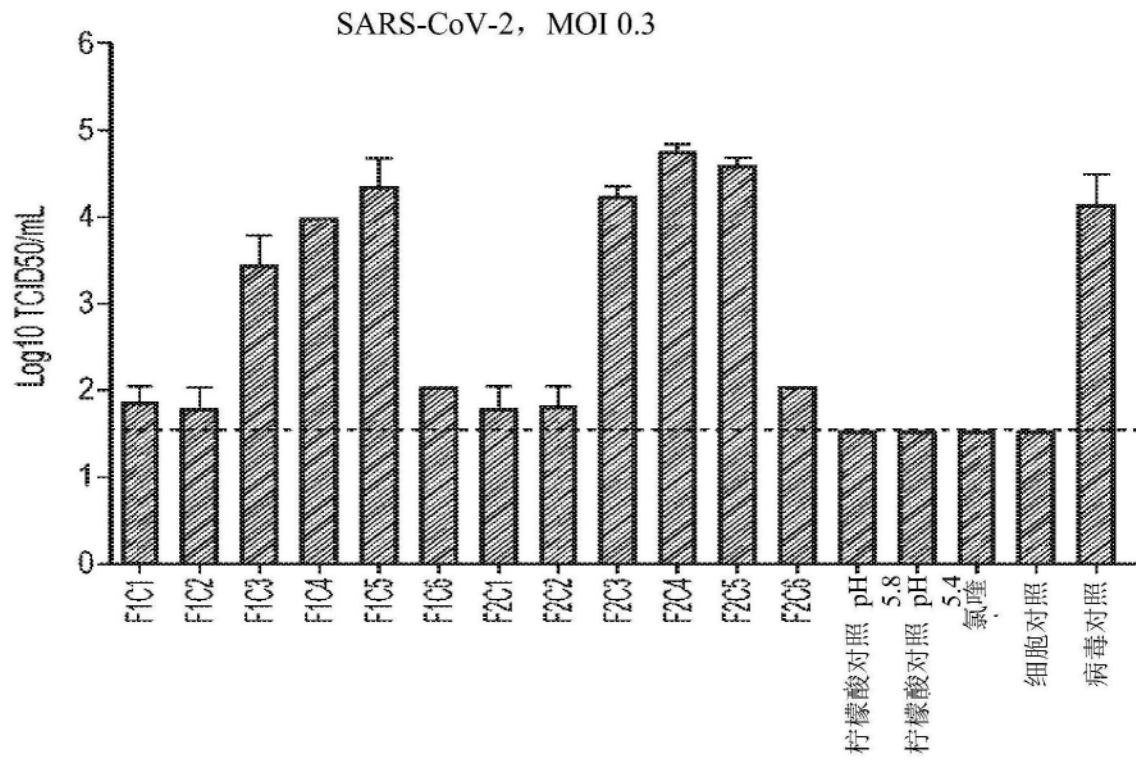


图34(b)

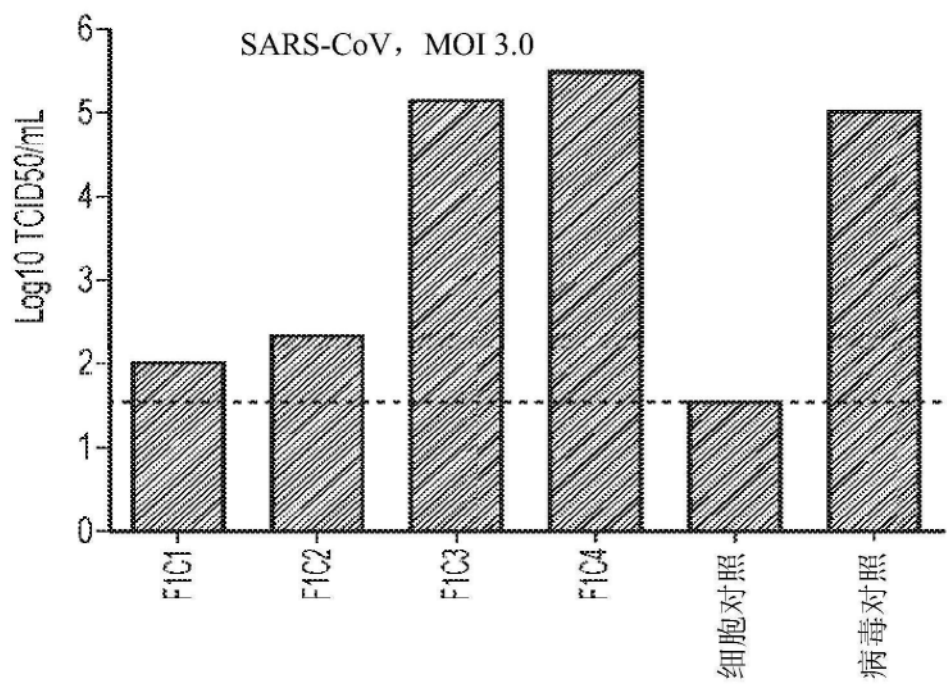


图35