



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1433314 B

(45) 授权公告日 2011.08.31

(21) 申请号 00818745.2

(22) 申请日 2000.12.29

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2002.07.31

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/US2000/035651 2000.12.29

(87) PCT申请的公布数据  
W001/49296 EN 2001.07.12

(73) 专利权人 密执安州立大学董事会  
地址 美国密执安

(72) 发明人 J·R·小贝克 T·哈姆达 A·史  
M·安德尔杰

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 唐晓峰

(51) Int. Cl.  
A61K 31/665(2006.01)

(56) 对比文件

GB 1321579 A, 1973.06.27, 实施例 2, 说明书第 1 页第 2 栏第 64 - 65 行.

US 5549901 A, 1996.08.27, 说明书第 1 - 2 栏.

CN 1159158 A, 1997.09.10, 权利要求 6、9.

审查员 黄轶洁

权利要求书 2 页 说明书 55 页 附图 42 页

(54) 发明名称

抗菌组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及用于降低与不同致病生物体及病毒有关的感染、发病率和死亡率的一种组合物及方法。本发明同时还涉及用于净化被繁殖或被致病生物体或病毒感染的区域的方法和组合物。而且,本发明还涉及用于降低致病生物体对食物的感染的方法和组合物。具体的说,通过将致病生物体与一种含有油类、有机溶剂及分散于水相中的表面活性剂的水包油纳米乳液相接触以降低致病生物体引起的感染、发病率和死亡率。

1. 一种含有水包油乳液的组合物,所述水包油乳液含有 1) 不连续油相;2) 水相;3) 乙醇;4) 表面活性剂,其中所述的表面活性剂不是甘油酯;和 5) 一种含卤化合物。
2. 权利要求 1 的组合物,其中所述水相含有水。
3. 权利要求 1 的组合物,其中所述水相含有磷酸盐缓冲盐水。
4. 权利要求 1 的组合物,其中所述油相含有一种植物油。
5. 权利要求 4 的组合物,其中所述植物油选自大豆油、鳄梨油、亚麻油、椰油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、低芥酸菜籽油、玉米油、菜籽油、红花油和葵花油。
6. 权利要求 1 的组合物,其中所述油相含有选自鱼油、调味油、水不溶性维生素和矿物油的油。
7. 权利要求 1 的组合物,其中所述水包油乳液含有 30-90 体积%的油相。
8. 权利要求 1 的组合物,其中所述水包油乳液含有 50-80 体积%的油相。
9. 权利要求 1 的组合物,其中所述表面活性剂含有一种聚山梨醇酯表面活性剂。
10. 权利要求 9 的组合物,其中所述聚山梨醇酯表面活性剂选自 TWEEN 20、TWEEN 40、TWEEN 60 和 TWEEN 80。
11. 权利要求 1 的组合物,其中所述表面活性剂含有一种苯氧基聚乙氧基乙醇。
12. 权利要求 11 的组合物,其中所述苯氧基聚乙氧基乙醇选自 TRI TON X-100、X-301、X-165、X-102 和 X-200。
13. 权利要求 11 的组合物,其中所述苯氧基聚乙氧基乙醇包括 TYLOXAPOL。
14. 权利要求 1 的组合物,其中所述表面活性剂包括十二烷基硫酸钠。
15. 权利要求 1 的组合物,其中所述含卤化合物包括氯化鲸蜡基吡啶**鎊**。
16. 权利要求 1 的组合物,其中所述含卤化合物选自卤化鲸蜡基吡啶**鎊**、鲸蜡基三甲基卤化铵、卤化鲸蜡基二甲基乙铵、卤化鲸蜡基二甲基苄铵、卤化鲸蜡基三丁基磷**鎊**、月桂基三甲基卤化铵、肉豆蔻基三甲基卤化铵、鲸蜡基三甲基氯化铵、鲸蜡基苄基二甲基氯化铵、溴化鲸蜡基吡啶**鎊**、溴化鲸蜡基三甲铵、溴化鲸蜡基二甲乙铵、溴化鲸蜡基三丁基磷**鎊**、月桂基三甲基溴化铵和肉豆蔻基三甲基溴化铵。
17. 权利要求 1 的组合物,其中所述乳液进一步包括一种磷酸酯基的溶剂。
18. 权利要求 17 的组合物,其中所述磷酸酯基的溶剂包括磷酸三丁酯。
19. 一种制备水包油乳液的方法,包括乳化混合物,所述混合物包含 1) 油;2) 水性溶液;3) 乙醇;4) 表面活性剂,其中所述的表面活性剂不是甘油酯;和 5) 含卤化合物。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述油选自大豆油、鳄梨油、亚麻油、椰油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、低芥酸菜籽油、玉米油、菜籽油、红花油和葵花油。
21. 权利要求 19 的方法,其中所述油选自鱼油、调味油、水不溶性维生素和矿物油。
22. 权利要求 19 的方法,其中所述含卤化合物选自卤化鲸蜡基吡啶**鎊**、鲸蜡基三甲基卤化铵,卤化鲸蜡基二甲基乙铵,卤化鲸蜡基二甲基苄铵,卤化鲸蜡基三丁基磷**鎊**、月桂基三甲基卤化铵、肉豆蔻基三甲基卤化铵、鲸蜡基三甲基氯化铵、氯化鲸蜡基吡啶**鎊**、鲸蜡基苄基二甲基氯化铵、溴化鲸蜡基吡啶**鎊**、溴化鲸蜡基三甲铵、溴化鲸蜡基二甲乙铵、溴化鲸蜡基三丁基磷**鎊**、月桂基三甲基溴化铵和肉豆蔻基三甲基溴化铵。

23. 权利要求 19 的方法,其中所述混合物进一步包括一种磷酸酯基溶剂。
24. 一种保护或者净化非活性客体区域的方法,包括将所述区域暴露于一种组合物中,该组合物含有水包油乳液,所述水包油乳液含有 1) 不连续油相;2) 水相;3) 乙醇;4) 表面活性剂,其中所述的表面活性剂不是甘油酯;和 5) 含卤化合物。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述区域包括固体表面。
26. 权利要求 24 的方法,其中所述区域包括医学装置的表面。
27. 权利要求 24 的方法,其中所述区域包括溶液。
28. 权利要求 24 的方法,其中所述区域包括食品。

## 抗菌组合物及其使用方法

[0001] 以下申请是 2000 年 4 月 28 日提出的美国申请 No. 09/561, 111 的部分延续申请, 该申请又是 1999 年 12 月 30 日提出的美国申请 No. 09/474, 866 的部分延续申请, 以上每一申请均以 1999 年 4 月 28 日提出的美国临时申请 No. 60/131, 638 为优先权申请。以上每一申请在此整体并入本文参考。本发明部分地在由美国政府援助的工作下进行, 该工作为 DARPA 的 No. MDA972-97-1-0007 项目。政府拥有本发明某些权利。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及用于降低与各种病原体有关的感染性、发病率及死亡率的组合物和方法。本发明同样还涉及用于净化被病原体和微生物繁殖或感染的区域、样本、溶液和食物的方法和组合物。

### [0003] 发明背景

[0004] 病原体, 诸如细菌、真菌、病毒和细菌孢子是很多人类、动物疾病以及食品和生物学及环境学样本被污染的主要原因。微生物引起的动物感染的第一步是皮肤或粘膜大规模的粘联或移生, 之后传染性微生物侵入并广泛散播。致病细菌的入侵通道主要是皮肤和粘膜。

[0005] 具体的说, 杆菌属细菌能形成稳定的孢子以对抗严峻的条件和极端的温度。农田感染上炭疽杆菌将会导致驯养动物、农业和野生动物感染上致命的疾病 (参见例如, Dragon 和 Rennie, *Can. Vet. J.* 36 :295[1995])。人类通常通过接触感染的动物或者感染的动物制品而染上这种微生物 (参见例如, Welkos 等, *Infect. Immun.* 51 :795[1986])。人类的临床并发症包括快速发作的肺形式, 通常是致命的症状。炭疽胃肠道和皮肤形式的并发症, 虽然发作不快, 但是会导致死亡, 除非经激烈的治疗 (参见例如, Franz 等, *JAMA* 278 :399[1997]; 和 Pile 等, *Arch. Intem. Med.* 158 :429[1998])。由于有效的动物控制, 包括疫苗、抗生素和适当丢弃感染的牲畜, 使得人类患杆菌炭疽感染变得不再普遍。然而, 由于净化土壤和农场的困难, 动物的炭疽感染仍然是严重的问题。此外, 生物武器和 / 或恐怖分子的袭击也导致了人类的感染。

[0006] 即使能得到一种能用于阻止炭疽菌种的炭疽疫苗 (参见例如, Ivins 等, 疫苗 13 :1779[1995]), 不同炭疽菌株的繁殖上的混合就能使得疫苗失效 (参见例如, Mobley, *Military Med.* 160 :547[1995])。炭疽孢子作为生物武器使用的结果可从前苏联军事微生物实验室偶然泄漏炭疽杆菌的事故中得到见证。77 例人类炭疽感染中, 其中 66 例死亡, 这都与该事故有关。一些炭疽感染发生在离实验室 4 公里远的地方 (参见例如, Meselson 等, *Science* 266 :1202[1994])。对感染者的整体分析揭示他们感染了多种炭疽杆菌菌株或一种菌株的遗传学变种 (参见例如, Jackson 等, *Proc. Nat. Acad. of Sci. U. S. A.* 95 :1224[1998])。

[0007] 另外, 据报道, 杆菌属中的其他菌类也是导致人类许多疾病的病原试剂。蜡状芽孢杆菌是一种常见病原体。它与食物传染疾病有关, 因为它的孢子在烹饪条件下仍能存活下来。它还与局部败血症、创伤及全身感染疾病有关 (参见例如, Drobniewski, 临床微生物研

究 6 :324[1993])。许多细菌正变得能耐受抗生素。生物体一旦感染了耐抗生素的菌株后,便面临着严重及潜在的威胁生命的后果。

[0008] 具耐药性的细菌的例子包括经常导致致命感染的葡萄球菌属、导致肺炎和脑膜炎的肺炎双球菌、导致腹泻的沙门氏菌和大肠杆菌及导致血流、外科创伤和尿道感染的肠球菌(参见例如, Berkelman et. al., J. Infct. Dis. 170(2) :272[1994])。

[0009] 尽管有着巨大的进步, 抗生素和抗微生物疗法面临着许多问题, 尤其当不同的菌株具有抗生素耐药性的时候。另外, 消毒剂 / 杀虫剂(例如, 次氯酸钠, 甲醛和苯酚) 虽然能有效对抗杆菌孢子, 却并不适合用于净化环境、设备或伤亡情况。这是因为其毒性会导致组织坏死, 且其挥发性气体的吸入将导致肺损伤的缘故。这些化合物腐蚀性特点使得它们同样也不适合用于净化敏感性设备(参见例如, Alasri 等, Can. J. Micro. 39 :52[1993]; Beauchamp 等, Crit. Rev. Tox. 22 :143[1992]; Hess 等, Amer. J. dent. 4 :51[1991]; Lineaweaver 等, Arch. Surg. 120 :267[1985]; Morgan, Tox. Path. 25 :291[1997]; 和 Russell, 临床微生物 3 :99[1990])。

[0010] A 型流感病毒是常见的呼吸系统病原体, 其广泛用体外作模型体系用以体外测试抗病毒试剂(参见例如, Karaivanova 和 Spiro 生物化学杂志 329 :511[1998]; Mammen 等, 医学化学杂志 38 :4179[1995]; 和 Huang 等, FEBS Letters 291 :199[1991]), 及体内测试(参见如, Waghorn 和 Goa, 药物 55 :721[1998]; Mendel 等, 抗微生物剂化疗 42 :640[1998]; 和 Smith 等, 医学化学杂志 41 :787[1998])。确定病毒亚型的抗原特异性的包膜糖蛋白, 血细胞凝集素(HA) 和神经氨酸苷酶(NA) 非常容易改变, 而使得病毒能巧妙的躲避中和抗体。现用抗病毒化合物和神经氨酸苷酶抑制剂效果不显著, 而且普遍存在着病毒耐药性。

[0011] 明确的说, 我们需要能够降低与病原体暴露有关的感染、患病率和死亡率的抗病原体组合物及方法。所述组合物和方法优选不含有导致微生物耐药性的特性及对服药者有毒等这些我们所不希望的特性。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及用于降低与不同病原体有关的感染、患病率及死亡率的组合物和方法。本发明同样还涉及净化被病原体繁殖或被病原体和微生物感染的区域、样本、溶液和食物。所述组合物的某些实施方案是无毒的, 且能被人和其它动物安全的服用。另外, 本发明的某些实施方案是化学稳定且不被污染的。

[0014] 在一些实施方案中, 本发明提供了适宜治疗暴露于病原体或者受其威胁的动物, 包括人的组合物和方法。在一些实施方案中, 动物在暴露于致病生物体前, 先与有效量的组合物接触。在其它实施方案中, 动物在暴露于致病生物体后, 与有效量的组合物接触。因此, 本发明注重于预防和治疗微生物感染。

[0015] 在其它实施方案中, 本发明提供了适于净化溶液和表面, 包括暴露于病原体或可能含有病原体的有生命和无生命的样本的组合物和方法。在另一些本发明的实施方案中, 组合物还用来阻止在生物学或环境学样本中的有害或不希望的微生物的生长。

[0016] 在优选的实施方案中, 通过将致病微生物与一种水包油纳米乳液相接触以降低其引起的感染、患病率及死亡率, 所述水包油纳米乳液含有油相、水相和至少一种其他组分。在一些优选的实施方案中, 乳液进一步的含有一种溶剂。在一些优选的实施方案中, 溶剂包括一种有机磷酸酯溶剂。在其它实施方案中, 有机磷酸酯基的溶剂包括含有磷酸二烷基酯

或磷酸三烷基酯（例如，磷酸三丁酯）。在另一些优选的实施方案中，所述乳液进一步的含有一种醇。在优选使用溶剂的实施方案中，溶剂存在于组合物的油相中。

[0017] 在一些实施方案中，本发明的组合物还含有一种或多种表面活性剂或洗涤剂。在一些实施方案中，表面活性剂是一种非阴离子洗涤剂。在优选的实施方案中，所述非阴离子洗涤剂是聚山梨醇酯表面活性剂。在其它实施方案中，所述非阴离子洗涤剂是聚乙二醇醚。本发明表面活性剂包括但不限于表面活性剂例如 TWEEN、TRITON 及 TYLOXAPOL 族的化合物。

[0018] 在某些其它实施方案中，本发明的组合物进一步的含有一种或多种阳离子含卤化合物，包括但不限于氯化鲸蜡基吡啶鎓。在另一些实施方案，本发明的组合物还含有一种或多种能促进或加强某些微生物，尤其是某些细菌孢子的萌发（“萌发增强子”）的化合物。新组合物制剂所使用的萌发增强子包括但不限于，L- 丙氨酸，肌苷， $\text{CaCl}_2$ ，和  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，等等。在进一步的实施方案中，本发明的组合物还含有一种或多种能增加所述组合物与微生物之间相互作用的化合物（“相互作用增强剂”）（例如，缓冲剂中含有乙二胺四乙酸或亚乙基双（氧化乙烯次氨基）四乙酸等螯合剂）。另外，在另一些本发明的实施方案中，所述制剂还含有着色剂或调味剂（例如，着色剂和薄荷油）。

[0019] 在一些实施方案中，所述组合物进一步含有一种乳化剂以辅助形成乳液。乳化剂包括能聚集在油 / 水界面以形成一种阻止两种液滴之间直接接触的连续薄膜的化合物。在某些本发明的实施方案中特征性的水包油乳液组合物很容易在水中稀释成所需浓度，同时又不削弱其抗病原体活性。

[0020] 除了将油相不连续的分散到水相中，水包油乳液可含有其它的脂质结构，例如微型脂质体（例如，脂质球，其通常含有一些中间被水相层互相分离的同心脂质双分子层）、胶团（例如，两性分子聚集在 50-200 分子量的微型分子聚集体中，其极性端基朝向外部水相，极性尾部藏于远离水相的聚集体内部）或层状相（脂质分散体，其中每一微粒中含有平行的被水薄膜分离的两性双分子层）。

[0021] 形成这些脂质结构的原因是疏水力将非极性残基（例如，长烃链）推离于水。所述脂质制剂可广义的表述为表面活性剂脂质制剂 (SLPs)。SLPs 对粘膜的毒性低，且据信在小肠内代谢（参见例如，Hamouda 等，传染病杂志 180 :1939[1998]）。与消毒剂如漂白剂相反，SLPs 对于塑料和金属没有腐蚀性。由此，本发明基于 SLPs 的制剂可特别的用于对抗细菌、真菌、病毒和其它病原体。

[0022] 本发明某些实施方案阐述了降低微生物（例如，致病性物质）感染的方法，包括将病原体与含水包油乳液的组合物相接触。在某些实施方案中，乳液形式是油相均匀分布于含表面活性剂的水相中，所述油相包括一种有机磷酸酯基的溶剂和一种载体油。在一些实施方案中，将病原体暴露于两种或更多种的不同乳液中。在优选的实施方案中，乳液能导致融合和 / 或导致溶解。在优选的实施方案中，方法中使用的油相包括一种非磷酸酯基的溶剂（例如，一种醇类）。

[0023] 在特定的实施方案中，接触足够的时间以杀灭致病性物质或抑制致病物质的生长。在其它实施方案中，本发明提供了一种净化含有害或不期望的病原体的环境学表面的方法。在一项这样的实施方案中，致病性物质与环境表面有关，所述方法包括将环境样本与足以净化表面的量的所述组合物相接触。有时，净化不一定已经杀灭了全部的病原体。在

一些实施方案中,所述组合物及方法还包括着色剂、涂料和其它标记及辨别化合物以保证处置表面已经用本发明的组合物完全的处置干净。

[0024] 在某些实施方案中,动物用本发明组合物在内部处置。在某些实施方案中,接触经真皮内部、皮下、肌内或腹腔注射。在其它实施方案中,接触通过口服、鼻部、颊腔、直肠、阴道或局部给药。当所述组合物以药物给药时,该组合物还应含有药学可接受的辅料、赋型剂、稳定剂、稀释剂等等。在进一步的实施方案中,本发明组合物进一步含有附加的药学可接受的生物活性分子(例如,抗体、抗生素、核酸转染工具、维生素,矿物质、辅助因子等)。

[0025] 在某些实施方案中,本发明提供一种组合物,其含有一种水包油乳液,所述水包油乳液所含不连续的油相均匀分散于水相中,其中第一组分包括一种醇类或甘油,第二组分包括一种表面活性剂或一种含卤化合物。水相可含有任意类型的水相,包括但不限于,水(例如,  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ , 蒸馏水、自来水)和溶液(例如,磷酸盐缓冲的盐水溶液)。油相可含有任一类型的油类,包括但不限于,植物油(例如,大豆油、鳄梨油、亚麻油、椰油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、低芥酸菜籽油、玉米油、菜籽油、红花油和葵花油),动物油(例如,鱼油),调味油,水不溶性维生素,矿物油,和机油。在某些实施方案中,油相含有 30-90 体积%的水包油乳液(即,最终乳液总体积的 30-90%),更优选 50-80%。然而,本发明不限于所述醇组分的性质,在某些实施方案中,醇可以是乙醇或甲醇。此外,本发明并不限于所述表面活性剂性质,在某些实施方案中,表面活性剂是聚山梨醇酯表面活性剂(例如, TWEEN 20, TWEEN 40, TWEEN 60 及 TWEEN 80)、苯氧基聚乙氧基乙醇(例如, TRITONX-100, X-301, X-165, X-102 及 X-200, 和 TYLOXAPOL)或十二烷基硫酸钠。同样,本发明不限于所述含卤化合物,在某些实施方案中,含卤化合物包括一种卤化鲸蜡基吡啶鎓,鲸蜡基三甲基卤化铵,卤化鲸蜡基二甲基乙铵,卤化鲸蜡基二甲基苄铵,卤化鲸蜡基三丁基磷鎓,月桂基三甲基卤化铵,肉豆蔻基三甲基卤化铵,氯化鲸蜡基吡啶鎓,鲸蜡基三甲基氯化铵,鲸蜡基苄基二甲基氯化铵,溴化鲸蜡基吡啶鎓,溴化鲸蜡基三甲铵,溴化鲸蜡基二甲乙铵,溴化鲸蜡基三丁基磷鎓,月桂基三甲基溴化铵,或肉豆蔻基三甲基溴化铵。

[0026] 所述乳液还可含有第三、第四、第五等组分。在某些实施方案中,附加组分是表面活性剂(例如,一种第二表面活性剂),一种萌发增强子,一种磷酸酯基的溶剂(例如,磷酸三丁酯),一种 neutramingen, L 丙氨酸,氯化铵,胰腺豆腺培养液,酵母提取物, L- 抗坏血酸,卵磷脂,对羟基苯甲酸甲酯、硫代硫酸钠、柠檬酸钠,肌苷,氢氧化钠,右旋糖,和聚乙二醇(例如, PEG 200, PEG 2000 等。))。

[0027] 本发明同时还提供制备每种此文中所述乳液的方法。例如,本发明提供了一种制作水包油乳液的方法,包括乳化一种混合物,所述混合物含有一种油相、一种水性溶液,包括一种醇或甘油的第一组分,包括表面活性剂或含卤化合物的第二组分。

[0028] 本发明进一步的提供用以保护(例如,保护免受微生物污染)或净化一片区域(例如,通过除去区域中微生物或降低微生物数量以净化区域)的方法,包括将区域暴露于含水包油乳液(例如,任一文中所述的水包油乳液)的组合物中。该方法可用于任一类型的区域中。例如在一些实施方案中,该区域包括一种固体表面(例如,一种医学装置)、一种溶液、生物体的表面(例如,人类的外部或内部部分)或一种食品。

[0029] 本发明同时还给出了修改所述乳液的方法,包括:提供乳液,向乳液加入或从中除去一组合分以制备一种修改乳液。在一些实施方案中,该方法进一步包括用生物学测试法

测定修改乳液的方法（例如，抗微生物测试来判定乳液降低处置区域微生物数量的效果）。本发明同时还给出了商业使用修改乳液的方法。例如在一些实施方案中，该方法进一步含有售卖修改乳液广告和 / 或售卖修改乳液的方法。

[0030] 本发明同样还提供了含传输系统的体系（例如，一种容器、分配器、包装等等），其含有所述任一含有水包油乳液。本发明进一步的包括一种将物料与任一所述水包油乳液相接触的体系。本发明不限于物料与乳液相接触的特性。例如，物料包括但不限于，医学装置、溶液、食品、洗涤产品、机油、霜剂和生物学材料（例如，人体组织）。

## 附图说明

[0031] 以下附图是本说明书的一部分，用以进一步的阐明本发明的某些方面和实施方案。在一张或多张附图与所述特定实施方案说明相结合作为参考时，人们能更好的理解本发明。

[0032] 图 1 描述了本发明乳液对蜡状芽孢杆菌孢子的杀菌效果

[0033] 图 2A- 图 2C 描述了本发明乳液对蜡状芽孢杆菌孢子杀菌效果的细菌涂片。

[0034] 图 3 描述了本发明乳液不同稀释液对炭疽杆菌孢子的杀孢子活性。

[0035] 图 4 描述了本发明乳液和漂白剂在一段时间内杀孢子活性的比较。

[0036] 图 5 描述了本发明乳液和漂白剂在一段时间内杀孢子活性的比较。

[0037] 图 6 描述了在介质中，本发明乳液的不同稀释液对不同炭疽杆菌孢子的杀孢子活性。

[0038] 图 7 描述了本发明乳液对由 Del Rio, TX 得到的炭疽杆菌的杀孢子活性的时间过程。

[0039] 图 8 记录了大肠杆菌的电子显微图 (10, 000X)。

[0040] 图 9 记录了经 BCTP 处置的大肠杆菌的电子显微图 (10, 000X)。

[0041] 图 10 记录了经  $W_{80}8P$  处置的大肠杆菌的电子显微图 (10, 000X)。

[0042] 图 11 记录霍乱弧菌的电子显微图 (25, 000X)。

[0043] 图 12 记录了经  $W_{80}8P$  处置的霍乱弧菌的电子显微图 (25, 000X)。

[0044] 图 13 记录了经 BCTP 处置的霍乱弧菌的电子显微图 (25, 000X)。

[0045] 图 14 记录了用  $X_8W_{60}PC$  处理的霍乱弧菌的电子显微图 (25, 000X)。

[0046] 图 15 描述了 BCTP、 $W_{80}8P$  和  $X_8W_{60}PC$  对 A 型流感病毒活性的影响。

[0047] 图 16 描述 BCTP 对四种不同杆菌菌种的杀孢子活性与  $X_8W_{60}PC$  对两种杆菌菌种杀孢子活性的比较。BCTP 显示在对蜡状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌的孢子处置 4 小时后具有显著的杀孢子活性，但对枯草芽孢杆菌孢子没有显著效果。 $X_8W_{60}PC$  在 4 小时内能有效的杀灭蜡状芽孢杆菌且对耐 BCTP 的枯草芽孢杆菌也具有杀孢子活性。

[0048] 图 17 描述纳米乳液对蜡状芽孢杆菌的杀孢子活性的时间过程。与 BCTP 1 : 100 稀释液培养 4 小时后能杀灭 95% 的孢子。与  $X_8W_{60}PC$  1 : 1000 稀释液仅需培养 30 分钟即能杀灭 95%。

[0049] 图 18 记录了蜡状芽孢杆菌孢子用 BCTP 处置前和处置后的电子显微图片。注意，在用 BCTP 处置之前皮层有均匀的密度和清晰明确的孢子膜。用 BCTP 处置孢子 4 小时后，孢子膜和皮层都破裂了，同时伴有核内物质的缺失。

[0050] 图 19 描述了 BCTP 1 : 100 稀释液杀孢子活性中的萌发抑制和激动的影响。BCTP 杀孢子活性在 10mM D-丙氨酸 (萌发抑制剂) 存在下发生延迟, 在 50  $\mu$ M L-丙氨酸和 50  $\mu$ M 肌苷 (萌发激动剂) 存在下得到加速。

[0051] 图 20A-图 20F 记录了皮下注射不同的 BCTP 和蜡状芽孢杆菌孢子结合剂的动物的整体和组织学照片。图 20A 和图 20B 描述了单独注射 1 : 10 稀释的 BCTP 的动物情况。图片中没有整体的组织损伤, 组织学观察也没有炎症状况。图 20C 和图 20D 描述了单独皮下注射  $4 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子的动物情况。图中有平均 1.68cm<sup>2</sup> 的大面积的坏死。该区域的组织学显示皮肤和真皮包括皮下脂肪和肌肉组织基本坏死。图 20E 和图 20F 记录了将  $4 \times 10^7$  杆菌孢子与 BCTP 纳米乳液快速预混合到最终浓度为 1 : 10, 再注射到小鼠的情况。这些动物显示有较轻的皮肤病灶, 平均面积约为 0.02cm<sup>2</sup> (与未处置的孢子感染相比降低了大约 98% 的坏死面积)。图 20F 中的组织学显示有一些炎症, 然而大多数表皮肤和真皮中的细胞结构保持完好。所有组织病理学情况以 4 倍放大。

[0052] 图 21A-图 21F 记录了具有感染蜡状芽孢杆菌孢子的试验伤口的动物整体和组织学照片。图 21A 和图 21B 记录被  $2.5 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子感染但未处置的小鼠试验性伤口情况。创伤的组织学检测显示了扩大化的坏死和明显的炎症。图 21C 和图 21D 记录了小鼠伤口被  $2.5 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子感染, 并在 1 小时后用盐水冲洗的情况。48 小时后, 伤口周围的坏死区域的平均面积为 4.86cm<sup>2</sup>。另外, 该组中 80% 的动物由于感染而死亡。这些坏死的组织学表明皮肤和真皮全部坏死且其中含有大量的杆菌。图 21E 和图 21F 记录了小鼠伤口被  $2.5 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子感染, 并在 1 小时后用 1 : 10 稀释的 BCTP 冲洗的情况。在伤口附近有小面积的坏死 (0.06cm<sup>2</sup>), 与进行孢子和盐水冲洗处置的动物相比, 坏死面积降低了 98%。另外, 只有 20% 的动物由于伤口感染而死亡。这些伤口的组织学显示没有本发明不同乳液的一些特定的实施方案中描述的杆菌。

[0053] 图 22 描述了表面活性剂脂质制剂对 A 型流感病毒传染的抑制。图 22A 表示的是 BCTP、W<sub>80</sub>8P、SS 和 NN; 图 22B 表示的是 BCTP 和 SS。病毒与 SLPs 培养 30 分钟, 随后稀释覆盖于细胞上。使用 ELISA 测试法测量对 A 型流感病毒传染的抑制。每一数据点表示 3 项重复试验中的平均值 +/- 一项标准差。

[0054] 图 23 描述了与 TRITON X-100 相比, BCTP 作为一种抗 -A 型流感病毒试剂的效果。A 型流感病毒用 BCTP、磷酸正三丁酯 /TRITON X-100/ 大豆油 (TTO)、TRITON X-100/ 大豆油 (TO)、及单独用 TRITON X-100 (T) 处置 30 分钟。所有处置中使用的 TRITON X-100 浓度都是一样的。A 型流感病毒的抑制效果用细胞 ELISA 测定法测量。每一数据点表示 3 项重复试验中的平均值 +/- 一项标准差。

[0055] 图 24 显示 BCTP 不能影响腺病毒的传染性。腺病毒载体 (AD. RSVntlacZ) 用三种稀释度的 BCTP 处置 30 分钟, 随后转染至 293 细胞中。5 天以后进行  $\beta$ -半乳糖苷酶测试。每一数据点表示 8 项重复试验中的平均值 +/- 一项标准差。

[0056] 图 25 描述了 A 型流感病毒和腺病毒在电子显微镜下的结构。病毒未经处置或用 1 : 100 稀释的 BCTP 在室温下培养 15 和 60 分钟, 再用如实施例所述的电子显微镜显影操作。图 25A 描述未处置的 A 型流感病毒; 图 25B 描述与 BCTP 培养 15 分钟的 A 型流感病毒; 图 25C 描述未处置的腺病毒; 图 25D 描述与 BCTP 培养 60 分钟的腺病毒。所有的影像放大数 = 200,000X。棒条为 200nm。

[0057] 图 26 描述 1% 和 10% BCTP 的抗细菌性质。杀菌效果 (% 杀灭) 用以下公式计算：  
[0058]

$$\frac{\text{cfu(初始)} - \text{cfu(处理后)}}{\text{cfu(初始)}} \times 100$$

[0059] 图 27 描述了经斑点数降低测定法测定的 10% 和 1% BCTP 的抗病毒性质。

[0060] 图 28 描述本发明的乳液适用的示例性生物体。

[0061] 图 29 描述本发明乳液组合物的一些特定的实施方案及所述乳液的某些用途。

[0062] 图 30 描述本发明乳液组合物的一些特定的实施方案及所述乳液的某些用途。

[0063] 图 31 如图记录了不同的常用制剂和本发明某些实施方案的使用方法。图 31A 显示在本发明纳米乳液 10%、1% 和 0.10% 不同稀释液处置下大肠杆菌数量的对数下降情况。图 31B 显示在本发明纳米乳液 10%、1% 和 0.10% 不同稀释液处置下, 枯草芽孢杆菌孢子数量的对数下降情况。图 31C 显示在本发明纳米乳液 10%、1% 和 0.10% 不同稀释液处置下, A 型流感病毒 (pfu/ml) 数量的对数下降情况。

[0064] 图 32s 显示在 40°C 下用含 EDTA 的本发明乳液处置的鼠伤寒杆菌数量的对数下降情况。

[0065] 图 33 显示在 50°C 下用含 EDTA 的本发明乳液处置的鼠伤寒杆菌数量的对数下降情况。

[0066] 图 34 显示与其非乳化成分相比, 本发明乳液的溶菌效果。

[0067] 图 35 在室温和 37°C 下本发明乳液处置的偶发分枝杆菌数量的对数下降情况。

[0068] 图 36 记录了使用本发明乳液净化一表面的数据。

[0069] 定义

[0070] 为了便于理解本发明, 现将诸多术语与短语定义如下:

[0071] 本文中所述的术语“微生物”是指显微可见的生物体和属于藻类、细菌、真菌 (包括地衣)、原生动物门、病毒和亚病毒剂类的分类上相关的肉眼可见的生物体。术语“微生物”包括本身致病和导致另一生物体 (例如动物, 包括人; 和植物) 患病的生物体, 和, 能产生导致另一生物体患病的物质, 但其本身并不直接致病或者直接感染其他生物体的生物体。本文中所述的术语“病原体”和其同义词, 是指一种生物体, 其包括能导致另一种生物体 (例如, 动物和植物) 患病的微生物, 或, 产生能使另一种生物体患病的物质的微生物 (例如, 产生致病毒素的细菌等)。

[0072] 本文中所述的术语“疾病”是指与属种成员正常或者平均水平的偏离, 其在对属种中大多数个体无害的情况下但对受感染个体有害的情况 (例如, 腹泻、恶心、发烧、疼痛和炎症等)。与微生物和 / 或病原体相接触可引起或导致疾病。

[0073] 此处所使用的术语“宿主”或“目标物”, 指用本发明的组合物进行处置的生物体。此类生物体包括易被一种或多种病原体侵害, 或者可能是容易被其侵害的生物体。此类生物体还包括用于避免不希望的病原体侵害而对其进行处置的生物体。生物体包括但不限于动物 (例如, 人、驯养动物、野生动物) 和植物。

[0074] 本文中所述的术语“灭活”及其同义词, 意为具有消灭、去除或者降低病原体对宿主的感染和 / 或在宿主中引起病理学反应的能力。

[0075] 本文中所述的术语“导致融合的”意指一种能与微生物物质 (例如, 细菌或细菌孢

子)的膜相融合的乳状液。特定的导致融合的乳状液的例子包括但不限于,在美国专利号 5,618,840 ;5,547,677 和 5,549,901 中记载的 W<sub>80</sub>8P 以及在美国专利号 5,700,679 记载的 NP9,每一文献在此整体共同引入作为参考。NP9 是一种支链聚(氧-1,2ethaneolyl), $\alpha$ -(4-nonyl phenal)- $\omega$ -羟基-表面活性剂。不限于如下所述,NP9 和其他的可用于本发明的表面活性剂记载在美国专利 5,662,957 的表 1 中,在此其整体合并作为参考。

[0076] 本文中所述的术语“生成溶素的”指一种具有分裂微生物物质(例如,细菌或细菌孢子)的膜的能力的乳状液。一种示例性的生成溶素的组合物是 BCTP。在本发明的优选实施方案中,一种生成溶素试剂和一种导致融合的试剂同时存在于同一组合物中,将产生比两者单独使用更强的灭活效果。使用了此种改良抗菌组合物的方法和组合物将在此详细叙述。

[0077] 在此使用的术语“乳液”,包括水包油分散体或者小滴,以及其它的脂性结构,该结构能够形成一种所需的疏水力量,当不可与水混合的油相与水相混合时,其能从水中除去极性残留物(例如,碳氢化合物长链)及除去朝向水的极性端基。上述其它的脂性结构包括但不限于,单室脂质体、极少室脂质体(paucilamellar)和多室脂质体、胶团和层状相。类似的,此处使用的术语“纳米乳液”是指含有微小脂质结构的水包油分散体。例如在优选的实施方案中,该纳米乳液含有其小滴的平均粒度约为 0.5-5 微米的油相。此处经常使用的术语“乳液”和“纳米乳液”,使用中可互相交换,是指本发明的纳米乳液。

[0078] 本文中所述的术语“相接触”和“暴露”是指将一种或多种本发明的组合物与病原体或可抵抗病原体的样本相接触,以使本发明的组合物可以灭活微生物或者致病性物质,如有可能(if present)。本发明注重于将公开的组合物以足够体积和/或浓度的量与病原体或微生物相接触以灭活病原体或微生物。

[0079] 术语“表面活性剂”是指任一下述分子,其具有一极性端基,可以极其适于用水溶解;还具有一疏水性尾部,不能很好的溶于水。术语“阳离子表面活性剂”是指具有阳离子端基的表面活性剂。术语“阴离子表面活性剂”是指具有阴离子端基的表面活性剂。

[0080] 术语“洒亲水-亲脂平衡系数”及“HLB 系数”指将表面活性剂分子化学结构与其表面活性相结合关联的一种指标。HLB 系数可以使用一系列经验公式进行计算,该公式如 Meyers 所描述(Meyers,表面活性剂科学和技术,VCH 出版公司,纽约,231-245 页[1992]),在此引入作为参考。如此处所使用的,表面活性剂的 HLB 系数是记载在 McCutcheon's 卷 1:乳化剂和洗涤剂,北美出版社,1996(在此引入作为参考)中分配给表面活性剂的 HIB 系数。HLB 系数从 0 至约 70 或着,商用表面活性剂中更高。具有高水溶性和增溶特性的亲水性表面活性剂可达到该范围的较高端值;而具有低水溶性,又是一种优良的油中水加溶剂的表面活性剂则在该范围值的较低端。

[0081] 本文中所述的术语“萌发增强子”描述化合物作用于增强某种菌株(例如,L-氨基酸[L-丙氨酸],CaCl<sub>2</sub>,肌苷等)的萌发。

[0082] 本文中所述的术语“相互作用增强剂”描述化合物作用于增强乳液与细菌(例如,革兰氏阴性菌)细胞壁的相互作用。我们所注重的相互作用增强剂,包括但不限于螯合剂(例如,乙二胺四乙酸[EDTA],亚乙基双(氧化乙烯次氨基)四乙酸[EGTA],等等)和某种生物学试剂(例如,牛血清蛋白[BSA]等等)。

[0083] 术语“缓冲剂”指在向溶液加入时,能使溶液抵制 pH 值改变的物质。

[0084] 术语“还原剂”和“电子供体”指能向第二物质贡献电子以降低一种或多种第二物质的原子的氧化状态的物质。

[0085] 术语“一价盐”是指其金属（例如，Na, K, 或 Li）在溶液中具有净 1+ 电荷（即质子比电子多一个）的任一盐。

[0086] 术语“二价盐”是指其金属（例如，Mg, Ca, 或 Sr）在溶液中具有净 2+ 电荷的任一盐。

[0087] 术语“螯合剂”指物质中具有一个以上的原子各拥有一对可用于结合金属离子的孤电子对的任一的物质。

[0088] 术语“溶液”是指一种水性的或非水的混合物。

[0089] 本文中所述的术语“治疗剂”是指能降低被致病微生物所感染的宿主感染、发病、或死亡的发生率或者防止被致病微生物所感染的宿主感染、发病或者死亡的发生率的组合物。这些治疗剂可附加地含有药学可接受的化合物（例如，辅料、赋型剂、稳定剂、稀释剂等等）。在一些实施方案中，本发明所述之治疗剂可以局部乳液、可注射组合物、可食用溶液的形式给药等等。当采用局部途径给药时，其制剂形式可以是，例如乳液、软膏、油膏或者喷雾剂。

[0090] 此处使用的术语“药物可接受的”或者“药理学可接受的”，指当向宿主（例如，动物或人）给药时，基本上不引起不良的过敏反应或免疫学反应的组合物。此外，在某些实施方案中，本发明的组合物可制成园艺和农用的形式，包括浸剂、喷雾剂、种子包裹物、茎秆注射剂、茎秆喷雾剂和雾剂。“药物可接受的载体”包括任意及所有的溶剂、分散介质、包衣剂、湿润剂（例如，十二烷基硫酸钠），等渗体和吸收延滞剂、崩解剂（例如，马铃薯淀粉或甘醇酸淀粉钠）等等。

[0091] 本文中所述的术语“局部”是指将本发明的组合物应用于皮肤表面和粘膜细胞及组织（例如，牙槽、颊腔、舌部、咀嚼部位或鼻粘膜和其他的具有中空结构的器官和体腔的组织和细胞）。

[0092] 本文中所述的术语“局部活性剂”是指可在宿主的应用（接触）部位产生药理学反应的本发明组合物。

[0093] 本文中广泛使用的术语“系统性活性药物”意指一种物质或组合物，其能在远离给药位点或者进入宿主产生药理学反应。

[0094] 本文中所述的术语“医学装置”包括任一在治疗（例如，用于疾病或者损伤的）期间用在病人身体上、病人身体内或者经过病人体内的物料和设备。医学装置包括但不限于，医学植入物、创伤护理装置、药物给药装置和体腔及个人保护装置。医学植入物包括但不限于，导尿管、血管导管、透析分流器、创伤引流管、皮肤缝合线、血管移植物、可植入网孔、眼内装置、心瓣膜等等。创伤护理装置包括但不限于，常规创伤敷料、生物移植材料、带状止血剂 (tape closures) 和敷料，及外科切割用的布帘 (surgical incise drapes)。药物给药装置包括但不限于，针头、给药用皮肤贴片、给药用粘膜贴片和医用海面。体腔和个体保护装置，包括但不限于，塞子、海面、外科和检测用手套及牙刷。生育控制装置包括但不限于，子宫内置装置 (IUD)、隔膜和男用避孕套。

[0095] 本文中所述的术语“提纯”是指将污染物或者不期望存在的化合物从样本或者组合物中除去。本文中所述的术语“基本提纯”是指从样本或者组合物中除去了大约 70 到

90%，最多 100% 污染物或者不期望存在的化合物。

[0096] 本文中术语“表面”应理解为其广义。一方面，该术语是指能与本发明组合物接触的生物体或无生命物质（例如，载体、营造物和食品处理装置等）的最外部的边界（例如，对于动物：皮肤、毛发和毛皮等，对于植物：叶子、茎秆、花朵部分和果实等）。另一方面，该术语同样也指动物或者植物体内通过一系列经皮给药途径（例如，注射、摄取、透皮给药、吸入等等）而与组合物相接触的内膜和内表面（例如，对于动物：消化道、脉管组织等等，对于植物：脉管组织等）。

[0097] 本文中术语“样本”取其广义。一方面，其指一种动物细胞或者组织。另一方面，其包括任一来源的样品或者培养物，例如生物学样本和环境样本。生物学样本可以得自于植物或动物（包括人），还包括流体、固体、组织和和气体。环境样本包括环境物料例如表面物质、土壤、水和工业样本。上述例子不能认为是用以限制本发明适用的样本类型。

[0098] 发明详述

[0099] 本发明包括用于降低与一系列微生物和致病生物体有关的感染、发病率和死亡率的组合物和方法。本发明同样涉及用于净化被致病生物体繁殖或者感染的区域的方法和组合物。此外，本发明涉及用于降低食物中致病物质感染能力的方法和组合物。在优选的实施方案中，降低致病生物体的感染能力、发病率和死亡率是通过用水包油组合物接触致病生物体实现的，该水包油组合物含有水相和油相，及至少一种其他化合物。本发明特定例证性的具体实施方案在下文有所描述。本发明不仅限于所述特定的实施方案。详细的描述分成如下章节：I) 示例性组合物；II) 示例性制备技术；III) 特性及活性；IV) 使用方法和 V) 特定实施例。

[0100] I. 示例性组合物

[0101] 在优选的实施方案中，本发明的乳液含有 (i) 水相；(ii) 油相；和至少一种附加化合物。在本发明的一些实施方案中，我们将所述附加化合物可混合于组合物的水相或油相中。在其它实施方案中，将所述附加化合物混合入之前油相和水相已经乳化的组合物中。在某些实施方案中，将一种或多种附加化合物在使用之前迅速混合入现有的乳液组合物中。在其它实施方案中，将一种或多种附加化合物在组合物立即使用之前混合入现有的乳液组合物。

[0102] 适用于本发明的组合物的附加化合物包括但不限于一种或多种有机的，更特别的，有机磷酸基的溶剂、表面活性剂和洗涤剂、阳离子含卤化合物、萌发增强子、相互作用增强剂、食品添加剂（例如调味剂、甜味剂、膨化剂等等）和药物可接受的化合物。特定的种用于本发明组合物的化合物的示例性实施方案将在下文中叙述。

[0103] A. 水相

[0104] 在某些优选的实施方案中，乳液含有约 5-60，优选 10-40，更优选 15-30%（体积）的水相，以乳液的总体积计。在优选的实施方案中，水相含有水 pH 约为 4-10，优选约 6-8。当本发明的乳液中含有一种萌发增强子时，pH 优选 6-8。水优选去离子水（下文指“ $\text{DiH}_2\text{O}$ ”）。在一些实施方案中，水相中含有磷酸盐缓冲的盐水（PBS）。在用于为消耗和接触的所用的本发明的这些实施方案中，宿主、水相和在水相中的任一附加化合物可进一步地灭菌或者灭除热原物质。

[0105] B. 油相和溶剂

[0106] 在某些优选的实施方案中,本发明乳液中的油相(例如,载体油)含有 30-90,优选 60-80,和更优选 60-70%(体积)的油类,以乳液的总体积计。适宜的油类包括但不限于大豆油、鳄梨油、亚麻油、椰油、棉籽油、角鲨烯油、橄榄油、低芥酸菜籽油、玉米油、菜籽油、红花油、葵花油、鱼油、调味油、水不溶性维生素及其混合物。在特别优选的实施方案中,使用的是大豆油。附加的可用的油类包括机油、矿物油、和黄油。在本发明的优选实施方案中,油相优选分散于水相中,以平均粒度在约 1-2 微米之间,更优选 0.2-0.8,和首选约 0.8 微米的液滴形式存在。在其它实施方案中,水相可以分散在油相中。

[0107] 在一些实施方案中,油相含有 3-15,优选 5-10%(体积)的有机溶剂,以乳液的总体积计。当本发明不限于任一特定的机理时,乳液中的有机磷酸基的溶剂应主要用于去除或者破坏病原体膜的脂质。因此,能去除微生物膜中的固醇或磷脂的任一溶剂在本发明的乳液中都是可用的。适宜的有机溶剂包括但不限于,有机磷酸酯基溶剂或醇类。在优选的实施方案中,有机磷酸酯基的溶剂包括但不限于,以任何形式结合的磷酸二烷基酯、磷酸三烷基酯(例如,正磷酸三丁酯 [TBP])。在某些实施方案中特别优选的磷酸三酯包括正磷酸三丁酯,它是一种增塑剂。此外,在一优选的实施方案中,磷酸二酯或者三酯中的每一烷基具有 1 到 10 或者更多的碳原子,更优选 2 到 8 个碳原子。同样,本发明的磷酸二酯或者三酯中的每一烷基可以是或者可以不是相同的。在某些实施方案中,可以使用不同磷酸烷基酯和磷酸三酯的混合物。在那些以一种或多种醇作为溶剂的实施方案中,所述溶剂包括但不限于,甲醇、乙醇、丙醇和辛醇。在一个特别优选的实施方案中,使用的是乙醇。在本发明的这些用于消耗或者接触的实施方案中,宿主、油相和油相中任一附加化合物,可以进一步的灭菌或者除去热原。

#### [0108] C. 表面活性剂和洗涤剂

[0109] 在一些实施方案中,本发明的组合物还含有一种或多种表面活性剂或洗涤剂(例如,约 3-15%,优选约 10%)。当本发明不限于任一特殊的机理时,我们注意到组合物中使用表面活性剂将有助于组合物的稳定性。可用非离子(非-阴离子)和离子表面活性剂。另外,可从表面活性剂 BRIJ 族中寻找适用于本发明组合物的表面活性剂。表面活性剂可以水相或者油相的形式存在。适宜于同乳液一起使用的表面活性剂包括一系列的阴离子和非离子表面活性剂,以及其他能促进水包油乳液成形的成乳化合物。一般来说,成乳化合物是相对亲水的,成乳化合物的混合物可以用于使所需产品达到所需的性质。在某些制剂中,非离子表面活性剂要优于离子型乳化剂,因为其能在较广的 pH 范围内基本相容且比离子型(例如,皂类)乳化剂能形成更为稳定的乳液。由此,在某些优选的实施方案中,本发明的组合物含有一种或多种非离子表面活性剂,例如聚山梨醇酯表面活性剂(例如,聚氧乙烯醚),聚山梨醇酯洗涤剂,苯氧基聚乙氧基乙醇等等。本发明使用的聚山梨醇酯洗涤剂的例子包括但不限于,TWEEN 20、TWEEN 40、TWEEN 60、TWEEN 80 等。

[0110] TWEEN 60(聚氧乙烯脱水山梨醇单硬脂酸酯)、及 TWEEN 20、TWEEN40 和 TWEEN 80,含有的聚山梨醇酯,其作为乳化剂用于许多药物组合物。在本发明的一些实施方案中,所述化合物可与辅料一同用作合并组分。表面活性剂 TWEEN 还显示出对脂质包膜的病毒具有杀伤病毒的效果(参见例如,Eriksson 等,Blood Coagulation and Fibrinolysis 5(增补版.3):S37-S44 页 [1994])。

[0111] 本发明可用的苯氧基聚乙氧基乙醇和其聚合物的例子包括但不限于,

TRITON(例如, X-100、X-301、X-165、X-102、X-200), 和 TYLOXAPOL。TRITON X-100 是一种很强的非离子洗涤剂 and 分散剂, 其广泛用于从生物结构中提取脂质和蛋白质。其还具有杀病毒效果, 适用于广谱包膜病毒(参见例如, Maha 和 Igarashi, Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health 28:718[1997]; 和 Portoeala 等, Virologie 27:261[1976])。由于其抗病毒活性, 其被用于灭活新鲜冷冻的人血浆中的病毒(参见例如, Horowitz 等, 血液 79:826[1992])。

[0112] 在特别优选的实施方案中, 可使用表面活性剂 TRITON X-100(叔-辛基苯氧基聚乙氧基乙醇) 和 / 或 TYLOXAPOL。一些其他的实施方案, 使用的是杀精子剂(例如, 壬苯醇醚-9(Nonoxynol-9))。本发明的组合物可使用的附加表面活性剂和洗涤剂可从参考书中确定(例如, McCutcheon's 第 1 卷: 乳液和洗涤剂-北美版, 2000)。

[0113] 在一些实施方案中, 如图 28 所示, 含有表面活性剂和有机溶剂的组合物可用于灭活包膜病毒和革兰氏阳性菌。

[0114] D. 阳离子含卤化合物

[0115] 在一些实施方案中, 本发明的组合物还含有一种阳离子含卤化合物(例如, 约 0.5 to 1.0% 重量, 或更多, 以乳液的总重量为计)。在优选的实施方案中, 阳离子含卤化合物优选与油相预先混合; 然而, 应当理解, 阳离子含卤化合物可以与乳液组合物相结合的形式存在于不同的制剂中。适宜的含卤化合物可选自, 例如含氯、氟和碘离子的化合物。在优选的实施方案中, 适宜的阳离子含卤化合物包括但不限于, 卤化鲸蜡基吡啶鎓、鲸蜡基三甲基卤化铵、卤化鲸蜡基二甲基乙铵、卤化鲸蜡基二甲基苄铵、卤化鲸蜡基三丁基磷鎓、月桂基三甲基卤化铵, 或肉豆蔻基三甲基卤化铵。再一些特定的实施方案中, 适宜的阳离子含卤化合物含有但不限于, 氯化鲸蜡基吡啶鎓(CPC)、鲸蜡基三甲基氯化铵、鲸蜡基苄基二甲基氯化铵、溴化鲸蜡基吡啶鎓(CPB)、溴化鲸蜡基三甲铵(CTAB)、溴化鲸蜡基二甲乙铵、溴化鲸蜡基三丁基磷鎓、月桂基三甲基溴化铵、和肉豆蔻基三甲基溴化铵。在特别优选的实施方案中, 阳离子含卤化合物是 CPC, 虽然本发明的组合物并不限于用特定的含有阳离子的化合物来制得。

[0116] 在一些实施方案中, 向本发明的组合物乳液加入 1.0% 重量或者更多的含阳离子化合物可获得适用于灭活包膜病毒、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的组合物。

[0117] E. 萌发增强子

[0118] 在本发明的实施方案中, 组合物还含有一种或多种萌发增强化合物(例如, 约 1mM-15mM, 及更优选约 5mM-10mM)。在优选的实施方案中, 在制备乳液之前, 萌发增强化合物先存在于水相中。

[0119] 本发明强调, 当萌发增强子加入到所述组合物中时, 将增强组合物杀死孢子的能力。本发明进一步强调, 所述萌发增强子在近中性 pH(pH 6-8 之间, 和优选 7) 下启动杀孢子能力。所述中性 pH 乳液可用磷酸盐缓冲盐水(PBS) 稀释得到, 或者通过中性乳液的预制得到。组合物的杀孢子活力最优先在孢子开始萌发时起效。

[0120] 在特定的实施方案中, 证实了本发明的乳液具有杀孢子能力。当本发明不限于任一特定机理时, 我们相信乳液中导致融合的组分启动了萌发过程, 及, 在向营养型的逆转完成之前, 乳液中导致溶解的组分溶化了新萌发的孢子。这些乳液中的组分一致的使得易于被乳液破坏瓦解。萌发增强子的加入进一步的促进本发明的乳液的抗-杀孢子活性, 如, 在

杀孢子活性出现时,加速(萌发增强子)的加入。

[0121] 细菌内孢子和真菌孢子的萌发与代谢加快和对热及化学反应物的抵抗力降低有关。为了萌发,孢子必须感应环境是否能够足够的支持其增值和复制。氨基酸 L- 丙氨酸能刺激孢子的萌发(参见,如, Hills, J. Gen. Micro. 4 :38[1950]; 及 Halvorson 和 Church, Bacteriol. Rev. 21 :112[1957])。L- 丙氨酸和 L- 脯氨酸据报道能启动孢子的萌发(Yanagita, Arch Mikrobiol 26 :329[1957])。简单的  $\alpha$ -氨基酸,例如甘氨酸和 L- 丙氨酸,处于代谢的重要地位。 $\alpha$ -氨基酸的氨基转换作用或脱氨基作用产生了糖原或者酮原碳水化合物及代谢和生长所需的氮。例如,L- 丙氨酸的氨基转换作用或脱氨基作用产生了糖酵解代谢(Embden-Meyerhof-Pamas 循环)最终的产物——丙酮酸酯。丙酮酸酯脱氢酶复合物导引起的丙酮酸酯氧化反应产生了乙酰辅酶 A、NADH、 $H^+$ 和  $CO_2$ 。乙酰辅酶 A 是三羧酸循环(Kreb's 循环)的启动物质,该循环依次供应着线粒体的电子输送链。乙酰辅酶 A 是合成脂肪酸和合成固醇所需碳的最根本来源。简单  $\alpha$ -氨基酸能提供氮、 $CO_2$ 、萌发及随后的代谢活动所需的糖原和 / 或酮原等价物。

[0122] 在某些实施方案中,本发明适宜的萌发增强剂包括但不限于,  $\alpha$ -氨基酸,包括甘氨酸和丙氨酸左旋对映体、缬氨酸、白氨酸、异白氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸及其烷基酯。氨基酸对于萌发过程的其他资料可参见美国专利号 5, 510, 104, 此处以其整体形式合并作为参考。在一些实施方案中,也可使用葡萄糖、果糖、天冬酰胺、氯化钠(NaCl)、氯化铵( $NH_4Cl$ )、氯化钙( $CaCl_2$ )和氯化钾(KCl)的混合物。在本发明特别优选的实施方案中,制剂中含有萌发增强子 L- 丙氨酸、 $CaCl_2$ 、肌苷和  $NH_4Cl$ 。在一些实施例中,组合物中还含有一种或多种以普通形式存在的生长介质,其自身附加含有或者不含有萌发增强子和缓冲剂(例如,胰酪胨培养液,等等)。

[0123] 上述化合物仅是示例性的萌发增强子,应当理解,其他已知的萌发增强子也可用于本发明的组合物。本发明的组合物中可用的萌发增强子必须符合两项标准:其必须能与本发明的乳液相混合,及,当其与本发明的乳液混合时能加速靶孢子的萌发速度。本领域技术人员可以通过如下方式判断一种特定试剂是否具有可以作为萌发增强子的功能:将该试剂与本发明组合物相结合作用于靶物质,及将所得的灭活效果与不使用该试剂时,将本发明的组合物的混合体施用于靶物质时引起的灭活效果相比较。任一种能加速萌发,且因此降低或者抑制生物体生长的试剂可以认为是适用于本发明的增强子。

[0124] 在其它实施方案中,向中性乳液组合物中加入萌发增强子(或,生长介质)产生了一种除能对付包膜病毒,革兰氏阴性菌、和革兰氏阳性菌之外还能对付细菌孢子的组合物。

#### [0125] F. 相互作用增强剂

[0126] 在其它实施方案中,本发明的组合物含有一种或多种能增强组合物与靶病原体(例如,革兰氏阴性菌、如弧菌、沙门氏菌、志贺氏菌和假单胞菌的细胞壁)相互作用的化合物(即,“相互作用增强剂”)。在优选的实施方案中,相互作用增强剂优选与油相相混合;然而,在其他的实施方案中,相互作用增强剂在乳化作用之后以与组合物相结合的形式施用。在某些优选的实施方案中,相互作用增强剂是一种螯合剂(例如,存在于缓冲剂[例如, tris 缓冲剂]中的乙二胺四乙酸[EDTA]或亚乙基双(氧化乙烯次氨基)四乙酸[EGTA])。应当理解螯合剂仅是示例性的相互作用增强化合物。事实上,其他能加强本发明的组合物与微生物和 / 或病原体相互作用的化合物也可以使用。在特别优选的实施方案中,相互作

用增强剂的浓度约为 50 至约 250M。本领域技术人员可以通过如下方法判断一种特定的试剂是否具有作为相互作用增强剂使用的功能：将该试剂和本发明的组合物结合施用于一靶物质，及将靶物质的灭活情况与在不含该试剂时，向靶物质施用本发明组合物时的情况相比较。与不含该物质时的情况参数相比较，任一种能增强相互作用及因此降低或抑制细菌生长的试剂可以作为相互作用增强剂使用。

[0127] 在一些实施方案中，向本发明的组合物中加入相互作用增强剂能产生出适用于处置包膜病毒、某些革兰氏阳性菌和某些革兰氏阴性菌的组合物。

[0128] II. 示例性制剂

[0129] 如下所述，在章节 A 中，本发明描述了制备所述组合物的常用制剂的的示例性工艺。另外，在章节 B 中，本发明记载了一组特殊的，也是示例性的制剂（如下所述）。

[0130] A. 制剂工艺

[0131] 本发明的灭活病原体的水包油乳液可使用标准乳液制备工艺进行制备。简单的说，在相对较高的剪切力下搅拌混合物油相和水相（例如，使用高速的水力和机械力）以获得一种含有油滴的水包油乳液，所含油滴的粒径为大约 0.5 到 5 微米，优选 1-2 微米。形成乳液的油相水相的混合体积基本上在约 1 : 9-5 : 1 范围，优选约 5 : 1-3 : 1，首选 4 : 1，油相：水相。油相和水相可用任一能产生足以形成乳液的剪切力的设备进行混合，例如 French Presses 或高速剪切混合器（如，经 FDA 认证的高速剪切混合器，可从 Admix, Inc, Manchester, NH 购得）。生产所述乳液的方法可见于美国专利号 5, 103, 497 和 4, 895, 452，中，此处共同引入作为参考。

[0132] 在优选的实施方案中，本发明的方法含中使用的组合物，其不连续的油相分散于连续的水相中（例如水）。在优选的实施方案中，本发明的组合物是稳定的，且即使在长时间（例如，一年或几年）的贮存后也不会分解。某些本发明的组合物即使被吞咽、吸入或者与宿主的皮肤相接触，也不会产生毒性。这一点和某些具有刺激性的化学微生物杀灭剂有所不同。另外，在一些实施方案中，组合物对于植物同样没有毒性。

[0133] 本发明的组合物可大量的生产且在较大温度范围下可稳定数月。如果不稀释，则它们具有半固体膏状的性质，可以用手涂抹局部或者用与水混合使用。若进行稀释，则其具有粘性，且外观与脱脂乳液相似，可以喷在已除污的表面上或者在吸入前能潜在的与雾化的孢子发生相互作用。这些性质使得其具有广谱抗微生物的用途。另外，这些特性还使得本发明的组合物尤其适用于净化除污。

[0134] 如上所述，至少部分乳液是液体结构的形式，该结构包括，但不限于，单室脂质体、多室脂质体和极少室脂质体、胶团和层状相。

[0135] 在本发明的一些实施方案中，油相中含有乙醇。例如在一些实施方案中，本发明的乳液含有 (i) 水相；(ii) 含有乙醇作为有机溶剂的油相且任意的，含有萌发增强子；(iii) 作为表面活性剂的 TYLOXAPOL（优选 2-5%，更优选 3%）。该制剂对微生物非常有效且对哺乳动物没有刺激性和毒性（因此可与粘膜相接触）。

[0136] 在一些其它的实施方案中，本发明的乳液含有在第二乳液中被乳化的第一乳液，其中 (a) 第一乳液含有 (i) 水相；(ii) 含油和有机溶剂的油相；(iii) 表面活性剂；(b) 第二乳液含有 (i) 水相；(ii) 含有油类和含有阳离子的化合物的油相；(iii) 表面活性剂。

[0137] B. 示例性制剂

[0138] 以下的描述给出了一组示例性的乳液,其中包括用于 BCTP 和  $X_8W_{60}PC$  组合物的制剂。BCTP 含有油包水的纳米乳液,其中的油相源于大豆油、正磷酸三丁酯及在 80% 水中的 TRITON X-100. 含有相同体积的 BCTP 和  $W_{80}8P$  的混合物的  $X_8W_{60}PC$ 。 $W_{80}8P$  是一种由甘油单硬脂酸酯、精炼大豆固醇(例如,GENEROL 固醇)、TWEEN 60、大豆油、阳离子含卤 CPC 和薄荷油制得的类脂质体化合物。The GENEROL 族物质是一组聚乙氧基化的大豆固醇(亨克尔公司 Ambler, 宾夕法尼亚)。一些本发明实施方案中的乳液制剂描述于表 1 中。这些特定的制剂也可以记载在美国专利号 5,700,679(NN);5,618,840;5,549,901( $W_{80}8P$ );和 5,547,677 中,此处合并作为整体参考。某些乳液制剂在图 29 中有记载。此外,图 30 依图记载了本发明常用制剂及某些本发明实施方案的使用情况。

[0139]  $X_8W_{60}PC$  乳液的通过以下方法制备:先单独制备  $W_{80}8P$  乳液和 BCTP 乳液,然后将两种乳液的混合物重新乳化制得一种新的乳液组合物,称为  $X_8W_{60}PC$ 。制备所述乳液的方法记载在美国专利号 5,103,497 和 4,895,452(此处合并作为整体参考)。这些化合物具有广谱的抗微生物活性,且能通过破坏细胞膜灭活无性繁殖的细菌。

[0140] 表 1

[0141]

名称	油相处方	水对油相的比例(体积/体积)
BCTP	1 体积的正磷酸三丁酯 1 体积的 TRITON X-100 8 体积的大豆油	4 : 1
NN	86.5g 甘油单油酸酯 60.1ml 壬苯醇醚 24.2g GENEROL 122 3.27g 卤化鲸蜡基吡啶鎓 554g 大豆油	3 : 1
$W_{80}8P$	86.5g 甘油单油酸酯 21.2g 聚山梨酯 60 24.2g GENEROL 122 3.27g 卤化鲸蜡基吡啶鎓 4ml 薄荷油 554g 大豆油	3.2 : 1
SS	86.5g 甘油单油酸酯 21.2g 聚山梨酯 60 24.2g GENEROL 122 3.27g 卤化鲸蜡基吡啶鎓 554g 大豆油	3.2 : 1(水中含 1% 铋)

[0142] 上述列出的组合物只是示例性的,本领域技术人员可以通过改变上述组分的量来获得适用于本发明目标的纳米乳液组合物。本领域技术人员能够理解油相对水的比例以及对单个油类载体、表面活性剂 CPC 和有机磷酸盐缓冲剂的比例,及对油类对每一组合物中

组分的比例都可以是不同的。

[0143] 尽管某些组合物,包括 BCTP 其水对油的比例为 4 : 1,我们应当理解制备 BCTP 时可以使用更多或者更少的水相。例如,在一些实施方案中,水相对油相的比例是 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多。这对于 W<sub>80</sub>8P 制剂也是一样的。

[0144] 同样的,正磷酸三丁酯 : TRITON X-100 : 大豆油的比例也是可以改变的。

[0145] 尽管表 1 列出了特定量的,用于制备 W<sub>80</sub>8P 的聚山梨醇酯 60、GENEROL 122、氯化鲸蜡基吡啶鎓和载体油类,这些都仅仅是示例性的。可以使用浓度与之不同的组分或者能得到相同效果但却与之不同的组分制出具有 W<sub>80</sub>8P 性质的乳液。例如乳液的最初油相中可含有大约 80-100g 之间的甘油单油酸酯。在其它实施方案中,乳液的最初油相中可含有大约 15 至 30g 的聚山梨醇酯 60。在另一个实施方案中,组合物的最初油相中可含有约 20-30g 之间的 GENEROL 固醇。

[0146] 本发明乳液的某种实施方案的纳米乳液在其杀生物活性中起一定的作用,而且也是乳液不含毒性的一个原因。例如 BCTP 中的活性组分,TRITON-X100 在与 11% BCTP 等价的浓度时,显示出微弱的抗生物活性。向洗涤剂和溶剂中加入油相能显著的降低相同浓度的这些试剂对组织培养物的毒性。当不限于任何理论时,(对该机理的理解对于实践本发明并不是必须的,且本发明不局限于任一特定机理),该现象表明纳米乳液能增强组分与病原体的相互作用,因此能促进病原体的灭活及降低单一组分的毒性。我们必须注意到,当所用的 BCTP 中所有的组分结合成一个组合物但是却非纳米乳液结构时,该混合物的抗微生物活性不及纳米乳液结构的有效。

[0147] 使用相似组合物的一组制剂的其他实施方案将在下文叙述。作为抗病材料使用的多种所述组合物的效果在图 31 中所示。下述组合物使用了不同组分比例和其不同的混合物。本领域技术人员能够领会以下描述的制剂示示例性的,且含有相同比例所述组分的其他的组合物也属于本发明的范围。

[0148] 在本发明某些实施方案中,所公开的制剂中含有约 3-8% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的乙醇,约 1% (体积) 的氯化鲸蜡基吡啶鎓 (CPC),约 60-70% (体积) 的油类 (例如,大豆油),约 15-25% (体积) 的水相 (例如, DiH<sub>2</sub>O 或 PBS),在一些制剂中含有少于约 1% (体积) 的 1N 的 NaOH。一些实施方案中含有 PBS。在某些实施方案中加入 1N 的 NaOH 和 / 或 PBS 使得操作者能够方便的控制制剂的 pH 值,如此使得 pH 范围为约 7.0 至约 9.0,更优选为约 7.1-8.5。例如,在本发明的一项实施方案中,含有约 3% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% 体积的乙醇,约 1% (体积) 的 CPC,约 64% (体积) 的大豆油,和约 24% (体积) 的 DiH<sub>2</sub>O (在此称为 Y3EC)。另一实施方案中含有约 3.5% 体积的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的乙醇,约 1% (体积) 的 CPC,约 64% (体积) 的大豆油,和约 23.5% (体积) 的 DiH<sub>2</sub>O (此处称为 Y3.5EC)。还有在另一实施方案中,含有约 3% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的乙醇,约 1% (体积) 的 CPC,约 0.067% (体积) 1N 的 NaOH,如此该制剂的 pH 可以达到约 7.1,及约 64% (体积) 的大豆油,约 23.93% (体积) DiH<sub>2</sub>O (此处称作 Y3EC pH 7.1)。还又的实施方案中含有约 3% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的乙醇,约 1% (体积) CPC,约 0.67% (体积) 1N 的 NaOH,如此制剂的 pH 可达到约 8.5,及约 64% (体积) 大豆油,约 23.33% 体积 DiH<sub>2</sub>O (此处称作 Y3ECpH 8.5)。另一相似的实施方案中含有约 4% TYLOXAPOL,约 8% (体积) 乙醇,约 1% CPC,及约 64% (体积) 大豆油,约 23% (体

积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 Y4EC)。在另一实施方案中, 制剂含有约 8% TYLOXAPOL, 约 8% 乙醇, 约 1% (体积) CPC, 及约 64% (体积) 大豆油, 约 19% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 Y8EC)。一项进一步的实施方案中含有约 8% (体积) TYLOXAPOL, 约 8% (体积) 乙醇, 约 1% (体积) CPC, 约 64% (体积) 大豆油, 及约 19% (体积) 1x PBS (此处称作 Y8EC PBS)。

[0149] 在本发明的一些实施方案中, 新制剂含有约 8% (体积) 乙醇, 和约 1% (体积) CPC, 和约 64% (体积) 的油类 (例如, 大豆油), 和约 27% (体积) 的水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS) (此处称作 EC)。

[0150] 在本发明中, 一些实施方案含有约 8% (体积) 十二磺 (月桂基) 基硫酸钠 (SDS), 约 8% (体积) 磷酸三丁酯 (TBP), 和约 64% (体积) 的油类 (例如, 大豆油), 和约 20% (体积) 的水相 (例如  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS) (此处称作 S8P)。

[0151] 在本发明的某些实施方案中, 新制剂含有约 1-2% (体积) TRITONX-100, 约 1-2% (体积) TYLOXAPOL, 约 7-8% (体积) 乙醇, 约 1% (体积) 氯化鲸蜡基吡啶鎓 (CPC), 约 64-57.6% (体积) 油类 (例如, 大豆油) 和约 23% (体积) 的水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。另外, 一些这样的制剂还含有约 5mM 的 L 丙氨酸 / 肌苷, 和约 10mM 氯化铵。一些此类制剂含有 PBS。我们注意到, 在一些实施方案中加入 PBS, 使得操作者能便利的控制制剂的 pH 值。例如本发明的一个实施方案中含有约 2% (体积) TRITON X-100, 约 2% (体积) TYLOXAPOL, 约 8% (体积) 的乙醇, 约 1% (体积) CPC, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 23% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  水相。另一实施方案的制剂含有约 1.8% (体积) TRITON X-100, 约 1.8% (体积) TYLOXAPOL, 约 7.2% (体积) 乙醇, 约 0.9% (体积) CPC, 约 5mM L- 丙氨酸 / 肌苷, 和约 10mM 氯化铵, 约 57.6% (体积) 大豆油, 还有 1xPBS (此处称作 90% X2Y2EC/GE)。

[0152] 在本发明可替换的另一实施方案中, 制剂含有约 5% (体积) TWEEN80, 约 8% (体积) 乙醇, 约 1% (体积) CPC, 约 64% (体积) 的油类 (例如, 大豆油), 和约 22% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作  $W_{80}5\text{EC}$ )。

[0153] 在本发明的另一实施方案中, 制剂含有约 5% (体积) TWEEN 20, 约 8% (体积) 乙醇, 约 1% (体积) CPC, 约 64% (体积) 的油类 (例如, 大豆油), 和约 22% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作  $W_{20}5\text{EC}$ )。

[0154] 在本发明另一实施方案中, 所述制剂含有约 2-8% (体积) 的 TRITONX-100, 约 8% (体积) 的乙醇, 约 1% (体积) CPC, 约 60-70% (体积) 的油类 (例如, 大豆油或橄榄油), 和约 15-25% (体积) 水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。例如, 本发明优选制剂含有约 2% (体积) TRITON X-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 26% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X2E)。在另一相似的实施方案中, 所述制剂含有约 3% (体积) TRITON X-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 25% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X3E)。在进一步的实施方案中, 所述制剂含有约 4% (体积) TRITONX-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 24% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X4E)。在另一实施方案中, 所述制剂含有约 5% (体积) TRITON X-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 23% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X5E)。本发明的另一实施方案中含有约 6% (体积) TRITON X-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 22% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X6E)。本发明进一步的实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) TRITON X-100, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 大豆油, 和约 20% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8E)。本发明进一步的实施

方案中,所述制剂含有约 8% (体积) TRITON X-100,约 8% 体积的乙醇,约 64% (体积) 的橄榄油,和约 20% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8E O)。在另一实施方案中,含有 8% (体积) TRITON X-100,约 8% (体积) 乙醇,约 1% (体积) CPC,约 64% (体积) 大豆油,和约 19% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8EC)。

[0155] 在本发明另一可替代的实施方案中,所述制剂含有约 1-2% (体积) 的 TRITON X-100,约 1-2% (体积) TYLOXAPOL,约 6-8% (体积) TBP,约 0.5-1.0% (体积) CPC,约 60-70% (体积) 的油类 (例如,大豆油),和约 1-35% (体积) 的水相 (例如, $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。另外,某些制剂还可含有约 1-5% (体积) 的胰腺豆腺培养液,约 0.5-1.5% (体积) 酵母提取物,约 5mM L 丙氨酸 / 肌苷,约 10mM 氯化铵,和约 20-40% (体积) 液态婴儿制剂。在某些实施方案中含有液态婴儿用制剂,该制剂含有一种酪蛋白水解产物 (例如, Neutramigen 或 Progestimil 等等)。在一些实施方案,新制剂还含有约 0.1-1.0% (体积) 的硫代硫酸钠,和约 0.1-1.0% (体积) 的柠檬酸钠。其他相似的实施方案中含有使用磷酸酯缓冲的盐水 (PBS) 作为水相的碱性组分。例如一种实施方案中含有约 2% (体积) 的 TRITON X-100,约 2% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) TBP,约 1% (体积) 的 CPC,约 64% (体积) 的大豆油,约 23% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X2Y2EC)。在其它实施方案中,新制剂含有约 2% (体积) TRITONX-100,约 2% (体积) TYLOXAPOL,约 8% (体积) TBP,约 1% (体积) CPC,约 0.9% (体积) 的硫代硫酸钠,约 0.1% (体积) 的柠檬酸钠,约 64% (体积) 的大豆油,和约 22% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X2Y2PC STS1)。在另一相似的实施方案中,所述制剂含有约 1.7% (体积) TRITON X-100,约 1.7% (体积) TYLOXAPOL,约 6.8% (体积) TBP,约 0.85% CPC,约 29.2% NEUTRAMIGEN,约 54.4% (体积) 的大豆油,和约 4.9% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 85% X2Y2PC/ 婴儿用)。在本发明的另一实施方案中,所述制剂含有约 1.8% (体积) TRITON X-100,约 1.8% (体积) TYLOXAPOL,约 7.2% (体积) TBP,约 0.9% (体积) 的 CPC,约 5mM L- 丙氨酸 / 肌苷,约 10mM 氯化铵,约 57.6% (体积) 的大豆油,还有 0.1x% (体积) PBS (此处称作 90% X2Y2 PC/GE)。在另一实施方案中,所述制剂含有约 1.8% (体积) 的 TRITON X-100,约 1.8% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 7.2% (体积) TBP,约 0.9% (体积) CPC,和约 3% (体积) 胰腺豆腺培养液,约 57.6% (体积) 大豆油,和约 27.7% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 90% X2Y2PC/TSB)。在本发明的另一实施方案中,所述制剂含有约 1.8% (体积) TRITON X-100,约 1.8% (体积) TYLOXAPOL,约 7.2% (体积) TBP,约 0.9% (体积) CPC,约 1% (体积) 酵母提取物,约 57.6% (体积) 大豆油,和约 29.7% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 90% X2Y2PC/YE)。

[0156] 在本发明的一些实施方案中,所述新制剂含有约 3% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的 TBP,和约 1% (体积) 的 CPC,约 60-70% (体积) 的油类 (例如,大豆油或橄榄油),和约 15-30% (体积) 的水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。在本发明特定的一项实施方案中,所述新制剂含有约 3% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 8% (体积) 的 TBP,和约 1% (体积) 的 CPC,约 64% (体积) 的大豆油,和约 24% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 Y3PC)。

[0157] 在本发明的一些实施方案中,所述新制剂含有约 4-8% (体积) 的 TRITON X-100,约 5-8% (体积) 的 TBP,约 30-70% (体积) 的油类 (例如,大豆油或橄榄油),和约 0-30% (体积) 的水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。另外,某些实施方案还含有约 1% (体积) 的 CPC,约 1% (体积) 苄烷氯铵,约 1% (体积) 溴化鲸蜡基吡啶鎓,约 1% (体积) 溴化鲸蜡基

二甲基乙铵, 500  $\mu$ M EDTA, 约 10mM 氯化铵, 约 5mM 肌苷, 和约 5mM L- 丙氨酸。例如, 在某些实施方案中, 所述新制剂含有约 8% (体积) 的 TRITONX-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 20% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8P)。在本发明的另一实施方案中, 所述新制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% 的 CPC, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 19% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8PC)。在另一实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% (体积) 的 CPC, 约 50% (体积) 的大豆油, 和约 33% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 ATB-X1001)。在另一个实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 2% (体积) 的 CPC, 约 50% (体积) 的大豆油, 和约 32% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 ATB-X002)。在本发明的另一个实施方案中含有约 4% (体积) TRITONX-100, 约 4% (体积) 的 TBP, 约 0.5% (体积) 的 CPC, 约 32% (体积) 的大豆油, 和约 59.5% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 50% X8PC)。在另一相关的实施方案中含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8 体积% 的 TBP, 约 0.5% (体积) CPC, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 19.5% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8PC<sub>1/2</sub>)。在本发明的一些实施方案中, 所述新制剂含有约 8 体积% 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 2% (体积) 的 CPC, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 18% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8PC2)。在其它实施方案中, 所述新制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% 的 TBP, 约 1% 苜烷氯铵, 约 50% (体积) 的大豆油, 和约 33% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8P BC)。在本发明一项可选择的实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% (体积) 溴化鲸蜡基吡啶鎓, 约 50% (体积) 的大豆油, 和约 33% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8P CPB)。在本发明另一项示例性的实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% (体积) 的溴化鲸蜡基二甲基乙铵, 约 50% (体积) 的大豆油, 和约 33% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8P CTAB)。在进一步的实施方案中, 本发明含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% (体积) 的 CPC, 约 500  $\mu$ M 的 EDTA, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 15.8% (体积)  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8PC EDTA)。在其他相似的实施方案中含有 8% (体积) 的 TRITONX-100, 约 8% (体积) 的 TBP, 约 1% (体积) 的 CPC, 约 10mM 氯化铵, 约 5mM 肌苷, 约 5mM L- 丙氨酸, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 19% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS (此处称作 X8PC GE<sub>1x</sub>)。在本发明的另一实施方案中, 所述新制剂还含有约 5% (体积) 的 TRITON X-100, 约 5% 的 TBP, 约 1% (体积) 的 CPC, 约 40% (体积) 的大豆油, 和约 49% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X5P<sub>5</sub>C)。

[0158] 在本发明的一些实施方案中, 所述新制剂含有约 2% (体积) TRITONX-100, 约 6% (体积) 的 TYLOXAPOL, 约 8% (体积) 乙醇, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 20% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X2Y6E)。

[0159] 本发明另一其他实施方案中, 所述制剂含有约 8% (体积) 的 TRITONX-100, 和约 8% (体积) 的甘油, 约 60-70% (体积) 的油类 (例如, 大豆油或橄榄油), 和约 15-25% (体积) 的水相 (例如,  $\text{DiH}_2\text{O}$  或 PBS)。某些相关的实施方案中还含有约 1% (体积) L- 抗坏血酸。例如某项特定的实施方案中含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的甘油, 约 64% (体积) 的大豆油, 和约 20% (体积) 的  $\text{DiH}_2\text{O}$  (此处称作 X8G)。在另一实施方案中, 所述新制剂含有约 8% (体积) 的 TRITON X-100, 约 8% (体积) 的甘油, 约 1%

(体积)的L-抗坏血酸,约64%(体积)的大豆油,和约19%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作X8GVc)。

[0160] 在进一步的实施方案中,所述新制剂含有约8%(体积)的TRITONX-100,约0.5-0.8%(体积)的TWEEN 60,约0.5-2.0%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约60-70%(体积)的油类(例如,大豆油或橄榄油),和约15-25%(体积)的水相(例如, $\text{DiH}_2\text{O}$ 或PBS)。例如在某项特定的实施方案中的所述制剂含有约8%(体积)的TRITON X-100,约0.70%(体积)的TWEEN 60,约1%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约64%(体积)大豆油,约18.3%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作X8W60PC<sub>1</sub>)。另一项相关的实施方案含有约8%(体积)的TRITON X-100,约0.71%(体积)的TWEEN 60,约1%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约64%(体积)的大豆油,和约18.29%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作W60<sub>0.7</sub>X8PC)。在另一实施方案中,所述新制剂含有约8%(体积)的TRITON X-100,约0.7%(体积)TWEEN 60,约0.5%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约64-70%(体积)的大豆油,和约18.8%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作X8W60PC<sub>2</sub>)。在另一实施方案中,本发明含有约8%(体积)的TRITON X-100,约0.71%(体积)的TWEEN 60,约2%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约64%(体积)的大豆油,和约17.3%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ 。在本发明的另一实施方案中,所述制剂含有约0.71%(体积)的TWEEN 60,约1%(体积)的CPC,约8%(体积)的TBP,约64%(体积)的大豆油,和约25.29%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作W60<sub>0.7</sub>PC)。

[0161] 在本发明的另一实施方案中,所述新制剂含有约2%(体积)磺基琥珀酸二辛酯,约8%(体积)的甘油,或约8%(体积)TBP,此外含有约60-70%(体积)的油类(例如,大豆油或橄榄油),和约20-30%(体积)的水相(例如, $\text{DiH}_2\text{O}$ 或PBS)。例如在本发明的一项实施方案中,含有约2%(体积)磺基琥珀酸二辛酯,约8%(体积)的甘油,约64%(体积)的大豆油,和约26%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作D2G)。在另一相关的实施方案中,所述新制剂含有约2%(体积)的磺基琥珀酸二辛酯,和约8%(体积)的TBP,约64%(体积)的大豆油,和约26%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作D2P)。

[0162] 在本发明的另一实施方案中,所述新制剂含有约8-10%(体积)的甘油,和约1-10%(体积)的CPC,约50-70%(体积)的油类(例如,大豆油或橄榄油),和约15-30%(体积)的水相(例如, $\text{DiH}_2\text{O}$ 或PBS)。另外,在某些实施方案中,组合物中还含有约1%(体积)的L-抗坏血酸。例如某项特定的实施方案中含有约8%(体积)的甘油,约1%(体积)的CPC,约64%(体积)的大豆油,和约27%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作GC)。其他相关的实施方案含有约10%(体积)的甘油,约10%(体积)的CPC,约60%(体积)的大豆油,和约20%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作GC10)。在本发明的另一实施方案中,所述新制剂含有约10%(体积)的甘油,约1%(体积)的CPC,约1%(体积)的L-抗坏血酸,约64%(体积)的大豆油,和约24%(体积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作GCV<sub>0</sub>)。

[0163] 在本发明的一些实施方案中,所述新制剂含有约8-10%(体积)的甘油,约8-10%(体积)的SDS,约50-70%(体积)的油类(例如,大豆油或橄榄油),和约15-30%(体积)的水相(例如, $\text{DiH}_2\text{O}$ 或PBS)。另外,在某些实施方案中,组合物还含有约1%(体积)卵磷脂,和约1%(体积)的对-羟基苯甲酸甲酯。所示制剂的示例性的实施方案制剂含有约8%(体积)SDS,8%(体积)的甘油,约64%(体积)的大豆油,和约20%(体

积)的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作 S8G)。一种相关的制剂含有约 8% (体积) 的甘油,约 8% (体积) SDS,约 1 体积%的卵磷脂,约 1% (体积) 的对-羟基苯甲酸甲酯,约 64% (体积) 的大豆油,和约 18% (体积) 的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作 S8GL1B1)。

[0164] 在本发明的另一实施方案中,所述新制剂含有约 4% (体积) 的 TWEEN 80,约 4% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 1% (体积) 的 CPC,约 8% (体积) 的乙醇,约 64% (体积) 的大豆油,和约 19% (体积) 的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作  $W_{80}4Y4EC$ )。

[0165] 在本发明的一些实施方案中,所述新制剂含有约 0.01% (体积) 的 CPC,约 0.08% (体积) 的 TYLOXAPOL,约 10% (体积) 的乙醇,约 70% (体积) 的大豆油,和约 19.91% (体积) 的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称为 Y.08EC.01)。

[0166] 在本发明的另一实施方案中,所述新制剂含有约 8% (体积) 的十二烷基硫酸钠,和约 8% (体积) 的甘油,约 64% (体积) 的大豆油,和约 20% (体积) 的 $\text{DiH}_2\text{O}$ (此处称作 SLS8G)。

[0167] C. 其它制剂

[0168] 上述特定的制剂仅是简单的作为实施例来说明本发明适用组合物的其他形式。本发明意在表明本发明方法中所述制剂的形式以及其它纳米乳液的多种形式。判断一种乳液是否适宜本发明,必须分析三项标准。按照此处所述的方法和标准,经过简单的测试就能判断选用的乳液是否适用。首先,采用所述方法制备备选组分的乳液,判断这些组分是否能形成一种乳液。如果不能形成乳液,则不能使用这些备选组分。例如,由 4.5% 硫代硫酸钠,0.5% 柠檬酸钠,10% 正丁醇,64% 大豆油,和 21%  $\text{DiH}_2\text{O}$  组成的一种备选组合物,就不能形成乳液。

[0169] 其次,备选乳液必须是稳定的乳液。在足够长的时段中仍能保持其稳定性的乳液是允许使用的。例如,用于贮存或者运输的乳液必须能在数月至数年内保持乳液的形式。一般的乳液相对不稳定些,在一天内就解体了。例如一种由 8% 1-丁醇,5% Tween 10,1% CPC,64% 大豆油,和 22%  $\text{DiH}_2\text{O}$  组成的备选组合物就不能形成稳定的乳液。以下备选乳液使用所述方法测定的结果都是稳定的:0.08% Triton X-100,0.08% 甘油,0.01% 氯化鲸蜡基吡啶鎓,99% 黄油,和 0.83%  $\text{diH}_2\text{O}$ (此处称作 1% X8GC 黄油);0.8% Triton X-100,0.8% 甘油,0.1% 氯化鲸蜡基吡啶鎓,6.4% 大豆油,1.9%  $\text{diH}_2\text{O}$ ,和 90% 黄油(此处称作 10% X8GC 黄油);2%  $W_{20}5EC$ ,1% Natrosol 250L NF,和 97%  $\text{diH}_2\text{O}$ (此处称作 2%  $W_{20}5ECL$  凝胶);1% 氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8% 乙醇,64% 70 粘性矿物油,和 22%  $\text{diH}_2\text{O}$ (此处称作  $W_{20}5EC$  70 矿物油);1% 氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8% 乙醇,64% 350 粘性矿物油,和 22%  $\text{diH}_2\text{O}$ (此处称作  $W_{20}5EC$  350 矿物油)。

[0170] 再次,备选乳液必须能用于本发明的目的。例如一种抗菌乳液必须能杀灭或者灭活细菌、这种效应必须是能检测到的。如此处所示,本发明的某种乳液具有对抗特定微生物,而非其他微生物的能力。使用所述方法,人们可以判断一种特殊乳液用于对抗特定微生物的适用性。一般来说,此方法涉及在并列试验中,伴随适宜控制样本(例如,一种负面的控制,例如水)将微生物置于乳液长达一段或多时段中,再判断乳液是否杀灭或灭活微生物,及效果到达何种程度。例如,一种由 1% 氯化铵,5% Tween 20,8% 乙醇,64% 大豆油,和 22%  $\text{DiH}_2\text{O}$  组成的备选组合物,就不能成为有效的乳液。以下备选乳液采用所述方法测定是有效的:5% Tween 20,5% 氯化鲸蜡基吡啶鎓,10% 甘油,60% 大豆油,和 20%

$\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{GC5}$ ) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,10%甘油,64%大豆油,和20%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{GC}$ ) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64%橄榄油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  橄榄油) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64%亚麻油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  亚麻油) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween20,8%乙醇,64%玉米油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  玉米油) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64%椰油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  椰油) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64%棉籽油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  棉籽油) ;8%右旋糖,5% Tween10,1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,64%大豆油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{C}$  右旋糖) ;8% PEG 200,5% Tween 10,1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,64%大豆油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{C}$  PEG 200) ;8% 甲醇,5% Tween 10,1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,64%大豆油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{C}$  甲醇) ;8% PEG 1000,5% Tween 10,1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,64%大豆油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{C}$  PEG 1000) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,2% Natrosol 250H NF,和96%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Natrosol 2,也称为 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  凝胶) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,1% Natrosol 250H NF,和97%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Natrosol 1) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,3% Natrosol 250H NF,和95%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Natrosol 3) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,0.5% Natrosol 250H NF,和97.5%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Natrosol 0.5) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,2% MethocelA,和96%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Methocel A) ;2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$ ,2% Methocel K,和96%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 2%  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  Methocel K) ;2% Natrosol,0.1% X8PC,0.1x PBS,5mM L-丙氨酸,5mM 肌苷,10mM 氯化铵,和  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 0.1% X8PC/GE+2% Natrosol) ;2% Natrosol,0.8% Triton X-100,0.8% 磷酸三丁酯,6.4%大豆油,0.1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,0.1x PBS,5mM L-丙氨酸,5mM 肌苷,10mM 氯化铵,和  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 10% X8PC/GE+2% Natrosol) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64% Lard,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{ECLard}$ ) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%乙醇,64%矿物油,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}$  矿物油) ;0.1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,2%橙花叔醇,5% Tween 20,10%乙醇,64%大豆油,和18.9%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}_{0.1\text{N}}$ ) ;0.1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,2%金合欢醇,5% Tween 20,10%乙醇,64%大豆油,及18.9%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}_{0.1\text{F}}$ ) ;0.1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,10%乙醇,64%大豆油,和20.9%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{EC}_{0.1}$ ) ;10%氯化鲸蜡基吡啶鎓,8%磷酸三丁酯,8% TritonX-100,54%大豆油,和20%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{X8PC}_{10}$ ) ;5%氯化鲸蜡基吡啶鎓,8% Triton X-100,8%磷酸三丁酯,59%大豆油,和20%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{X8PC}_5$ ) ;0.02%氯化鲸蜡基吡啶鎓,0.1% Tween 20,10%乙醇,70%大豆油,和19.88%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}0.1\text{EC}_{0.02}$ ) ;1%氯化鲸蜡基吡啶鎓,5% Tween 20,8%甘油,64% Mobil 1,和22%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作  $\text{W}_{20}5\text{GCMobil 1}$ ) ;7.2% Triton X-100,7.2%磷酸三丁酯,0.9%氯化鲸蜡基吡啶鎓,57.6%大豆油,0.1x PBS,5mM L-丙氨酸,5mM 肌苷,10mM 氯化铵,和25.87%  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 90% X8PC/GE) ;7.2% Triton X-100,7.2%磷酸三丁酯,0.9%氯化鲸蜡基吡啶鎓,57.6%大豆油,1% EDTA,5mM L-丙氨酸,5mM 肌苷,10mM 氯化铵,0.1x PBS,和  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 90% X8PC/GE EDTA) ;和7.2% Triton X-100,7.2%磷酸三丁酯,0.9%氯化鲸蜡基吡啶鎓,57.6%大豆油,1%硫代硫酸钠,5mM L-丙氨酸,5mM 肌苷,10mM 氯化铵,0.1x PBS,和  $\text{diH}_2\text{O}$  (此处称作 90% X8PC/GESTS) 。

[0171] III. 性质及活性

[0172] 本发明的特定组合物具有有益的活性和性质。示例性的有益活性和特性在下文中详述：A) 杀灭微生物及抗微生物活性；B) 杀孢子及抗孢子活性；C) 杀病毒及抗病毒活性；D) 杀真菌及抗真菌活性；和 E) 体内活性。另外，图 31A-C 显示了本发明某种示例性制剂的特性。

#### [0173] A. 杀微生物及抗微生物活性

[0174] 本发明的方法可用于快速灭活细菌。在某些实施方案中，所述组合物对灭活革兰氏阳性菌尤其有效。在优选的实施方案中，大约在五到十分钟之后细菌失活。这样，细菌在用本发明乳液培养后，将被以快速及高效的方式灭活。我们希望当细菌与乳液直接相接触的时候，接触与灭活之间的时段能尽量在 5-10 之内或者更短。然而，应当理解，当本发明乳液用于治疗背景或者全身性的使用时，灭活将在较长的一段时间后发生，该时段包括，但不限于给药后 5、10、15、20、25、30、60 分钟。进一步的，其他的实施方案中，灭活发生在 2、3、4、5 或者 6 小时之后。

[0175] 在其它实施方案中，本发明的组合物和方法也能灭活某些革兰氏阴性菌。在一些实施方案中，细菌灭活乳液先与能增强乳液和细胞壁间相互作用的化合物预先混合。所述本发明的组合物的增强子的用途将在下文中讨论。我们必须注意到某些乳液，尤其是含有增强子的乳液，对于革兰氏阳性及阴性菌非常有效，且其可以口服给药，使其与肠内细菌接触。

[0176] 在特定的实施方案中，表明本发明的乳液具有潜在的，选择性的杀生物活性，同时对于无性繁殖细菌具有很小的活性。BCTP 对蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)，环状芽孢杆菌 (*B. circulans*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)，产气荚膜杆菌 (*C. perfringens*)，流感嗜血菌 (*H. influenzae*)，淋病奈瑟氏球菌 (*N. gonorrhoeae*)，无乳链球菌 (*S. agalactiae*)，肺炎链球菌 (*S. pneumonia*)，化脓链球菌 (*S. pyogenes*) 和霍乱弧菌 (*V. cholerae*) classical 和 Eltor 具有很高的活性 (图 26)。此种针对易感微生物的灭活反应只要接触就发生得非常快，且在 15-30 分钟之内完成。

[0177] 图 31A 显示了本发明的几种示例性的纳米乳液对大肠杆菌的效果

#### [0178] B. 杀孢子及抗孢子活性

[0179] 在某些特定的实施方案中，本发明表明本发明的乳液具有杀孢子活性。不拘泥于任一理论 (理解本发明机理对于实施本发明并不必要，且本发明也不限于任一特定机理)，我们认为这些乳液的杀孢子活性贯穿于萌发初期，而孢子无需完全转化成易于被乳液破坏的营养型。乳液或其组分的反应可介导萌发的启动。

[0180] 电子显微镜研究的结果表明，在接受 BCTP 处置之后，伴随着孢子核内物质的瓦解，孢子膜和皮层破裂。杀孢子活性似乎是由 TRITONX-100 和正磷酸三丁酯组分介导的，因为不含这些组分的纳米乳液没有体内活性。乳液的这项独特的活性 (与 1% 漂白剂的效果相似) 很吸引人，因为细菌孢子通常能抵抗大多数的消毒剂，包括多种常用的洗涤剂 (Russell, 临床微生物 3 :99[1990])。

[0181] 本发明证实将 BCTP 和蜡状芽孢杆菌孢子混合后再向小鼠注射，能预防蜡状芽孢杆菌的病理效应的产生。进一步的，本发明表明使用 BCTP 处置被蜡状芽孢杆菌孢子感染的模拟创伤，能显著的降低小鼠感染的危险及降低死亡率。用 BCTP1 : 10 稀释后注射的动物没有反映出任何感染的结果，该效果证明 BCTP 对小鼠没有皮肤毒性。这些结果表明在孢子

暴露前后快速的孢子处置能有效的降低试验性皮肤感染中的组织损害的严重度。

[0182] 在本发明过程中的其他的试验比较了 BCTP 和其它 BCTP 衍生乳液对不同的杆菌孢子的灭活效果。BCTP 稀释至最高 1 : 1000 (v/v) 能在四小时内灭活超过 90% 的炭疽杆菌孢子, 还能杀死三种杆菌的孢子, 同时清楚可见破碎的孢子膜。X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 稀释至 1 : 1000 对炭疽杆菌、蜡状芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌具有更高的杀孢子的活性, 且不到 30 分钟即能起效。将 BCTP 与蜡状芽孢杆菌混合后对小鼠进行皮下注射, 或者, 小鼠皮肤用孢子接种后用 BCTP 冲洗伤口 1 小时, 结果是 98% 的皮肤损伤范围得到恢复 (治愈)。在近期的试验中, 死亡率减少了 4 倍。与其他使用的杀孢子试剂相比, 所述组合物稳定、易于分散、无刺激且无毒。

[0183] 本发明的方法中使用的细菌 - 灭活水包油乳液可通过与其接触以灭活一系列细菌和细菌孢子。例如, 新乳液可用于灭活杆菌、包括: 蜡状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌、还包括梭状芽孢杆菌 (例如, 肉毒梭菌和破伤风梭菌)。本发明的方法可尤其用于灭活某种生化武器 (例如, 炭疽杆菌)。另外, 还发现本发明所述制剂可用于对抗产气荚膜杆菌、流感嗜血菌、淋病奈瑟氏球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓链球菌和霍乱弧菌 classical 和 Eltor (图 26)。

[0184] BCTP 含有 TRITON X-100, SS 和 W<sub>80</sub>8P 含有 TWEEN 60, NN 含有壬苯醇醚 -9 表面活性剂。每一项都是非离子表面活性剂, 但是化学和生物学特性却各不相同。壬苯醇醚 -9 具有强的杀精子活性, 其广泛用作阴道用避孕产品的组分 (Lee, 1996)。有人宣称它对包膜病毒具有杀病毒效果 (Hermonat 等, 1992 ; Zeitlin 等, 1997)。然而, 壬苯醇醚 -9 未显示对非包膜病毒有效 (Hermonat 等, 1992)。

[0185] 图 31B 显示了本发明的一组示例性纳米乳液对枯草芽孢杆菌孢子的效果。

[0186] C. 杀病毒和抗病毒活性

[0187] 在其他实施方案中, 已被证明, 本发明的纳米乳液组合物具有抗病毒性质。乳液对病毒试剂的效果使用斑点数降低测定法 (PRA)、细胞酶联免疫吸着测定法 (ELISA)、β - 半乳糖苷酶测定法和电子显微镜 (EM) 进行检测, 细胞毒性脂质制剂的细胞毒性使用 (4, 5-二甲噻唑 -2-基) -2, 5 二苯基四唑 (MTT) 染色法测定 (Mosmann 1983)。

[0188] 通过细胞 ELISA 试验测定以及由 PRA 试验作后续的确证, 显示 MDCK 细胞的 A 型流感传染性显著的降低。BCTP 和 SS 在 1 : 10 的稀释下降低病毒感染为 95% 以上。其他两种乳液在 1 : 10 的稀释下降低病毒感染约 40%, 显示其只有前者一半的效果。BCTP 是最具潜力的制剂, 即使稀释到 1 : 100, 其杀病毒的能力丝毫没有减弱。动力学研究表明病毒与 1 : 10 稀释的 BCTP 共存 5 分钟, 便完全失去了感染力。TRITON X-100, 是 BCTP 的活性化合物, 当其稀释至 1 : 5000 时, 与 BCTP 相比, 只能部分的抑制病毒的感染力, 这表明纳米乳液其本身就具有抗病毒能力。为了进一步检测 BCTP 的抗病毒性质, 研究其对非 - 包膜病毒的活性。β - 半乳糖苷酶测定法检测结果显示, BCTP 处置并不能影响 293 细胞中 lacZ 腺病毒构造的复制。当用 EM 检测时, A 型流感病毒在用 BCTP 培养后被完全的破坏而腺病毒保存完好。

[0189] 另外病毒用 10% 及 1% 的 BCTP 在 PBS 中预先浸润, 疱疹病毒、仙台病毒、新培斯病毒和牛痘病毒被完全的消除, 该结果通过斑点数降低测定法 (图 27) 测定。时间过程的分析显示灭活作用快速且完全的发生在用 10% BCTP 培养的 5 分钟内、1% BCTP 培养的 30 分

钟内。用不同稀释度的 BCTP 处置腺病毒,病毒的感染力没有任何下降。

[0190] 某些以 BCTP 为基础的组合物对抗各种病毒感染的效果及其对粘性膜的微弱毒性证明了其有可能用作有效预防包膜病毒感染所引起疾病的消毒剂及试剂。

[0191] 图 31C 显示一组本发明示例性纳米乳液对抗 A 型流感病毒的效果。

[0192] D. 杀真菌和抗真菌活性

[0193] 本发明的纳米乳液的另一性质是其具有抗真菌活性。真菌感染的普通试剂包括多种念珠菌和曲霉属及其各种类型,还包括其他试剂。外部真菌感染相对轻微,体内真菌感染可引起严重的医疗结果。人体真菌感染的发生率在上升,这部分归结为缺损免疫系统病人数量的增加。真菌疾病,尤其是体内真菌疾病,对缺损免疫系统的病人具有生命威胁。

[0194] 本发明研究过程中实施的试验表明:1% BCTP 应用于白色念珠菌时,其具有大于 92% 的抗真菌活性。念珠菌以每晚 37°C 的速度生长。然后将细胞清洗后用血球计数器计数。已知数量的细胞用不同浓度的 BCTP 混合后培养 24 小时。念珠菌在右旋糖琼脂上生长,培养一夜,然后计算菌落。BCTP 的抗真菌效果用以下公式判断:

[0195]

$$\text{抗真菌效果 (FSE)} = 1 - \frac{\# \text{处置细胞} - \text{初始} \# \text{细胞}}{\# \text{未处置细胞} - \text{初始} \# \text{细胞}} \times 100$$

[0196] 本领域技术人员能将本发明所述制剂制成适合真菌疾病的治疗的制剂。本发明的纳米乳液 find use in 对抗感染例如足癣、念珠菌病和其他急性或体内真菌感染。

[0197] E. 体内效果

[0198] 动物研究证实了本发明组合物和方法的保护效果和治疗效果。试验动物蜡状芽孢杆菌感染用于事先提供研究炭疽的一种模型系统(参见例如, Burdon 和 Wende, 感染疾病杂质 170(2):272[1960]; Lamanna 和 Jones, 细菌杂质 85:532[1963]; 和 Burdon 等感染疾病杂质 117:307[1967])。动物实验性蜡状芽孢杆菌感染诱发的疾病综合症与炭疽相似(Drobniowski, 临床微生物研究 6:324[1993]; 和 Fritz 等, 实验室研究 73:691[1995])。本发明研究过程中实施的试验证实混合 BCTP 与蜡状芽孢杆菌孢子后小鼠注射,能预防蜡状芽孢杆菌的致病效果。进一步的,我们证实了 BCTP 处置蜡状芽孢杆菌孢子感染的模拟伤口显著的降低小鼠感染的危险和其死亡率。用 1:10 稀释的 BCTP 单独注射的试验动物没有显示任何的炎症迹象,这表明 BCTP 对小鼠没有皮肤毒性。这些结果表明:在(感染)暴露前后迅速的进行孢子处置能有效的在试验性皮肤感染中降低组织损伤的危险性。

[0199] 在已特定的实施例中,几内亚猪作为试验动物以研究产气荚膜杆菌感染。制作 1.5cm 的皮肤伤口,弄碎皮下肌肉且用  $5 \times 10^7$  cfu 的产气荚膜杆菌造成感染,不施用其他的处置。另一组则先用相同数量的细菌造成感染,1 小时后用盐水或者或 BCTP 冲洗以模拟 post-exposure 净化。使用盐水冲洗实验性的感染创伤没有产生任何明显的益处。然而,用 BCTP 冲洗产气荚膜杆菌感染引起的创伤显示出能显著的减少水肿、炎症反应炎症反应和坏死。如此证明了本发明的某些制剂能用于对抗细菌感染。

[0200] 进一步的,一种 10% BCTP 的皮下注射剂不会引起试验动物的不适且不会产生组织学上的组织损伤。在口服毒性试验中的所有大鼠的体重在研究期间都有所增加。我们没有发现大鼠有不良的临床迹象,且所有的组织经检查都在正常范围内。从试验动物粪便中获得的细菌培养物与那些未经处理的(正常的)动物相比没有显著的不同。

[0201] IV. 示例性的使用

[0202] 以下详细叙述的时一组示例性的本发明组合物的使用方法 :A) 药物和疗法 ;B) 净化和灭菌 ;C) 制备食物 ;和 D) 器具, 以及 E) 改进、制备和引用本发明组合物的方式方法的说明

[0203] A. 药物和疗法

[0204] 本发明的制剂可用于药物和治疗组合物, 还适用于对抗和 / 或处置微生物引起的感染。所述组合物可用于降低感染、杀灭微生物、抑制微生物生长或者用于消除微生物感染导致的不良效果。

[0205] 用于体内时, 组合物能以任何有效的药学可接受的形式向恒温动物, 包括人类和动物对象给药。一般来说, 这些制备的组合物基本上不含其他对人或者动物有害的热原和杂质。

[0206] 药学可接受形式的特定例子包括但不限于口服、鼻部、颊腔颊腔, 直肠, 阴道、局部或鼻喷或其他能有效的向微生物感染的部位施用本发明组合物的任一形式。在优选的实施方案中, 给药路径设计成组合物与感染性微生物直接接触的形式。在其它实施方案中, 可通过正位、真皮内的、皮下、肌内或腹腔内注射给药。组合物也可通过非肠道或腹腔内向对象给药。所述组合物可作为药学可接受的组合物给药。只有当任一常用的药学可接受的介质或试剂不能与本发明的乳液相容时, 这些特定实施方案中公开的药学可接受介质及制剂的应用需要仔细的研究。在其它的实施方案中, 也可以在组合物中同时使用具有其他活性的成分。

[0207] 局部给药时, 药学可接受的载体可以是液体、霜剂、泡沫剂、洗剂或凝胶, 也可附加的含有有机溶剂、乳化剂、凝胶剂、增湿剂、稳定剂、表面活性剂、增湿剂、防腐剂、时控释放剂 (time release agents) 及少量的湿润剂、螯合剂、着色剂、香料及其他常用于局部药物组合物的组分。

[0208] 乳液制成口服或局部给药的药片和制剂形式包括液体胶囊和栓剂。制备用于口服给药的固体制剂, 组合物可以与一种或多种基本无活性的稀释剂 (例如, 蔗糖、乳糖或淀粉, 等等) 混合, 还可以附加的含有润滑剂、缓冲剂、肠溶衣及其他本领域技术人员熟知的组分。

[0209] 在本发明的另一实施方案中, 本发明组合物可以特定的设计成体外使用的方式, 例如医用消毒或灭菌仪器和装置、隐形眼镜等等, 尤其当装置或者眼镜本身被病患或者佩带者使用。例如, 在药物和外科装置及用品与对象接触之前, 可用该组合物清除净化上述物件。另外, 该组合物还可用于术后, 或在任一侵害过程发生后, 辅助降低术后感染的发生率。在特别优选的实施方案中, 该组合物还可以采用保守或者有效的免疫学防御手段向对象施以药物 (例如, 老年和幼儿患者, 烧伤和外伤患者, 及感染 HIV 的患者等等)。当组合物用于这些类型的用途时, 它可以方便的制成液体、泡沫剂、贴剂或凝胶的形式, 也可以与乳化剂、表面活性剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、金属离子、抗生素和其它该类型中常见的组分共同使用。

[0210] 在其它实施方案中, 组合物可填充入吸收性材料中, 例如缝合线、绷带、和纱布, 或者包在固体材料的表面, 例如外科钉钉, 拉链和导管的表面, 用以将组合物传输到防止微生物感染的部位。其他的此类型的传输系统对于本领域技术人员来说都是显而易见的。

[0211] 在另一个实施方案中,组合物可用于个人护理业中,如除臭剂,肥皂,粉刺/真菌治疗剂,口臭治疗剂、阴道酵母菌感染治疗剂等等。组合物还可用于其他的内部和外部微生物引起的感染(例如,流感,H. simplex 等)。在这些用途中,乳液的制备可含有上文所述的治疗载体。

[0212] 在某些实施方案中,本发明抗菌组合物和方法还包含一组联合疗法。例如单一的抗微生物制剂抑制微生物的效果弱于多种试剂互相联合应用的效果。这样能有利于避免多种药物耐药性带来的问题。这在具有药物传输器以介导药物从器官中射流的细菌中也非常通用。本发明进一步的阐述本发明及组合物在联合疗法中的应用。

[0213] 可用于治疗细菌、真菌和病毒感染的抗微生物试剂的数量非常巨大。关于所述药物及其作用机理的理解性论文,本领域技术人员可参考 Goodman&Gilman 的《治疗学的药理学基础》。Hardman 等,第 9 版, Pub. McGraw Hill, 43-50 章, 1996, (此处以其整体形式合并作为参考)。通常,这些试剂中包括抑制细胞壁合成的试剂(例如,青霉素、头孢菌素、环丝氨酸,万古霉素、杆菌肽)及咪唑抗真菌试剂(例如,咪康唑、酮康唑和克霉唑);直接破坏微生物细胞膜的试剂(例如,洗涤剂例如多粘菌素和 colistimethate 和抗真菌制霉菌素和两性霉素 B);影响核蛋白体亚单元以抑制蛋白质合成的试剂(例如,氯霉素、四环素、erythromycin 和克林霉素);改变蛋白质合成及导致细胞死亡的试剂(例如,氨基甙类药物);影响核酸代谢的试剂(例如,利福霉素和喹诺酮);抗代谢试剂(例如,三甲氧苄二氢嘧啶和磺胺类药物);和核酸类似物,例如叠氮胸苷、丙氧鸟苷、阿糖腺苷和阿昔洛韦,这些物质抑制病毒 DNA 合成所必须的酶。可以采用不同种类的抗菌剂的多种结合。

[0214] 可以改变组合物和任一组合物中的促进剂的真实剂量用以在治疗点获得有效量的杀灭营养型、芽孢型微生物及中和毒性产物的剂量的乳液和促进剂。事实上,可选择的剂量依赖于本身和治疗点、所期望的反应、所期望生物反应的持续时间及其他的因素。通常,本发明的乳液可在每毫升液体组合物中含有至少 0.001% 至 100%, 优选 0.01 至 90%, 的乳液。可以预见,病毒感染可以使用每毫升液体组合物含约 0.01% 到 100% 之间浓度的乳液进行治疗。细菌感染可使用每毫升液体组合物含约 0.001% 至约 100% 浓度的乳液进行治疗。孢子可用每毫升液体组合物含约 0.001% 至约 100% 的乳液的乳液杀灭。这些仅仅是示例性的范围。可以预见,所述制剂的每毫升液体组合物可含有约 0.001%, 约 0.0025%, 约 0.005%, 约 0.0075%, 约 0.01%, 约 0.025%, 约 0.05%, 约 0.075%, 约 0.1%, 约 0.25%, 约 0.5%, 约 1.0%, 约 2.5%, 约 5%, 约 7.5%, 约 10%, 约 12.5%, 约 15%, 约 20%, 约 25%, 约 30%, 约 35%, 约 40%, 约 50%, 约 55%, 约 60%, 约 65%, 约 70%, 约 75%, 约 80%, 约 85%, 约 90%, 约 95% 或约 100% 的乳液。应当理解,上述两个数值之间的范围是包含在本发明特定的步长和范围中的。而根据处置对象的状况所作的某些剂量的改变是必须的。

[0215] 负责给药的人,在任何情况下,必须判断个体对象给药的大致剂量。此外,在向人类给药时,制剂必须符合如 FDA 生物制剂标准所要求的无菌、无热原、常规安全性和纯度标准。

[0216] B. 净化和除菌

[0217] 一般来说,本发明的组合物和方法可用于环境净化装置和用于军事及恐怖袭击中的受伤的治疗。对多种病原体,包括营养型细菌和包膜病毒(参见例如,Chatlyne 等,《一

种对 HIV-1 和其他常见病毒具有有效杀病毒活性的乳液》，逆转录病毒和人类健康的基础，关于逆转录和机会感染的第三次会议，华盛顿特区，美国 [1996]) 及细菌孢子的灭活，结合在试验动物中表现的低毒性，使得该乳液适宜用作常用的净化剂（在对某病原体作出判断之前）。优选的本发明的组合物迅速大量的生产，且在较宽的温度下稳定数月。这些特性提供了一种使其能广泛用于净化应用的适应性。

[0218] 例如本发明的某些制剂对于破坏多种细菌孢子生化武器种的试剂特别的有效。由此可见，本发明的组合物和方法可有效用于净化被生化武器污染的个人或者材料。本发明组合物的溶液可直接从地面向受污染的材料或者个人喷洒，也可以使用空中喷洒系统。在某些方面的应用中，本发明有效量的组合物在净化时与污染材料或者个人相接触。另外可替换的，个人净化工具可装备于有可能被生化武器污染的军事或者民用装置。

[0219] 广谱病原体，包括营养型细菌和包膜病毒（参见例如，Chatlyne 等，《一种对 HIV-1 和其他常见病毒具有有效杀病毒活性的乳液》，逆转录病毒和人类健康的基础，关于逆转录和机会感染的第三次会议，华盛顿特区，美国 [1996]) 和细菌孢子（参见例如，Hamouda 等，感染疾病杂志 180 :1939 [1999]) 结合低毒性的（对动物）灭活，舍得本发明组合物特别适用于，在对一种特定的病原体作出判断之前，作为净化试剂使用。

[0220] 因此，本发明的某些实施方案特别提出，可使用本发明组合物用作净化土壤、机械、车辆和其他设备，及可能被不期望的病原体感染的水道的消毒剂和洗涤剂。所述净化操作涉及简单的以液体喷雾剂形式的应用，或者涉及更为严格的操作制度。同样的，该乳液可用于治疗不同植物病毒的疹（代替常规抗生素或与之共同使用）。

[0221] 在用于土壤或者设备的净化之外，所述制剂还可用于制备以常规消毒为目的的家用洗涤剂。此外，本发明的一些实施方案可用于防止食物被细菌和真菌污染（例如，无毒组合物）。该操作可在食品制备过程中进行，或将组合物作为食品添加剂、消毒剂或防腐剂另外的加入食品中。

[0222] 新乳液优选用于固体的硬质表面。相应的，上述组分与一种或多种水性载体液混合。水性载体的选择并不严格。然而，它必须时安全的，与本发明乳液在化学上是相容的乳液。在一些实施方案中，水性载体液中含有常用于硬质表面清洁组合物的溶剂。所述溶剂必须与新乳液相容且在乳液 pH 下化学稳定。其必须还具有优良的成膜 / 剩余性质。用于硬质表面清洗的溶剂在，例如美国专利号 5, 108, 660 中有所记载，此处以其整体形式合并作为参考。

[0223] 在优选的实施方案中，水性载体是水或醇、水可混容的混合物。醇可用于调节组合物的粘度。在一些实施方案中，醇优选 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 的醇类。在特别优选的实施方案中，使用的是乙醇。例如在一优选的实施方案中，水性载体液是水或一种含约 0 至约 50% 乙醇的水 - 乙醇混合物。本发明同时还包括非液体的组合物。这些非液体的组合物可以是颗粒、粉末或凝胶形式的，优选为颗粒形式。

[0224] 任选的，一些组合物含有增进清洗能力及美观的辅料，条件是其不影响新乳液的活性。组合物可任选的含有一种无活性的辅料表面活性剂。可任选的使用多种的有机类、水 - 溶性的表面活性剂。辅料表面活性剂的选择依赖于组合物的使用目的的要求和表面活性剂商业的可利用性。其他任选的添加剂，例如香料，增亮剂、酶、着色剂等等可用于组合物中以增加美观和 / 或清洗性能。洗涤组分液可用于组合物中。洗涤组分能整合可与辅料表

面活性剂或辅助表面活性剂相结合且降低效果的钙和镁硬度离子。洗涤及组分在含有辅料表面活性剂或辅助表面活性剂时尤其的有用,而且当组合物在使用前用特别硬的水(例如,超过约 12grains/加仑)稀释时,洗涤组分更为有用。

[0225] 在其它实施方案中,所述组合物进一步的含有,泡沫消除剂。在这些实施方案,组合物优选含有足够量的泡沫消除剂以预防当组合物与硬质表面接触时产生的过量的泡沫。泡沫消除剂尤其在制剂中用于组合物免洗用途。泡沫消除剂可用熟知及传统的方法得到。泡沫消除剂根据其组合物制备的能力,及组合物残余及清洗情况进行选择。泡沫消除剂必须与组合物中的组分是化学可容的,其在所述 pH 范围那是有效的,且不能在清洗过的表面留下可见的残余物。低泡沫辅助表面活性剂可作为泡沫消除剂使用以介导组合物的泡沫性质。辅助表面活性剂的浓度在约 1 份到约 3%之间是比较充足的。

[0226] 在此可使用的适宜的辅助表面活性剂的离子包括块状共聚物(如 PLURONIC 和 TETRONIC 凝胶[聚(乙烯氧基)-b-聚(丙二醇氧基)-b-聚(乙烯氧基)聚合物凝胶, BASF 公司, Parsippany, NJ])及烷基化物(例如,羟乙基化物/丙氧基化物)伯醇和仲醇(例如, TERIGTOL [Union Carbide, Danbury, CT]; POLY-TERGENTO [Olin 公司, Nowalk, CT])。任选的泡沫消除剂优选含有一种硅树脂基材料。这些材料很低的浓度即可有效的作为泡沫消除剂使用。在的浓度下,此硅树脂基泡沫消除剂不易影响组合物的清洗效果。适宜的硅树脂基的泡沫消除剂的使用实例是 Dow Corning DSE。该任选的,但是优选的硅树脂基的泡沫消除剂可用熟知及传统方法结合到所述组合物中。

[0227] 在其它实施方案中,组合物可由健康护理工作使用,或由任何接触微生物感染的人或者区域的人使用,用于满足健康安全和净化的需要。另外,本发明乳液可制成喷雾剂用于医院和家庭使用,例如清洁及消毒医学装置和病房、家用器具、厨房和浴室表面等。在相同的实施方案中,当环卫及环境服务工人、食品处理和农业工人及实验室人员有可能与感染性生物试剂接触时使用该组合物。另外,组合物可在旅行者及有可能接触隐藏感染物质和致病试剂的人上使用。

#### [0228] C. 食品的制备

[0229] 本发明此处记载的某些组合物也可用于食品的加工和制备工业,以预防和处置由生长于食品中的细菌、真菌和毒素导致的食品污染。因此,所述组合物可用于降低或抑制微生物的生长或者消除微生物污染食品有害结果。为了实施这些应用,该乳液组合物以食品工业可接受的形式使用,例如添加剂、防腐剂或调味剂。

[0230] 术语“食品工业可接受的”是指当被人或动物口服时基本上不产生负反应或过敏反应的组合物。正如此处所指的,“食品工业介质中可接受的”包括任一及所有溶剂、分散物质、任一及所有香料和草药及其提取物。除了任一常用添加剂之外,防腐剂和调味剂与本发明的乳液是不相容的,它们用于预防或者处置食物中生长的微生物和它们的毒性产物。追加的活性成分也可合用加入组合物中。在用于这些应用时,可接受的载体可以形成液体、霜剂、泡沫剂且可以附加的含有溶剂、乳化剂、凝胶剂、增湿剂、稳定剂、湿润剂、防腐剂、螯合剂、着色剂、香料和其他常用于食品加工业中的组分。

[0231] 在本发明的另一实施方案中,组合物可特别设计成用于例如消毒或灭菌食品工业装置、设备及食品操作、包装合储藏区域所用。为实施此类应用,组合物可便利的以液体或泡沫的形式使用,且可以与乳化剂、表面活性剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂和其他此类组合物

中常见的组分一起使用。在一些实施方案中,组合物在运输产品或者农业产品期间或之前用于这些货物上。本发明的组合物可以充入到吸收性材料中,其通常用于包装材料中以防止食物在运输合储存中被污染(例如,卡纸板或纸包装)。其他此类型的传输系统都是为本领域技术人员所显而易见的。

[0232] 本发明组合物中乳液合增强剂的确切的量可以改变,从而得到适宜浓度的乳液及增强剂以有效的预防或抑制由食物中生长的微生物及其毒素感染造成的食物污染。相应的,浓度的选择根据食品的性质、包装、储存方式和其他因素而决定。通常的,本发明乳液组合物可在液体组合物中含有至少 0.001% 至约 90% 的乳液。可以想见,所述制剂每毫升液体组合物中可含有约 0.001%, 约 0.0025%, 约 0.005%, 约 0.0075%, 约 0.01%, 约 0.025%, 约 0.05%, 约 0.075%, 约 0.1%, 约 0.25%, 约 0.5%, 约 1.0%, 约 2.5%, 约 5%, 约 7.5%, 约 10%, 约 12.5%, 约 15%, 约 20%, 约 25%, 约 30%, 约 35%, 约 40%, 约 50%, 约 55%, 约 60%, 约 65%, 约 70%, 约 75%, 约 80%, 约 85%, 约 90%, 约 95% 或约 100% 的乳液。应当理解,上述在任意两数字之间的范围是特定的范围,其属于本发明步长及范围之内。

[0233] 在特定的实施方案中,乳液可用作消毒剂和洗涤剂以净化和预防食品、土壤、水、机械及其他设备和动物的微生物感染。

[0234] 本发明乳液可用于食品工业以防止污染。例如在食品中含有该乳液可以有效的杀灭可偶然导致肉类或家禽污染的细菌。这样还允许食品业使用一种潜在的广谱(抗菌)食品以降低成本。

[0235] 本发明的某些实施方案也可用于饮料工业。例如新乳液可加入到汁液产品中以预防某种真菌的生长,该生长引起污染及导致霉菌毒素产生的,对消费者是很危险的。通过加入少量的本发明乳液,可以预防果汁中最普通的真菌污染。只需乳液的万分之一(不会改变果汁的味道及其组分的量)即可达到该效果。

[0236] 新乳液可用于基本去除机械及其他设备上传染性试剂的。例如乳液可用于除去肉加工植物(车间),尤其是有机物,例如单核细胞增生李斯特菌,该应用通过在连续的基低上用乳液清除屠宰场或食品包装设备进行。

[0237] 负责给药的人员,在任何情况下,判断作为个体使用的适宜剂量。此外,所述应用必须符合 FDA 要求的通常的安全性和纯度标准。

[0238] D. 试剂盒

[0239] 在本发明的其他实施方案中,方法和组合物,或方法和组合物中的组分可以制在单一的制剂中,或者在独立制剂中分开,在使用时再混合,以适应特殊的应用需要。所述组分可有利的置于试剂盒中以对抗微生物引起的感染、净化仪器等等。在一些实施方案中,所述器具含有所有向反应点传输本发明所述制剂所必需的材料和试剂。

[0240] 在一些实施方案中,用于体内使用时,本发明的方法和组合物可制备成单一的或分离的药学可接受的可注射的组合物。在这种情况下,容器本身可以是吸入器、注射器、移液管、眼滴管,或其他相似仪器,所述制剂通过这些器具供应到身体的感染部位(例如肺部),及注射到动物中,或者用这些器具容器中的其他组分混合。

[0241] 本发明的试剂盒也可典型的包括容纳小瓶的装置,该小瓶为接近分娩中使用的,市场有售(例如,注射剂或气模塑料容器,在其中留有所需的小瓶)。与容器的数量和型号无关的,本发明器具还可含有协助注射/给药或在动物体内放置最终的复合组合物的仪

器,或与该仪器在同包装内。所述仪器可以是吸入器、注射器和消毒凸轮、移液管、镊子、量匙、眼药水滴管或任一所述医学许可的传输载体工具。

#### [0242] E. 修饰、制备和传输

[0243] 本发明进一步的提供:多种用于修饰本发明纳米乳液的方法和体系,将纳米乳液与其他产品、包装的结合及传输本发明的组合物,以及与使用或处理可能被微生物污染的物料或样本相关的费用的降低方法。以下说明书意在简单的提供一些修饰、制备、及传输本发明组合物的例子。本领域技术人员能理解所述方法的变换形式。

[0244] 在一些实施方案中,本发明提供用于改进和改变所述纳米乳液的方法。这些方法包括,例如取出所述的纳米乳液,然后改变纳米乳液的一种或多种组分。这样的改变包括但不限于,加入或除去一种或多种组分。改变的纳米乳液可进行测试以判断其是否具有所需的或可用的性质。在本发明的一些实施方案中,对本发明的纳米乳液,或从本发明衍生的纳米乳液进行稀释。稀释的样本可经测试判断其是否保留了所需的功效。在本发明的另一实施方案中,本发明的纳米乳液,或从本发明衍生的纳米乳液可通过质量控制(QC)和/或质量保证(QA)程序以确保售卖的纳米乳液,或者,向使用者或零售业主递交的纳米乳液的适应性。

[0245] 在本发明的一些实施方案中,本发明的纳米乳液可加到另一种产品中以提高或者改进产品的抗菌能力,或者对怀疑的污染进行测定,或者,产品的抗微生物能力在感观上有所改进(即,本发明纳米乳液的附加成分加入到产品中是属于本发明范围内的,无论其是否具有可检测的,或者,任一的抗微生物活性)。例如在一些实施方案中,将本发明的纳米乳液加入到清洗或者消毒物料中(例如,家用清洗剂)。在其它实施方案中,可将纳米乳液加入到医用或急救物料中。例如,可将纳米乳液加入到(或直接作为)灭菌剂和创伤护理产品而使用。在另一些实施方案中,纳米乳液可加入到工业产品中。例如在一些实施方案中,纳米乳液可加入到机油中以防止或减轻,如真菌污染。如上所述,可以使用机油作为油相组分合成有效的,稳定的乳液(例如, $W_{20}5GCMobil 1$ )。在其它实施方案中,纳米乳液可加入到食品中。例如可将纳米乳液加到饮料中以防止不期望的生物在其中生长。

[0246] 本发明的纳米乳液,无论是单独使用,或与其他物料结合使用,均可提供多种不同类型的容器和传输体系。例如在本发明的一些实施方案中,纳米乳液是霜剂或其他固体或半固体的形式。在本发明研究过程中,人们认为本发明的乳液可以在保持其抗微生物活性的同时(与其他组分)合制成水凝胶制剂。水凝胶中使用乳液可获得多种有用的性质。例如水凝胶可以制成具有所需尺寸和形状的半固体的结构。这样就使得,例如,水凝胶材料能插入到试管或其他通路中制备抗微生物的过滤器(即,本发明的乳液可净化穿过水凝胶的材料)。

[0247] 纳米乳液可在任一适宜的容器传输(例如,向使用者或消费者的传输)。适用的容器能提供所需的一种或多种单一用途的纳米乳液剂量或多用途剂量。在本发明的一些实施方案中,纳米乳液可以是混悬液或液体的形式。所述纳米乳液可用任一适宜的容器包括喷洒壶(例如,压力喷洒壶)传输。当用于工业或者其他大规模的使用,大体积(例如,几十到几千升)的纳米乳液可放置在单个的容器中,该容器经适当的装配适合纳米乳液的分发及使用。

[0248] 在本发明某些优选的实施方案中,本发明纳米乳液可与现行的商业运作相结合以降低与商业运作中安全操作有关的费用及,用于改进安全操作的费用。例如使用本发明的纳米乳液可降低与使用或处置可能被微生物感染的物料或样本有关的费用。在一些实施方案中,本发明的纳米乳液可用于改善安全性或降低与医疗工业有关的费用。例如纳米乳液

可用于医用物料（例如，与动物、人类或生物样本接触的表面）或用于病人的（例如，体内的或体外的）廉价有效的灭菌剂。纳米乳液还可用作食品加工和处理及食品工业应用的廉价有效的灭菌剂。在某些这样的实施方案中，本发明提供了一种无毒的纳米乳液。例如，最近，此处纳米乳液含有的组分在医学、农业和食品上的应用通过了相应控制机构（例如，FDA、USDA 等）的认证。此外，此处还提供了含所需功能的附加纳米乳液的生产方法，该乳液可组成完全无毒及通过（检验）的物质。如此，本发明的纳米乳液的应用无需长时间的消耗及为了获得规定的认证所进行的高价的操作。事实上，乳液的毒性要小于单独组分毒性的总和。例如，X8PC 被测试用于比较乳液对血琼脂平板上测定的绵羊血细胞的溶血效果，该效果与非乳化成分的混合物溶血效果相比较。比较数据见图 34。图 34 中的两条粗线显示 X8PC 纳米乳液的溶血效果，其效果与所有组分的非乳化混合物的溶血效果相比较。

#### [0249] V. 具体实施例

[0250] 以下实施例用以阐述某些本发明的优选的实施方案及方面，其不能理解为用以限制本发明的范围。

[0251] 在以下的实验发现中，使用如下的缩写符号：eq（等价物）； $\mu$ （微米）；M（每摩尔）； $\mu$ M（每微摩尔）；mM（每毫摩尔）；N（正常）；mol（摩尔）；mmol（毫摩尔）； $\mu$ mol（微摩尔）；nmol（纳摩尔）；g（克）；mg（毫克）； $\mu$ g（微克）；ng（纳克）；L（升）；ml（毫升）； $\mu$ l（微升）；cm（厘米）；mm（毫米）； $\mu$ m（微米）；nM（每纳摩尔）； $^{\circ}$ C（摄氏度）；和 PBS（磷酸盐缓冲盐水）。

#### [0252] 实施例 1

##### [0253] 制备乳液的方法

[0254] 所述乳液按如下步骤制备：将有机溶剂、油类和表面活性剂混合，然后加热所得混合物至 37–90 $^{\circ}$ C 持续至多 1 小时，得到油相。再使用交互注射器或 Silverson 高速剪切混合器制备。向油相中加入水相且混合 1–30 分钟，优选 5 分钟。若乳液含有挥发性的组分，这些组分应与水相一起加入。

[0255] 在一特定的实施方案中，按以下步骤制备该乳液：混合磷酸三丁酯、大豆油和表面活性剂（如，TRITON X-100），然后加热所得混合物至 86 $^{\circ}$ C 下 1 小时，得到油相。以体积/体积比例为一份油相对四份水的比例向油相中注射水分以制备乳液。乳液可以人工的，使用往复注射器，或分批的，或使用连续流动器进行生产。制备这些乳液的方法对于本领域技术人员是熟知的，且记载在，例如，美国专利号 5, 103, 497；和 4, 895, 452 中，（此处合并作为整体参考）。表 2 显示的是每一组分的比例、pH 值和乳液的粒度，乳液粒度是在安装有循环水浴的库尔特 LS 130 激光尺寸测量器（Coulter LS 130 laser sizing instrument）上测定的。

#### [0256] 表 2

##### [0257]

乳液的化学组分	每一组分的百分数	pH 值	平均库尔特粒径（微米）	平均库尔特范围（微米）
BCTP				

TRITON X-100	2%	5.16	1.074	0.758-1.428
磷酸三丁酯	2%			
油类 (ex. 大豆油)	16%			
水分	80%			
BCTP 0.1*				
TRITON X-100	0.20%	5.37	0.944	0.625-1.333
磷酸三丁酯	0.20%			
油类 (ex. 大豆油)	1.60%			
水分	98%			

[0258] \* 该乳液通过将 BCTP 乳液用水以 1 : 9 的比例稀释

[0259] 本发明的乳液非常稳定。事实上,按上述方法制备的乳液贮存在密封的 50-1000mL 的聚丙烯试管中,在室温下放置存在一整夜。然后检查乳液的分离迹象。没有显示分离迹象的乳液被认为是“稳定的”。稳定的乳液再经一年的监测,发现其仍然保持其稳定状态。

[0260] 再次用上述方法制备乳液,然后在密封的 50mL 聚丙烯试管中,在 -20℃ 下放置一整夜。然后监测乳液的分离迹象。没有分离迹象的乳液被认为是“稳定的”。BCTP 和 BCTP 0.1 乳液在室温下储存,至少 24 个月内基本无变化。

[0261] 实施例 2

[0262] 本发明一种以液滴中乳化的脂质体的形式存在的示例性细菌 - 灭活乳液的特性

[0263] 本发明的一种细菌灭活乳液,定义为  $X_8W_{60}PC$ ,经一种含脂质的水包油乳液与 BCTP 混合而成。确切的说,一种,一种含脂质的水包油乳液(此处指 GMO/CPC 脂质乳液或“ $W_{80}8P$ ”),含有作为初级脂质的甘油单油酸酯(GMO),和作为正电荷制备剂的氯化鲸蜡基吡啶鎓(CPC)和 BCTP 以 1 : 1(体积比体积)的比例混合。美国专利号 5,547,677(此处以其整体形式合并作为参考),记载了能与 BCTP 相结合以制备本发明细菌 - 灭活水包油乳液的 GMO/CPC 脂质乳液和其他相关的脂质乳液。

[0264] 实施例 3

[0265] 体外杀菌效果的研究 I- 革兰氏阳性菌

[0266] 为了研究本发明的乳液杀菌效果,将乳液与多种细菌混合 10 分钟,然后用标准微生物介质覆盖以进行不同稀释。与未经处理的培养物比较菌落的数量以判断经过处置后杀灭的细菌百分数。表 3 概括了该试验的结果。

[0267] 表 3

[0268]

生物体	培养液 (CFU)	杀灭%	测试乳液
霍乱弧菌 classical 种	$1.3 \times 10^8$	100	BCTP
霍乱弧菌 Eltor 种	$5.1 \times 10^8$	100	BCTP
副溶血弧菌	$4.0 \times 10^7$	98-100	BCTP

[0269] 为了研究本发明的乳液对不同杆菌种营养型的杀菌效果,一种乳液稀释成三份稀释液,与四种杆菌种型混合 10 分钟,然后用微生物介质覆盖。与未经处理的培养物比较菌落的数量以判断经过处置被杀灭的细菌百分数。表 4 包含了概括从几项试验得到杀菌结果,括号中是平均杀菌百分数。

[0270] 表 4

[0271]

BCTP/ 稀释液	蜡状芽孢杆菌	环状芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌
1 : 10	99% (99%)	95-99% (97%)	99% (99%)	99% (99%)
1 : 100	97-99% (98%)	74-93% (84%)	96-97% (96%)	99% (99%)
1 : 1000	0% (0%)	45-60% (52%)	0-32% (16%)	0-39% (20%)

[0272] 实施例 4

[0273] 体外杀菌效果的研究 II- 革兰氏阴性菌

[0274] 为了增加革兰氏阴性菌细胞壁对细菌灭活乳液的摄取,因此加强了乳液对耐受革兰氏阴性菌杀微生物的效果,EDTA(乙二胺四乙酸)先与乳液预混合。试验中使用低浓度的 EDTA(50-25  $\mu$  M),混合物用不同的革兰氏阴性菌培养 15 分钟。混合物的杀菌效果在胰酪胨胨培养液上测定。结果在下文表 5 中详述。使用 BCTP 1/100 的稀释液能导致 99% 细菌数量的减少。细菌数的降低不能归结为 EDTA 单独的杀灭效果,因为在控制组中单独使用 250  $\mu$  M EDTA 的结果显示其不能在 15 分钟内降低细菌的数量。

[0275] 表 5

[0276]

细菌属种	单独的细菌	细菌 +BCTP (CFU)	细菌 +BCTP+EDTA (CFU)	细菌 +EDTA (CFU)
鼠伤寒杆菌	1,830,000	1,370,000	40	790,000
痢疾螺旋体	910,000	690,000	0	320,000

[0277] 实施例 5

[0278] 体外杀菌效果的研究 III- 营养型和孢子型

[0279] 蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*, ATCC#14579) 用作炭疽杆菌的模型体系。开展使用 BCTP 稀释制剂用以研究本发明化合物对营养型(活跃生长的)蜡状芽孢杆菌的杀菌效果的试验。评估在 37°C 下在介质中的处置 10 分钟情况。如表 6 所示, BCTP 乳液能有效对抗营养型蜡状芽孢杆菌。在所有测试浓度(包括高至 1 : 100 的稀释浓度)的所述制剂中暴露 10 分钟足以完全杀灭营养型蜡状芽孢杆菌。

[0280] 表 6

[0281]

乳液	未稀释的	1 : 10 稀释	1 : 100 稀释
BCTP	> 99% 平均=> 99%	> 99% 平均=> 99%	59- > 99% 平均= 82%

[0282] 试验次数 = 4

[0283] 孢子型炭疽杆菌是作为生物武器使用的常用生物体之一。人们熟知,孢子对大多数消毒剂具有高的耐受力。如上文所述,有效的杀灭孢子通常要求使用毒性和刺激性的化学物质,例如甲醛或次氯酸钠(如,漂白剂)。因此对孢子型蜡状芽孢杆菌进行同样的试验。如表 7 所示,在 37°C 下的所有的介质中处置 10 分钟不能有效的杀灭孢子型蜡状芽孢杆菌。

[0284] 表 7

[0285]

乳液	未稀释的	1 : 10 稀释	1 : 100 稀释
BCTP	0% -12% 平均= 6%	0% 平均= 0%	0% 平均= 0%

[0286] 试验次数 = 2

[0287] 为了评估本发明化合物对孢子型蜡状芽孢杆菌长时间的效果,BCTP 以 1 : 100 的稀释度加入到固体凝胶介质中,孢子则不均匀的涂在介质表面上,在 37°C 下培养 96 小时。在加入 BCTP 的固体凝胶介质中没有发生(细菌)生长,96 小时以外(即,> 99%的杀灭率,平均值> 99%,试验三次)。

[0288] 为了更接近的确定 BCTP 存在时杀灭孢子的时间,实施了以下试验。简单的说,一种孢子制剂用 1 : 100 稀释的 BCTP 处置,且与未处置的组比较。分别测定 0.5、1、2、4、6 和 8 小时后每毫升菌落形成单位(CFU/ml)的数量。如图 1 所示,在最初的 4 小时的培养后,未处置组的 CFU/ml 有增加,然后到达一个坪浓度。在 0 时间和 1、2、4 和 6 小时制作用孢子结构接种的细菌涂片,涂片显示 2 个小时内孢子结构已经不存在了(图 2A-2C)。因此,在未处置组中在 2 小时的点,孢子发生 100%的萌发。在用 BCTP 处置的孢子制剂中,CFU/ml 在最初 2 小时内没有显示增加的迹象,然后在 2-4 小时后快速的下降。2-4 小时后从 CFU/ml 基线水平的下降大约 1000 倍。在相同时间点制作的用孢子结构接种的细菌涂片显示孢子结构在 8 小时内一直保持到试验末。因此,在用 BCTP 熟知的组中没有发生孢子萌发,这可归结为萌发过程被抑制,或,由于孢子被破坏不能进行萌发。为了判断乳液是否能有效的杀灭除蜡状芽孢杆菌以外其他杆菌属种,我们按以上方法实施了相同的试验,其中孢子制剂用乳液和处置,并在培养 4 小时后与未处置组进行比较。试验结果如下述表 8 所示,其中的数字表示从几项试验中得出的平均杀孢子活性。

[0289] 表 8

[0290]

BCTP/ 稀释度	蜡状芽孢杆菌	环状芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌
1 : 10	82%	61%	93%	31%
1 : 100	91%	80%	82%	39%
1 : 1000	47%	73%	94%	22%

[0291] 实施例 6

[0292] 体内杀菌效果的研究

[0293] 我们通过进行动物研究以阐述本发明乳液体内的保护和治疗效果。事先以试验动物的蜡状芽孢杆菌感染作为研究炭疽的模型体系 (Burdon 和 Wende, 1960 ;Burdon 等, 1967 ; Lamanna 和 Jones, 1963)。试验动物蜡状芽孢杆菌感染诱发的疾病综合症在某些方面与炭疽杆菌相似 (Drobniewski, 1993 ;Fritz 等, 1995)。在向小鼠注射前, 先将新乳液与蜡状芽孢杆菌的孢子进行混合。

[0294] 冲洗皮肤创伤

[0295] 用  $2.5 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子感染 1cm 的皮肤伤口, 感染接种后不再进行进一步的处置。其他的试验组用相同数量的孢子感染。一小时后, 伤口用新乳液或者盐水冲洗以模拟后 - 暴露 (post-exposure) 净化。48 小时后, 在伤口周围出现了大面积的坏死, 其平均面积为  $4.86\text{cm}^2$ 。此外, 该组中 60% 的动物由于感染而死亡。这些损害情况的组织学研究显示真皮及皮下全部的坏死, 且存在大量的营养型杆菌生物体。用盐水冲洗试验性感染的伤口没有任何明显的效果。

[0296] 用新乳液冲洗蜡状芽孢杆菌孢子感染的伤口产生了显著的效果, 其结果是损伤面积持续从  $4.86\text{cm}^2$  降低到  $0.06\text{cm}^2$ 。伴随着损伤面积的降低, 与没有处置或者用盐水冲洗的试验动物相比, 动物的死亡率也下降了三倍 (从 60% 到 20%)。这些损害情况的组织学研究显示营养型杆菌生物体已不存在, 且真皮的损坏降低到了最小 (Hamouda 等, 1999)。

[0297] 皮下注射

[0298] 用盐水 1 : 10 稀释的新乳液注射的 CD-1 小鼠作为对照组, 且无论在整体或组织学上均未显示出痛苦或炎症反应的迹象。为了测试蜡状芽孢杆菌孢子的体内致病效果及新乳液的杀孢子能力, 将含  $4 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子的混悬液与盐水或者新乳液混合并最终稀释成 1 : 10 浓度, 随之立即在 CD-1 小鼠背上进行皮下注射。

[0299] 皮下感染蜡状芽孢杆菌孢子且未经新乳液处置的小鼠在 6-8 小时内出现了水肿。之后 18-24 小时在针孔周围出现了灰色的坏死面积, 在 48 小时后伴有严重的皮肤腐肉, 并留下一个干燥、红色的病灶。

[0300] 同时注射孢子和新乳液的小鼠 (即当孢子预先与新乳液混合时), 其坏死病灶面积的降低超过了 98%, 从  $1.68\text{cm}^2$  降低到  $0.02\text{cm}^2$ 。该情况与水肿和炎症的减轻有关 (Hamouda 等, 1999)。

[0301] 兔眼角膜

[0302] 用不同浓度的新乳液冲洗兔眼角膜, 并监测 24 及 48 小时。当使用治疗剂量的组合物时, 未观察到刺激及反常现象。

## [0303] 粘膜

[0304] 在小鼠的每只鼻孔内输入 25  $\mu$ L 4% 的纳米乳液以测定乳液的鼻内毒性。结果小鼠身上未发现临床或病理组织学上的变化。

[0305] 向大鼠给予最多 8mL 每 kg 的 25% 纳米乳液以测定乳液口服毒性。结果大鼠未显示体重减轻迹象或临床上或病理组织学上的毒性迹象。我们也未观察到乳液口服给药引起的肠道菌群变化。

[0306] 在一特定的实施方案中,蜡状芽孢杆菌在血液琼脂(含 5% 绵羊血液 TSA, REMEL) 上传递三次。从第三次传递的平板上卸下蜡状芽孢杆菌,并与胰酪胨培养液(TSB)(可从 BBL 中得到)重新混悬。该蜡状芽孢杆菌混悬液成分装入两根试管中。向一根试管加入相同体积的消毒盐水,并将 0.1cc 的蜡状芽孢杆菌混悬液/盐水混合物对 5 只小鼠进行皮下注射。向另一试管加入相同体积的 BCTP(用消毒盐水 1 : 5 稀释)并混合,最终得到 BCTP 1 : 10 的稀释液。蜡状芽孢杆菌混悬液/BCTP 在 37°C 培养 10 分钟,即用 0.1cc 蜡状芽孢杆菌混悬液/BCTP 的混合物对 5 只小鼠进行皮下注射。混合相同体积的 BCTP(用消毒盐水 1 : 5 稀释)和 TSB,最终得到以 1 : 10 稀释的 BCTP。将 0.1cc 该 BCTP/TSB 对 5 只小鼠皮下注射。

[0307] 用如下方法计算蜡状芽孢杆菌在接种物上的菌落形成单位(cfu)数量:用蒸馏水制成蜡状芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌/BCTP 混悬液的 10 倍数系列稀释液。每一稀释液各接种在 TSA 复制平板上(10  $\mu$ l 每平板)。TSA 平板在 37°C 下培养一整夜。再计量菌落数,计算 cfu/cc 的数量。小鼠坏死病灶的尺寸比用预先作 BCTP 处置的蜡状芽孢杆菌接种的小鼠要小一些。以下表 9 给出了试验结果。

## [0308] 表 9

## [0309]

接种物	ID#	观察结果(24 小时)
蜡状芽孢杆菌 3.1 $\times 10^7$ cfu/ 小鼠	1528	注射部位有腐肉(坏死)
	1529	注射部位有腐肉
	1530	死亡
	1531	死亡
	1532	注射部位有腐肉
蜡状芽孢杆菌 8.0 $\times 10^5$ cfu/ 小鼠 (经 BCTP 处置)	1348	注射部位有腐肉
	1349	无反应
	1360	无反应
	1526	注射部位有腐肉
BCTP/TSB	1527	注射部位有腐肉
	1326	无反应
	1400	无反应
	1375	无反应
	1346	无反应
	1347	无反应

[0310] 蜡状芽孢杆菌在营养琼脂(Difco)上生长,该琼脂含有用以诱导孢子成形的 0.1%

酵母提取物 (Difco) 和  $50 \mu\text{g/ml MnSO}_4$ 。将平板卸下,在灭菌的 50%乙醇中混悬,并在室温下培养 2 小时,伴随着激烈的搅拌以溶解剩余的营养型细菌。混悬液用  $2,500 \times \text{g}$  离心 20 分钟,弃去上清液。余下颗粒物用  $\text{diH}_2\text{O}$  重新混悬,再用  $2,500 \times \text{g}$  离心 20 分钟,弃去上清液。孢子混悬液终于分开了。剩余颗粒物用 TSB 再混悬。0.1cc 蜡状芽孢杆菌孢子混悬液用盐水 1 : 2 稀释,然后对 3 只 CD-1 小鼠皮下注射。混合相等体积的 BCTP(用 1 : 5 消毒盐水稀释)和蜡状芽孢杆菌孢子混悬液,最终得到 BCTP1 : 10 的稀释液(预温育时间)。向 3 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc BCTP/蜡状芽孢杆菌孢子混悬液。在培养液中蜡状芽孢杆菌的菌落形成单位(cfu)的数量用以下方法计算:用蒸馏水将蜡状芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌 BCTP 混悬液稀释成 10 倍数的稀释液。用每一稀释液(10ul 每平板)接种 TSA 的复制平板。TSA 平板在  $37^\circ\text{C}$  培养一整夜。计量菌落数以计算 cfu/cc 的数量。小鼠坏死病灶的尺寸比用预先作 BCTP 处置的蜡状芽孢杆菌孢子接种的小鼠要小一些。表 10 给出了所作研究的观察结果。

[0311] 表 10

[0312]

接种物	观察结果 (24 小时)
蜡状芽孢杆菌孢子 $6.4 \times 10^6$ / 小鼠	2/3(66%) 老鼠在注射点有坏死
蜡状芽孢杆菌孢子 $4.8 \times 10^6$ / 小鼠 (经 BCTP 处置)	1/3(33%) 老鼠在注射点有坏死
蜡状芽孢杆菌营养型 $4.8 \times 10^6$ / 小鼠	3/3(100%) 老鼠在注射点有坏死
溶解的蜡状芽孢杆菌营养型 $4.8 \times 10^6$ cfu / 小鼠	3/3(100%) 老鼠没有症状
BCTB/TSB	1/3(33%) 有一些皮肤坏死

[0313] 蜡状芽孢杆菌在营养琼脂 (Difco) 上生长,该琼脂含有用以诱导孢子成形的 0.1%酵母提取物 (Difco) 和  $50\text{g/ml MnSO}_4$ 。将平板卸下,在灭菌的 50%乙醇中混悬,并在室温下培养 2 小时,伴随着激烈的搅拌以溶解剩余的营养型细菌。混悬液用  $2,500 \times \text{g}$  离心 20 分钟,弃去上清液。余下颗粒物用  $\text{diH}_2\text{O}$  重新混悬,再用  $2,500 \times \text{g}$  离心 20 分钟,弃去上清液。颗粒物用 TSB 再次混悬。蜡状芽孢杆菌孢子混悬液分装入 3 只试管。将相同体积的消毒盐水加到一根试管中,进行混合。对 10 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 蜡状芽孢杆菌混悬液/盐水。将同体积的 BCTP(用 1 : 5 消毒盐水稀释)加到第二根试管中,并混合,得到 BCTP 以 1 : 10 稀释的最终稀释液。将混合后的蜡状芽孢杆菌孢子混悬液/BCTP(1 : 10) 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4 小时。向 10 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 蜡状芽孢杆菌孢子混悬液/BCTP(1 : 10)。将相同体积的 BCTP(用消毒盐水 1 : 50 稀释)加入到第三根试管中,并混合,得到以 1 : 100 稀释的 BCTP 稀释液。将混合后的蜡状芽孢杆菌孢子混悬液/BCTP(1 : 100) 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4 小时。向 10 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 蜡状芽孢杆菌孢子混悬液/BCTP(1 : 100)。

将相同体积的（以消毒盐水 1 : 5 稀释）和 TSB 混合，得到以 1 : 10 稀释的 BCTP 稀释液。向 10 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 的 BCTP/TSB。将相同体积 BCTP（用消毒盐水 1 : 50 稀释）和 TSB 混合，得到以 1 : 100 稀释的 BCTP 稀释液。向 10 只 CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 的 BCTP/TSB。从这些研究中得出的观察结果见于表 11 和表 12。

[0314] 表 11

[0315]

接种物	ID#	24 小时观察结果
蜡状芽孢杆菌孢子 5.5×10 <sup>7</sup> /小鼠 未处置组	1	2.4cm <sup>2</sup> 皮肤病灶， 伴随 0.08cm <sup>2</sup> 面积的坏死
	2	未观察到异常现象
	3	垂死，伴有皮肤及背部病灶
	4	肢杆瘫痪
	5	3.52cm <sup>2</sup> 皮肤病灶
	6	1.44cm <sup>2</sup> 皮肤病灶
	7	3.4cm <sup>2</sup> 皮肤病灶
	8	5.5cm <sup>2</sup> 皮肤病灶
	9	5.5cm <sup>2</sup> 皮肤病灶
	10	3.3cm <sup>2</sup> 皮肤病灶， 伴随 0.72cm <sup>2</sup> 面积的坏死 2.64cm <sup>2</sup> 皮肤病灶，伴随两处皮肤坏死 (0.33cm <sup>2</sup> 和 0.1cm <sup>2</sup> ) 在单独孢子组中平均病灶尺寸为 3.97 cm <sup>2</sup> (1/10(10%)，且无异常现象)

[0316] 注意：皮肤损伤为灰色，伴随有水肿，坏死部位红色 / 干燥。

[0317] 表 12

[0318]

接种物	编号	24 小时观察结果
蜡状芽孢杆菌孢子 2.8×10 <sup>7</sup> /小鼠 BCTP1 : 10 处置组	41	无异常现象
	42	无异常现象
	42	1.2cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶，中心为灰色，有轻微水肿
	44	0.78cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶
	45	0.13cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶
	46	2.2cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶
	47	1.8cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶，中心面积为棕色
	48	1cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶，中心为灰色
	49	0.78cm <sup>2</sup> 白色皮肤病灶
	50	无异常现象 用 BCTP1 : 10 处置组的病灶平均尺寸 = 1.13cm <sup>2</sup> (3/10(30%) 没有异常现象)

蜡状芽孢杆菌孢子 1.8×10 <sup>7</sup> /小鼠 BCTP1 : 100 处置组	51	2.1cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	52	0.72cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	53	1.5cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	54	1.2cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	55	3.15cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	56	0.6cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	57	0.5cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	58	2.25cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶
	59	4.8cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶, 伴随直径 1cm 的坏死
	60	2.7cm <sup>2</sup> 皮肤灰色病灶 用 BCTP1 : 100 处置组的病灶平均尺寸 = 1.9cm <sup>2</sup> (0/10(0%)) 没有异常现象
单独用 BCTP1 : 10 处置	11	2.6cm <sup>2</sup> 白色面积
	12	0.15cm <sup>2</sup> 白色面积
	13	无异常现象
	14	0.15cm <sup>2</sup> 白色面积
	15	0.35cm <sup>2</sup> 白色面积
	16	无异常现象
	17	0.12cm <sup>2</sup> 白色面积
	18	无异常现象
	19	0.56cm <sup>2</sup> 白色面积
	20	0.3cm <sup>2</sup> 白色面积 单独 BCTP1 : 10 组的病灶平均尺寸 = 0.60cm <sup>2</sup> (3/10(30%)) 没有异常现象
单独用 BCTP1 : 100 处置	21-30	无异常现象 单独 BCTP1 : 100 组的病灶平均尺寸 = 0cm <sup>2</sup> (10/10(100%)) 没有异常现象
单独用 TSB	31-40	无异常现象 单独 TSB 组的病灶平均尺寸 = 0cm <sup>2</sup> (10/10(100%)) 没有异常现象

[0319] 从小鼠的皮肤病灶、血液、肝脏和脾脏中尝试重新分离蜡状芽孢杆菌(表 13)。皮肤病灶用 70% 消毒异丙醇冲洗后用 betadine 清洗干净。在病灶和擦洗处边缘作一切口。小鼠胸部用 70% 消毒异丙醇冲洗后用 betadine 清洗干净。用心脏穿刺术抽出血液。其腹部用 70% 消毒异丙醇冲洗后用 betadine 清洗干净。皮肤和腹部肌肉用分别的消毒仪器断开。使用分别的消毒仪器取出肝脏和脾脏样本。先将肝脏和脾脏样本快速通过火焰,再用消毒仪器剪切。新鲜暴露的表面用于接种。接种 BHI 琼脂(Difco)且在 37°C 下有氧培养一整夜。

[0320] 表 13

[0321]

接种物	编号	尸体解剖	蜡状芽孢杆菌从皮肤病灶点的再分离
蜡状芽孢杆菌孢子 $5.5 \times 10^7$ / 小鼠 未处置组	3	24 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	6	48 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	7	48 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	8	72 小时	皮肤病灶 100cfu
	9	72 小时	皮肤病灶 25cfu
	10	72 小时	皮肤病灶 100
	1	96 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	4	96 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	5	96 小时	皮肤病灶 > 300cfu
蜡状芽孢杆菌孢子 $2.8 \times 10^7$ / 小鼠 BCTP 1 : 10 处置组	48	48 小时	皮肤病灶 17cfu
	50	48 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	46	72 小时	皮肤病灶 > 200cfu
	47	72 小时	皮肤病灶 100cfu
	49	72 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	41	96 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	42*	96 小时	皮肤病灶 20cfu
	43		未接种
	44	96 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	45		未接种
46		未接种	
			BCTP 1 : 10 处置组中平均 CFU = 192* *(3/8(38%) > 300CFU)
蜡状芽孢杆菌孢子 $1.8 \times 10^7$ / 小鼠 BCTP 1 : 100 处置组	48	48 小时	皮肤病灶 18cfu
	50*	48 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	52	72 小时	皮肤病灶 1cfu
	54	72 小时	再分离阴性
	56	72 小时	皮肤病灶 > 300cfu
	58	96 小时	皮肤病灶 173cfu
	59	96 小时	皮肤病灶 4cfu
	60	96 小时	皮肤病灶 6cfu
			BCTP 1 : 100 处置组中平均 CFU = 100 *(2/8(25%) > 300CFU)

[0322] \* 尽管小鼠无病灶,但是生物体从注射点转移。

[0323] 在向试验动物中引入蜡状芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌孢之前,先将两者进行预处理以降低其引起疾病综合症的能力。其结果反映在皮肤病灶尺寸的减小及从病灶处回收的蜡状芽孢杆菌的数量普遍降低上。另外,蜡状芽孢杆菌从血液、肝脏和脾脏重分离频率的降低显示其能防止败血症。

[0324] 实施例 7

[0325] 体内毒性研究 I

[0326] CD-1 小鼠皮下注射 0.1cc 本发明化合物,并对其炎症和 / 或坏死的情况观察 4 天。用消毒盐水制作该化合物的稀释液。从小鼠得到的组织样本保存于 10% 中性福尔马林缓冲液中以供组织病理学检查。送与组织学观察的皮肤和肌肉样本 (从用未稀释化合物注射的小鼠中得到) 的观察结果显示其有组织坏死的迹象。从注射稀释化合物小鼠中得到的组织样本没有进行组织学检查。表 14 和 15 显示了两项独立试验的结果。

[0327] 表 14

[0328]

化合物	小鼠编号	稀释度	观察结果
BCTP	1326	未稀释	坏死
	1327	未稀释	无反应
	1328	1 : 10	无反应
	1329	1 : 10	无反应
	1324	1 : 100	无反应
	1331	1 : 100	无反应
盐水	1344		无反应
	1345		无反应

[0329] 表 15

[0330]

化合物	小鼠编号	稀释度	观察结果
BCTP	1376	未稀释	坏死
	1377	未稀释	轻微坏死
	1378	1 : 10	无反应
	1379	1 : 10	无反应
	1380	1 : 100	无反应
	1381	1 : 100	无反应
盐水	1394		无反应
	1395		无反应

[0331] 几内亚猪用 1.0cc/ 位点本发明化合物进行肌肉注射 (在两条后腿上), 并对炎症和 / 或坏死迹象观察 4 天。用消毒盐水制作该化合物的稀释液。

[0332] 从几内亚猪得到组织样本的保存于 10% 中性福尔马林缓冲液中以供组织病理学检查。组织样本未经组织学检查。

[0333] 表 16

[0334]

化合物	几内亚猪	稀释度	观察结果
BCTP	1023-1	未稀释	无反应
	1023-2	1 : 10	无反应
	1023-3	1 : 100	无反应
盐水	1023-10		无反应

[0335] 体内毒性研究 I 的结果显示皮下和肌肉注射测试性化合物不会引起可观测到的组织损坏,且未在试验动物中引起痛苦反应。

[0336] 实施例 8

[0337] 体内毒性研究 II

[0338] 将一组 Sprague-Dawley 大鼠,每组含有五只雄性五只雌性大鼠,将该组大鼠置于单独的笼子中,且在给药前先让其适应五天。之后大鼠持续 14 天每天给药。在第 0-13 天内,组 1 中的每只大鼠在 14 天内连续的用管饲法连续给予三毫升 1 : 100 浓度的 BCTP。三毫升剂量是确定的对于大鼠来说的最高口服剂量。在给药的第 0 天和第 7 日之前,对每只大鼠进行称重。之后在研究期间,大鼠每星期称重一次。每天观察动物的痛苦症状与死亡率。给动物休息(不给药)14 天。在第 28 天,大鼠称重后实施安乐死。口服毒性研究中小鼠的平均重量示于表 17 中。第 0、7、14、21 和 28 天中的雄性和雌性大鼠的平均重量,及从第 0-28 天内的平均重量也示于表 17 中。在第 14 天的给药中,有一只大鼠死于操作管饲时的机械创伤。所有存活的大鼠在研究进行的 28 天内体重有所增加且未报告有疾病产生。因此,虽然大家知道单独使用磷酸三丁酯具有毒性且刺激粘膜,但是当与本发明的乳液相结合时,这些特征都消释了。相应的根据 16CFR § 1500.3, 1 : 100 浓度的 BCTP 乳液同样用于在兔子上测试其皮肤毒性。在动物试验中,乳液不刺激皮肤。

[0339] 表 17

[0340]

大鼠 编号	性 别	给药 量 mL	体重 (g) 第 0 天	体重 (g) 第 7 天	体重 (g) 第 14 天	体重 (g) 第 21 天	体重 (g) 第 28 天	增加体重 (g) 第 0-28 天
9028	雄	3	332.01	356.52	388.66	429.9	394.07	62.06
9029	雄	3	278.62	294.65	296.23	310.7	392.6	113.98
9030	雄	3	329.02	360.67	325.26	403.43	443.16	114.14
9031	雄	3	334.64	297.04	338.82	357.5	416.89	82.25
9032	雄	3	339.03	394.39	347.9	331.38	357.53	18.5
均重			266.26	340.65	339.37	400.85	78.18	
9063	雌	3	302	298.08	388.66	338.41	347.98	45.98
9064	雌	3	254.54	247.97	256.78	278.17	279.2	24.66
9065	雌	3	225.99	253.81	273.38	290.54	308.68	82.69
9066	雌	3	246.56	260.38	266.21	235.12	272.6	26.04
9067	雌	3	279.39	250.97	死亡			
均重			261.69	262.24	296.25	285.56	302.11	53

[0341] 毒性试验的常用方法包括皮肤刺激测试、眼睛刺激测试、皮下测试、肌肉测试、冲洗开放式伤口、比内测试和口服测试。皮肤测试可在兔子上测试,其中 0.5ml 的 10% 乳液施于皮肤或兔子上保持 4 小时。皮肤反应的记录最长为 72 小时。Draize 标度用于标记刺激度。进行眼睛刺激测试时,0.1ml 10% 乳液施于兔子的眼部,所记录的眼部反应最长为 72 小时。用 Draize 标度标记刺激度。皮下和肌肉测试中向小鼠注射 0.1ml 10% 乳液。冲洗开放式伤口测试中向小鼠施用 2ml 10% 乳液。进行鼻内测试时,0.25ml/ 两鼻孔剂量的 2-4% 乳液施用于小鼠。进行口服测试时,用 4ml/kg/ 天 10% 乳液剂量口服给药一周或单独给予 8ml/kg 量 100% 乳液。

[0342] 实施例 9

[0343] 使用炭疽杆菌的体外研究

[0344] 使用  $X_8W_{60}PC$  制剂以研究本发明化合物对炭疽杆菌孢子的杀菌效果。不同  $X_8W_{60}PC$  (水中) 稀释液对 6 种不同炭疽杆菌菌株的杀孢子活性示于图 3。如图 4 和 5 所示,  $X_8W_{60}PC$  能在 4 小时内杀灭超过 98% 的 7 种不同炭疽菌株 (图 3 和 Ames 中的菌株, USAMRID), 效果与 1-10% 的漂白剂相似。  $X_8W_{60}PC$  在介质中不同的稀释液也具有相似的杀孢子活性 in media (图 6)。图 7 显示了  $X_8W_{60}PC$  在室温下与零时间相比, 其对炭疽杆菌 De1 Rio、TX 菌株杀孢子活性的时间过程。如图所示,  $X_8W_{60}PC$  能在 30 分钟内杀灭炭疽孢子。

[0345] 实施例 10

[0346] 作用机理

[0347] 以下实施例探询本发明乳液预期的作用机理以表明其杀孢子活性。该机理并不意在此限定本发明范围,理解其机理对于实践本发明并不是必须的,且本发明不限于任一特定机理。检测 GMO/CPC 脂质乳液 (“W<sub>80</sub>8P”) 和 BCTP 对大肠杆菌的影响。W<sub>80</sub>8P 能杀灭大肠杆菌 (在去离子水中), 然而 BCTP 对此生物体无效。图 8 显示检测结果, 图 9 显示用 BCTP 处置的大肠杆菌。如图 9 所示, 用 BCTP 处置的大肠杆菌看起来很正常, 其确定结构及脂质细胞膜未被破坏。图 10 显示用 P10 处置的大肠杆菌细菌体内有空泡且其内容物发生了溶胀, 因此生物体失去了其确定的结构。与某一特定的理论无关 (理解其机理对于实践本发明并不是必须的, 且本发明不限于任一特定机理), 此观察结果表明 W<sub>80</sub>8P 杀灭细菌并不靠溶解细菌, 相反通过改变其内部结构, 确切的是形成空泡及溶胀, 来杀灭细菌的。第二项研究使用霍乱弧菌。尽管霍乱弧菌与大肠杆菌相类似, 但是 BCTP、W<sub>80</sub>8P 和 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 都能杀灭生物体。与对照的电子显微图 (图 11) 相比, W<sub>80</sub>8P 处置的霍乱弧菌 (图 12) 再次显示了溶胀及生物体内部的变化, 然而其细胞壁却完好。相反, BCTP 处置的霍乱弧菌 (图 13) 完全溶解了细菌, 只剩下细胞碎片。X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC (图 14) 显示了上述的联合效果, 其中一些生物体溶胀但未被破坏, 一些则被溶解。这清楚的表明 BCTP、W<sub>80</sub>8P 和 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 的工作机理不同。

[0348] 进行第三项对比性研究以评估不同浓度乳液的效果。如表 18 所示, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 在低浓度下 (较高稀释度) 作为杀虫剂对 W<sub>80</sub>8P 或 BCTP 敏感的细菌更为有效。另外, 6 种耐 W<sub>80</sub>8P 和 BCTP 的其它细菌都能被 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 影响。所述活力上的不同之处也可在比较 W<sub>80</sub>8P、BCTP 和 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 的流感传染性试验的结果中看出来。如图 15 所示, BCTP 和 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 在 1 : 10 和 1 : 100 稀释时有效, 另外, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 能在最低浓度 1 : 1,000 稀释时依然有效。相反, W<sub>80</sub>8P 在 1 : 10 稀释时已几乎没有活力了, 表明其在对付这种包膜生物体时, 不是一种有效的治疗剂。另外, X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 能杀灭 W<sub>80</sub>8P 或 BCTP 不能杀灭的酵母菌株。

[0349] 表 18

[0350] 杀灭 90% 所选微生物所需的最低纳米乳液浓度

[0351]

细菌	W <sub>80</sub> 8P	BCTP	X <sub>8</sub> W <sub>60</sub> PC
化脓链球菌	未杀死	10%	0.1%
无乳链球菌	1% *	1%	ND
肺炎链球菌	10% *	1%	0.1%
金黄色酿脓葡萄球菌	未杀死	未杀死	0.1%
淋病奈瑟氏菌	ND	1%	0.1%
流感嗜血杆菌	10%	1%	0.1%
霍乱弧菌	1%	0.1%	0.1%

大肠杆菌	未杀死 #	未杀死	0.1%
鼠伤寒沙门氏菌	未杀死 #	未杀死	10%
痢疾志贺氏菌	未杀死 #	未杀死	0.1%
奇异变形杆菌	未杀死 #	未杀死	1%
绿脓杆菌	未杀死	未杀死	10%
炭疽杆菌孢子	未杀死 @4H	0.1% @4H	0.1% -0.02% @4H
蜡状芽孢杆菌孢子	10% @4H	1% @4H	0.1% @4H
枯草杆菌孢子	未杀死 @24H	未杀死 @24H	0.1% @4H
小肠结肠炎耶尔森氏菌	ND	ND	0.1%
假结核耶尔森氏菌	ND	ND	0.1%
真菌			
白色念珠菌 (ATCC 90028)	未杀死	未杀死	1%
tropicalis 念珠菌	未杀死	未杀死	1%
病毒			
A 型流感病毒 H2N2	未杀死	1%	0.1%
B 型流感病毒 /Hong Kong/5/72	ND	1%	ND
牛痘	ND	1%	%
I 型单纯型疱疹	ND	1%	0.1%
Sendai	ND	1%	ND
Sindbis	ND	1%	ND
腺病毒	ND	未杀死	ND

[0352] \* 无法得到更低浓度的数据

[0353] # 除了在去离子水中外未杀死细菌

[0354] 10ND = 未测定

[0355] 实施例 11

[0356] 纳米乳液对杆菌菌种的杀孢子活性的进一步研究

[0357] 本实施例给出了本发明特定实施方案的乳液对不同杆菌孢子的灭活能力的附加研究的结果。这些研究用方法和结果在下文中概述。

[0358] 表面活性剂液体制剂 :BCTP, 一种油包水型纳米乳液, 其中油相源于大豆油、正磷酸三丁酯、和在 80% 水中的 TRITON X-100。混合同体积的 BCTP 和 W<sub>80</sub>8P (一种由甘油单酯、精炼大豆固醇、TWEEN 60、大豆油、一种阳离子含卤 CPC 和薄荷油制成的类似脂质体的化合物) 以制成 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC。

[0359] 孢子制剂 :为了诱导孢子成形, 在 37°C 下, 将蜡状芽孢杆菌 (ATTC14579)、环状芽孢杆菌 (ATC 4513)、巨大芽孢杆菌 (ATCC 14581) 和枯草芽孢杆菌 (ATCC 11774) 置于 NAYEMn 琼脂上 (含 0.1% 酵母提取物和 5mg/1 MnSO<sub>4</sub> 的营养琼脂) 培养生长一周。剔除平板, 细菌 / 孢子混悬于 50% 无菌乙醇中, 且在室温下 (27°C) 培养 2 小时, 培养时伴有搅拌以溶解残余的营养型细菌。混悬液在 2,500Xg 下离心 20 分钟, 沉淀颗粒用冷 diH<sub>2</sub>O 冲洗两遍。沉淀的孢子颗粒重新混悬于胰酪豆胨培养液 (TSB) 中, 且迅疾用于试验中。将 Bruce Ivins 博士 (USAMRIID, FortDetrick, Frederick, MD) 提供的炭疽杆菌孢子 Ames 和 Vollum 1B 菌株用前述方法制备 (Ivins 等, 1995)。其他四种炭疽菌株由 MartinHugh-Jones 博士 (LSU, Baton Rouge, LA) 提供。这些独立提供的菌株与南非、莫桑比克、加拿大 Bison ; 和德克萨斯 Del Rio (菌株) 在等位 (基因) 上有很大的不同。

[0360] 体外杀孢子测试 :For assessment of 评估固体介质的杀孢子活性时, 先将胰酪豆胨琼脂 (TSA) 高压灭菌, 再冷却至 55°C。将最终稀释度为 1 : 100 的 BCTP 加入到 TSA 中, 并在倾斜平板时不断的搅拌。不断的稀释孢子制剂 (10 倍), 并将等量的 10 μl 制作两份平板 (最高接种为 10<sup>5</sup> 孢子每平板)。平板在有氧 37°C 条件下 48 小时, 并评估其生长情况。

[0361] 在评估液体介质中的杀孢子活性时, 孢子用 TSB 重新混悬。1ml 孢子混悬液含有含有 2 × 10<sup>6</sup> 孢子 (最终浓度为 10<sup>6</sup> 孢子 / ml), 该混悬液与 1ml BCTP 或 X<sub>8</sub>W<sub>60</sub>PC 在试管中混合 (在 diH<sub>2</sub>O 中的最终浓度为 2X)。试管在 37°C 旋转管中培养 4 小时。经处置, 混悬液在 diH<sub>2</sub>O 中稀释了 10 倍。从每一稀释液中量取二份 (25 μl) 在 TSA 上划线, 再再 37°C 下培养一整夜, 然后清点菌落数量。以百分率表示的杀孢子活性计算如下 :

[0362]

$$\frac{\text{cfu [初始]} - \text{cfu [处置后]}}{\text{cfu [初始]}} \times 100$$

[0363] 试验重复 3 次, 计算其平均杀灭值。

[0364] 电子显微镜 :用 TSB 稀释的最终稀释度为 1 : 100 的 BCTP 处置蜡状芽孢杆菌孢子, 在 37°C 摇摆式恒温器中使用 Erlenmeyer 烧瓶进行处置。间隔时取出 50ml 样本, 并在 2,500Xg 下离心 20 分钟, 弃去上清液。沉淀颗粒在 0.1M 二甲胂酸盐 (pH 7.3) 中与 4% 戊二醛结合固定。经加工的孢子沉淀颗粒用透射电子显微镜检测, 同时经乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色后用薄切片检测。

[0365] 萌发抑制剂 / 激动剂 :蜡状芽孢杆菌孢子 (最终浓度为 10<sup>6</sup> 孢子 / ml) 与萌发抑制剂 D- 丙氨酸 (最终浓度为 1 μM) 或与萌发激动剂 L- 丙氨酸 + 肌苷 (每种最终浓度为 50 μM) 在 TSB 中混合 (Titball 和 Manchee, 1987 ; Foster 和 Johnston, 1990 ; Shibata 等,

1976), 然后立刻与 BCTP(最终浓度为 1 : 100) 混合且在不等时间段内培养。然后将混合物连续的稀释、铺板、培养一整夜。第二天清点平板并计算杀孢子活性的百分数。

[0366] 体内杀孢子活性: 建立两类动物模型; 在第一组中, 蜡状芽孢杆菌孢子(混悬于消毒盐水中) 与等体积最终稀释都为 1 : 10 的 BCTP 混合。作为对照, 相同的蜡状芽孢杆菌孢子混悬液与同体积的消毒盐水混合。每 100u1 含有  $4 \times 10^7$  孢子的混悬液随后立即皮下注射入 CD-1 小鼠中。

[0367] 在第二组中, 在小鼠背部开一切口制作模拟伤口。用麻醉解剖法分离皮肤与其下的肌肉。分离后形成的“袋囊”用 200  $\mu$  l 含  $2.5 \times 10^7$  孢子(在盐水中) 接种后用创伤钳封合伤口。一小时后, 拆掉创伤钳, 并用 2ml 消毒盐水或 2ml BCTP(在 1 : 10 消毒盐水中) 冲洗伤口。再用创伤钳封合伤口。观察动物的临床迹象。整体和组织病理学研究后 5 天对试验动物实施安乐死。伤口尺寸的计算用如下公式:  $1/2a \times 1/2b \times \pi$ , 其中 a 和 b 是伤口上相互垂直的直径。

[0368] 体外杀孢子活性: 为了评估 BCTP 的杀孢子活性, 我们测试了从四种杆菌菌种(蜡状芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、和枯草芽孢杆菌) 中得到的孢子。BCTP 1 : 100 稀释度显示其在 4 小时内对蜡状芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌具有 91% 杀孢子活性(图 16)。对 BCTP 不甚敏感的环状芽孢杆菌减少了 80% 孢子数量, 而枯草芽孢杆菌在 4 小时显示对 BCTP 具有耐受性。使用 1 : 100 稀释度的漂白剂(即, 0.0525% 次氯酸钠) 来比较 BCTP(1 : 10 和 1 : 100 稀释度) 对蜡状芽孢杆菌孢子杀孢子效果, 结果在杀孢子力的速度和程度上都没有明显的差别。另一种纳米乳液,  $X_8W_{60}PC$ , 能有效的杀死杆菌孢子。在以 1 : 1000 稀释时, 其在 4 小时内能杀灭 98% 蜡状芽孢杆菌孢子(与 47% BCTP 以 1 : 1000 稀释时相比)。与枯草芽孢杆菌孢子对 BCTP 具有耐受性相反,  $X_8W_{60}PC$  1 : 1000 稀释液在 4 小时内能杀灭 97.6% 枯草芽孢杆菌孢子。

[0369] 蜡状芽孢杆菌孢子杀灭的时程: 我们对时间过程进行研究以分析稀释成 1 : 100 的 BCTP 和稀释成 1 : 1000 的  $X_8W_{60}PC$  在超过 8 小时的时段内对蜡状芽孢杆菌的杀孢子活性。BCTP 1 : 100 稀释液与蜡状芽孢杆菌孢子培养, 其结果是在 1 小时内, 活力孢子的数量减少了 77%, 4 小时后减少了 95%。结果仍然是  $X_8W_{60}PC$  1 : 1000 稀释液比 BCTP 1 : 100 稀释液更有效, 其在 30 分钟后使孢子数降低了 95%(图 17)。

[0370] BCTP 对炭疽杆菌的杀孢子活性: 在初期体外试验之后, 我们测试了 BCTP 对两种炭疽杆菌恶性菌株(Ames 和 Vollum 1B) 的杀孢子活性。我们发现 BCTP 1 : 100 稀释液加入到细菌生长介质中能完全抑制  $1 \times 10^5$  炭疽杆菌孢子的生长。同时, 用最高稀释到 1 : 1000 的 BCTP 稀释液在室温下培养混合物 4 小时, 其无论对 Ames 菌株还是 Vollum 1B 菌株的孢子都有 91% 的杀孢子活性, 在 37°C 下培养混合物时, 其具有超过 96% 的杀孢子活性(表 19)。

[0371] 表 19: BCTP 对 2 种不同炭疽杆菌的菌株的杀孢子活性用菌落减少测试(杀灭%) 判断。最高稀释到 1 : 1000 的 BCTP 稀释液在 27°C 或 37°C 下, 在 4 小时内能有效的杀灭 > 91% 的两种孢子菌株; 其在孢子萌发程度上有明显的不同。杀孢子活性连续起效的孢子浓度最多为  $1 \times 10^6$  /ml。

[0372]	炭疽	Ames	Ames (数量)	Vollum 1 B	
		室温	37°C	室温	37°C
	BCTP 1:10	91%	96%	97%	99%
	BCTP 1:100	93%	97%	97%	98%
	BCTP 1:1000	93%	97%	98%	99%

[0373]  $X_8W_{60}PC$  炭疽杆菌杀孢子活性:由于  $X_8W_{60}PC$  在高稀释度时较 BCTP 能更有效的对抗多种杆菌孢子,我们测试了其最高 1 : 10,000 稀释液在室温下抑制 4 种不同炭疽杆菌菌株萌发的效果。结果显示  $X_8W_{60}PC$  1 : 1000 稀释液的最高杀灭率在 86%和 99.9%之间(表 20)。

[0374] 表 20 : $X_8W_{60}PC$  对 4 种不同炭疽杆菌菌株的杀孢子活性表明了其不同的临床分离 (clinical isolates)。用  $X_8W_{60}PC$  不同稀释度在室温下处置孢子以减少萌发。在较低的稀释度下,没有显著的杀死孢子。1 : 1000 的稀释度的杀孢子效果最高。

[0375]

炭疽菌株	南非	Bison, 加拿大	莫桑比克	Del Rio, 德克萨斯
$X_8W_{60}PC$ 1 : 10	81.8	85.9	41.9	38
$X_8W_{60}PC$ 1 : 100	84	88.9	96.5	91.3
$X_8W_{60}PC$ 1 : 1000	98.4	91.1	99.9	86
$X_8W_{60}PC$ 1 : 5000	79.7	41.3	95.7	97.1
$X_8W_{60}PC$ 1 : 10000	52.4	80	ND	ND

[0376] 孢子的电子显微镜检测:使用蜡状芽孢杆菌进行研究,因为它是最接近炭疽杆菌的微生物。在 TSB 中用 1 : 100 稀释的 BCTP 处置蜡状芽孢杆菌孢子 4 小时,透射电子显微镜的检测结果显示蜡状芽孢杆菌孢子发生物理损伤,包括孢膜和皮层进一步的破坏,伴有孢核畸变及密度降低(图 18)。

[0377] 萌发激动和抑制:为了研究 BCTP 杀杆菌孢子作用中对萌发启动的效果,萌发抑制剂 D- 丙氨酸 (Titball 和 Manchee, 1987 ;Foster 和 Johnston, 1990) 和萌发促进剂 L- 丙氨酸和肌苷 (Shibata 等, 1976) 与孢子及 BCTP 一起培养 1 小时。当 10mM D- 丙氨酸存在时, BCTP 的杀孢子效果被延迟,而当 50  $\mu$  M L- 丙氨酸和 50  $\mu$  M 肌苷存在时,其效果被加速(图 19)。

[0378] 体内杀孢子活性:试验动物蜡状芽孢杆菌感染之前已用作用以研究炭疽的模型系统,其引起的疾病与试验性炭疽感染相似 (Welkos 等, 1986 ;Drobniewski, 1993 ;Burdon 和 Wende, 1960 ;Burdon 等, 1967 ;Fritz 等 1995 等, 1995 ;Welkos 和 Friedlander, 1988)。建立两组皮肤蜡状芽孢杆菌疾病的动物模型以研究 BCTP 的体内效果。由于这些模型涉及皮

下给予纳米乳液,在此之前先进行 BCTP 体内毒性的测试。用 BCTP 1 : 10 盐水稀释液注射 CD-1 小鼠作为对照,其未显示整体或组织病理学分析上的痛苦或炎症反应的迹象(图 20A, 图 20B)。为了测试蜡状芽孢杆菌孢子体内的致病效果及 BCTP 的杀孢子效果,将含  $4 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子的混悬液与盐水或与 BCTP 混合,其最终稀释度为 1 : 10,然后立刻向 CD-1 小鼠背部进行皮下注射。皮下感染蜡状芽孢杆菌孢子而未注射 BCTP 的小鼠在 6-8 小时产生了严重的浮肿。之后 18-24 小时在注射点周围产生了灰色的坏死区域,并在 48 小时产生了严重的皮肤腐肉,留下一干燥、红色的病灶(图 20C, 图 20D)。当孢子与 BCTP 预先混合时,同时注射孢子和 BCTP 能降低 98% 的坏死病灶,病灶大小从  $1.68\text{cm}^2$  下降到  $0.02\text{cm}^2$ 。此结果与浮肿或炎症的减轻有关(图 20E, 图 20F)。

[0379] 在其他研究中,用  $2.5 \times 10^7$  蜡状芽孢杆菌孢子感染 1cm 的皮肤伤口,然后未经任何处置即封合伤口(图 21A, 图 21B)。其他组用相同数量的孢子感染,1 小时后用 BCTP 或盐水冲洗伤口以模拟后暴露(post-exposure)净化。用盐水冲洗实验性感染伤口没有产生任何显著的效果(图 21C, 图 21D)。用 BCTP 冲洗被蜡状芽孢杆菌孢子感染的伤口产生了相当好的效果,病灶面积连续从  $4.86\text{cm}^2$  降低到  $0.06\text{cm}^2$ (图 21E, 图 21F)。与未经处理的小鼠或用盐水冲洗的小鼠比较,改组小鼠在病灶面积的降低的同时,死亡率也降低了 4 倍(80% 到 20%)。

#### [0380] 实施例 12

[0381] 表面活性剂脂质制剂(SLPS)对 A 型流感病毒的体外影响

[0382] 包膜病毒是重要的病原体。他们传播迅速且能在宿主体外存活较长的时间。选用 A 型流感病毒的原因是其是抗病毒试剂试验中广泛使用的模型(Karaivanova 和 Spiro, 1998 ;Mammen 等,1995 ;Huang 等,1991)。流感病毒是临床上重要的呼吸系统病原体,其传播广泛且能引起严重的大面积流行疾病(Mulder and Hers,1972)。

[0383] 包膜糖蛋白、血细胞凝集素(HA)和神经氨酸苷酶(NA)不仅能判断流感病毒亚型的抗原特性(Schulze,1997),还能随之迅速的发生改变,结果使得病毒巧妙的躲避了宿主防御系统。这将导致对相关菌株具免疫性的个体患上疾病。下文将详细叙述用于判断 SLPs 对 A 型流感病毒传染性的预防效果的方法及组合物。

[0384] 表面活性剂脂质制剂(SLPs):SLPs 制备需两个步骤:将大豆油及表 1 所列试剂混合并加热至  $86^\circ\text{C}$  1 小时,得到油相(Florence,1993)。使用循环注射泵将注射水或含 1% 铍的水(SS)以体积/体积比例加入到油相中,形成 SLPs。

[0385] 病毒:A/AA/6/60 型流感病毒(Hedocher 等,1996)由 HuneinF. Maassab 博士(密歇根大学公共卫生学院)提供。进行标准操作(Barrett 和 Inglis,1985)使 A 型流感病毒在已受精的不含病原体的卵细胞的尿囊腔内繁殖(SPAFAS,Norwich,CT)。病毒贮库以整数量保持( $10^8$ pfu/ml)在  $80^\circ\text{C}$  下易传染的尿囊液。腺病毒载体(AD.RSV ntlacZ)由 Vector Core Facility(密歇根大学医学中心,Ann Arbor,密歇根)提供,以整数量保持( $80^\circ\text{C}$  下  $10^{12}$ pfu/ml)。该载体基于人类去除了核苷酸序列 E1A 和 E1B 段及部分 E3 段的腺病毒(血清型 5)基因主链。这样削弱了病毒复制或转变成非许可性细胞的能力。在肉瘤病毒长末端重复序列(RSV-LTR)的启动子控制下,它携带了大肠杆菌 LacZ 基因、编码、 $\beta$ -半乳糖苷酶。其含有与 LacZ 基因 5' 末端相连接的核导向(或作为核导向)的表位以促进蛋白质表达的检测(Baragi 等,1995)。

[0386] 细胞：从美国样本培养收集中心 (ATCC ;Rockville, MD) 购买到 Madin Darby Canine Kidney (MDCK) 细胞；从 Vector Core Facility (密歇根大学医学中心, Ann Arbor, 密歇根州) 处获得 293 细胞 (CRL 1573 ;转化初生胚人类肾脏)。293 细胞表达腺病毒 5 的转换基因, 因此能恢复 Ad. RSV ntlacZ 载体在宿主细胞中复制的能力 (Graham 等, 1977)。

[0387] 细胞保持介质：MDCK 细胞与 Earle's 盐类、2mM L- 谷氨酰胺、1.5g/l 含有 10% 胚胎牛血清 (FBS ;Hyclone 实验室, Logan, UT) 的碳酸氢钠 (Mediatech 公司, Herndon, VA) 一起保存在 Eagle's 最低必须介质中。介质中需不断添加 0.1mM 非必须氨基酸、1.0mM 丙酮酸钠、100U 青霉素 /ml 和链霉素 100  $\mu$ g/ml (生命技术, Gaithersburg, MD) 作为补充。293 细胞保存在 Dulbecco's 修饰的 Eagle 介质中 (Mediatech, Inc., Herndon, VA), 该介质含有 2mM L- 谷氨酰胺、0.1mM 非必须氨基酸和 1.0mM 丙酮酸钠。其还含有 100U 青霉素 /ml 和链霉素 100  $\mu$ g/ml (生命技术, Gaithersburg, MD) 并添加 10% FBS (Hyclone 实验室, Logan, UT) 作为补充。

[0388] 病毒传染介质：A 型流感病毒传染介质为 MDCK 细胞的保存介质 (without FBS), 该介质添加 3.0  $\mu$ g/ml 经甲苯磺酰苯丙酰胺氯甲基酮 (TPCK)- 处置的胰蛋白酶 (Worthington 生化公司 Lakewood, NJ) 作为补充。腺病毒传染介质是 293 细胞的保存介质, 介质所含的血清浓度较低 (2% FBS)。

[0389] A 型流感病毒覆盖介质 (overlay medium)：覆盖介质由等量的 2x 传染介质和 1.6% SEAKEM ME 琼脂糖组成 (FMC 生物产品, Rockland, MD)。染色琼脂糖覆盖介质由琼脂糖覆盖介质加上 0.01% 中性红溶液 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 组成, 其中不含 TPCK- 处置的胰蛋白酶。

[0390] 斑点数 (plaque) 降低测定法 (PRA)：将别处记载的斑点数降低测定法 (Hayden 等, 1980) 作修改后, 即是我们所用的斑点数降低测定法。MDCK 以  $1 \times 10^5$  细胞 / 孔的量接种于 12- 孔 FALCON 平板上, 在  $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$  下培养 3 天。大约  $1 \times 10^8$  pfu 的 A 型流感病毒按以下方法用表面活性剂脂质制剂培养。A 型流感病毒 -SLP 处置组和对照组用传染介质稀释使之含有 30-100 pfu/250  $\mu$ l。融合细胞单分子层以三倍量接种在 3 块平板上, 在  $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$  下培养 1 小时。抽出接种物 / 介质, 加入 1ml / 孔的琼脂糖覆盖介质, 平板在在  $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$  下培养至出现斑点。单分子层沾染上琼脂糖覆盖介质时, 继续在  $37^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2$  下培养。染色后 6-12 小时计算斑点数目。比较具有液体浓度的 9 孔中计算出的平均斑点数与未处置的含病毒孔的平均斑点数。

[0391] 原位细胞酶联免疫吸附测定法 (ELISA)：优选原位细胞 ELISA 以检测及定量在 MDCK 细胞内感染 A 型流感病毒的病毒蛋白。简单的说, 将 100  $\mu$ l 完全介质中的  $2 \times 10^4$  MDCK 细胞加入到 96- 孔平底微量平板和培养一整夜。第二天, 除去培养介质, 用不含保存介质的血清洗涤细胞。将 100  $\mu$ l 病毒接种体加入到小孔中培养 1 小时。之后初期病毒接种体, 代替加入 100  $\mu$ l MDCK 细胞保存介质与 2% FBS。受感染的 MDCK 细胞再培养 24 小时。然后再将细胞用 PBS 冲洗一次, 用冰冷的乙醇：丙酮 (1 : 1) 混合物将其结合固定, 于  $-20^\circ\text{C}$  保存。在测定的当天, 含固定化细胞的小孔用 PBS 冲洗, 且用存在于 PBS 中的 1% 干乳在  $37^\circ\text{C}$  下阻滞 30 分钟。100  $\mu$ l 以 1 : 1000 稀释的 ferret 抗 -A 型流感病毒多系抗体 (由 Hunein F. Maassab 博士提供, 密歇根大学公共卫生学院) 在  $37^\circ\text{C}$  下加入到小孔中持续 1 小时。细胞用洗涤缓冲液 (PBS 和 0.05% TWEEN-20) 洗涤四次, 在  $37^\circ\text{C}$  下与 100  $\mu$ l 以 1 : 1000 稀

的山羊抗-ferret 过氧化物酶结合抗体 (Kirkegaard&Perry 实验室, Gaithersburg, MA) 培养 30 分钟。细胞洗涤四次后与 100  $\mu$ l 1-STEPTURBO TMB-ELISA 底物 (Pierce, Rockford, IL) 一起培养至颜色发生变化。加入 1N 硫酸中断反应, 平板用 ELISA 微量读取器在 450nm 波长下读取。

[0392]  $\beta$ -半乳糖苷酶测定法:和其他文献描述的一样,在细胞提取物中使用  $\beta$ -半乳糖苷酶测定法 (Lim, 1989)。简单的说,293 细胞以大约  $4 \times 10^4$  细胞/孔的浓度接种在 96-孔“U”型-底部的组织接种平板上,在保持介质中于  $37^\circ\text{C}$  /5%  $\text{CO}_2$  下培养一整夜。的第二天,除去介质,细胞用 100  $\mu$ l Dulbecco's 磷酸酯缓冲的盐水 (DPBS) 洗涤。腺病毒贮库用传染介质稀释至浓度未  $5 \times 10^7$  pfu/mi, 并与下文中不同浓度的 BCTP 混合。用 BCTP 处置后,病毒用传染介质稀释至浓度为  $1 \times 10^4$  pfu/mi, 并用 293 细胞覆盖。细胞在  $37^\circ\text{C}$  /5%  $\text{CO}_2$  下培养 5 天,之后离心平板,除去介质并用不含  $\text{Ca}^{++}$  和  $\text{Mg}^{++}$  的 PBS 洗涤细胞三次。在第三次洗涤后,抽出 PBS,将 100  $\mu$ l 1x Reporter Lysis 缓冲剂 (Promega, Madison, WI) 加入到每一孔中。为了增加细胞溶解,平板冷冻再解冻三次,遵循  $\beta$ -半乳糖苷酶供应商 (Promega, Madison, WI) 提供的试验方法,并作某些改变后实施此项  $\beta$ -半乳糖苷酶测定法。5 微升细胞提取物转移至 96-孔平底平板中,与 45  $\mu$ l 1x Reporter Lysis 缓冲剂 (1 : 10) 相混合。随后加入 50  $\mu$ l 2x 测试缓冲剂 (120mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、80mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、2mM  $\text{MgCl}_2$ 、100mM (3-巯基乙醇、1.33mg/ml ONPG (Sigma, St. Louis, MO)) 并与细胞混合。平板在室温下培养至产生淡黄色。此时加入 100  $\mu$ l 1M 碳酸氢钠以终止反应。平板用 ELISA 微量读取器在 420nm 波长下读取结果。一种标准的,含 (u/  $\mu$ l  $\beta$ -半乳糖苷酶 (Sigma, St. Louis, MO)、以 50mM N-二甘氨酸缓冲剂 (Sigma, St. Louis, MO) 为补充的、pH 为 7.5 且以 100 (g/ml BSA) 稀释于 1x Reporter Lysis 缓冲剂中的  $\beta$ -半乳糖苷酶存在于测试的全过程中。每一细胞提取物中的  $\beta$ -半乳糖苷酶单位使用以标准水平为参考的回归分析计算,并用细胞提取物样本中蛋白的毫克数来表达。

[0393] 细胞毒性及脂质制剂病毒处置法:在病毒敏感性测试之前,SLPs 对 MDCK 和 293 细胞的细胞毒性用显微镜检测和 MTT 测定法来测定。制备的病毒与用于敏感性测试的 SLPs 混合物的稀释液浓度应远高于 SLP 被测试的安全浓度。如摇摆器结果所示,大约  $1 \times 10^8$  pfu A 型流感病毒或腺病毒与最终浓度为 1 : 10、1 : 100 和 1 : 1000 的脂质制剂一起培养不同的时间。培养之后,在适当的传染介质中制备 SLP/病毒混合物的血清稀释液,并覆盖 MDCK (A 型流感病毒) 或 293 (腺病毒) 细胞以进行上述 PRA,细胞内 ELISA 或  $\beta$ -半乳糖苷酶测定。

[0394] 电子显微镜:A 型流感病毒从尿囊液中通过一个 30% 的蔗糖垫进行半纯化,该蔗糖垫用 GTNE (甘氨酸 200mM、Tris-HCl 10mM (pH 8.8)、NaCl 100mM 和 EDTA 1mM) 在高速离心 (Beckman rotor SW 28Ti,以 20,000rpm 旋转 16 小时) 下制成。颗粒沉淀的病毒在 GTNE 重新组成。10 微升独立样本 (腺病毒,流感病毒,腺病毒+BCTP,流感病毒+BCTP) 培养 15 和 60 分钟后,置于用火棉胶片包裹的 200 目铜栅栏上 2 分钟。然后加入 5  $\mu$ l 2% 盐二甲胍酸化-缓冲戊二醛。用滤纸过滤 3 分钟滤去液体。向栅栏加入 10 微升 7% 乙酸双氧铀,30 秒后用滤纸滤去。栅栏干燥 10 分钟后在 Philips EM400T 透射电子显微镜检测。显微图片以 200,000x 放大率纪律在 Fuji FG 胶片上。

[0395] A 型流感病毒对 SLPs 的敏感性测试:我们研究了四种表面活性剂脂质制剂 (BCTP,

NN, W<sub>80</sub>8P, 和 SS) 对抗 A 型流感病毒 MDCK 细胞感染的效果。所有被测试的制剂都能不同程度的抑制 A 型流感病毒的传染, 如图 22 所示。BCTP 和 SS 在 1 : 10 稀释液中对 A 型流感病毒传染有超过 95% 抑制。NN 和 W<sub>80</sub>8P 对 A 型流感病毒只有一半的效果, 它们降低了大约 40% 的传染。即使将 BCTP 稀释到 1 : 100, 其杀病毒效果也未降低。SS 在 1 : 100 稀释度时, 其抑制 A 型流感病毒传染的效果降低到 55%。这两种脂性制剂在 1 : 1000 稀释时对病毒传染仅有微弱的抑制能力, 范围是 22-29% (图 22B)。

[0396] 由于 BCTP 和 SS 都对病毒传染有强的抑制效果, 因此用 PRA 检验从细胞 ELISA 测定获得的数据。PRA 测试证实了 BCTP 和 SS 的效果。BCTP 在 1 : 10 稀释时使斑点数从平均 50.88 降低到 0 (表 21)。在 1 : 100 稀释时, BCTP 仍然有杀病毒效果。SS 在以 1 : 100 稀释时, 与未处置病毒相比, 其仅减少了大约 7% 斑点数。

[0397] 表 21

[0398]

处置	斑点形成单位	斑点形成单位
试剂稀释度 :	BCTP	SS
1 : 10 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup> (+/-0.00) <sup>c</sup>	0.00(+/-0.00)
1 : 100	0.00(+/-0.00)	1.55(+1-0.12)
未处置病毒	50.88(+/-1-0.25)	23.52(+/-0.18)

[0399] <sup>a</sup> 病毒与 SLPs 培养 30 分钟。

[0400] <sup>b</sup> 斑点数。

[0401] BCTP 作用于 A 型流感病毒的动力学 : 为了研究 BCTP 作用于 A 型流感病毒传染所需的时间, 病毒与两种稀释度的 BCTP (1 : 10, 1 : 100) 一起培养 4 段不同的时间间隔 (5、10、15、30 分钟)。随后, 进行斑点数降低测定法。如表 22 所示, 在与每一种 BCTP 培养 5 分钟后, MDCK 细胞种 A 型流感病毒感染完全停止。尽管浓度或时间不同, BCTP 与 A 型流感病毒的相互作用没有显著的差别。

[0402] 表 22

[0403]

BCTP 处置/稀释液			
时间(分钟)	1:10	1:100	未处置
5	0.00 <sup>a</sup> (+/-0.00) <sup>b</sup>	0.00 (+/-0.00)	35.25 (+/-0.94)
10	0.00 (+/-0.00)	0.25 (+/-0.12)	39.25 (+/-1.95)
15	0.00 (+/-0.00)	0.25 (+/-0.12)	31.50 (+/-1.05)
30	0.00 (+/-0.00)	0.00 (+/-0.00)	26.50 (+/-0.08)

[0404] BCTP 抗 -A 型流感病毒效果 :由于 TRITON X-100 洗涤剂具有抗病毒活性 (Maha 和 Igarashi, 1997 ;Portocala 等, 1976), 我们研究了单独使用 TRITON X-100 或其与独立的 BCTP 组分结合使用是否具有与 BCTP 有相同程度的抑制 A 型流感病毒感染的效果。A 型流感病毒用以下试剂处置 :1) BCTP, 2) 磷酸正三丁酯、TRITON X-100 及大豆油的结合剂 (TTO), 3) TRITON X-100 和大豆油 (T0), 或 4) 单独使用 TRITONX-100 (T)。与单独使用或与其他被测试组分结合使用 TRITON X-100 相比, BCTP 在 1 : 10 和 1 : 100 稀释时 (TRITON X-100 以 1 : 500, 及 1 : 5000 稀释) 对 A 型流感病毒显然更为有效 (图 23)。在以 1 : 1000 稀释时, BCTP (TRITON X-100 1 : 50, 000 稀释) 能降低 50% MDCK 细胞的 A 型流感病毒而同浓度 TRITON X-100 在单独使用时基本上没有效果。

[0405] BCTP 不影响非包膜病毒的传染性 :为研究是否 BCTP 能影响非包膜病毒的传染性, 我们使用了含有 LacZ 基因的基因工程腺病毒, 编码  $\beta$ -半乳糖苷酶。这种腺病毒结构在基因转换上有缺陷, 因此只能复制和转化含有 the 腺病毒 5 转换基因的允许细胞。293 细胞, 其能特定的表达转换基因, 用于促进腺病毒复制及产生  $\beta$ -半乳糖苷酶。如图 24 所示, BCTP 处置不能影响腺病毒在 293 细胞种复制及表达  $\beta$ -半乳糖苷酶的能力。BCTP 处置的和未处置的腺病毒都产生了大约 0.11 单位的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

[0406] BCTP 对包膜病毒的作用 :由于 BCTP 仅能改变包膜病毒的传染性, 我们使用电子显微镜进一步的研究此种纳米乳液对包膜病毒整体性的作用。如图 25D 所示, 在与 1 : 100 稀释的 BCTP 培养 60 分钟后, 腺病毒结构没有变化。一些可辨认的 A 型流感病毒在与 BCTP 培养 15 分钟后能被辨认定位 (图 25B), 然而, 1 小时后发现了不可辨认的 A 型流感病毒。BCTP 对 A 型流感病毒的效果和其对粘膜的低毒性表明其能作为有效的杀菌试剂, 也可预防铀包膜病毒感染引起的疾病。

[0407] 实施例 13

[0408] 鼠伤寒杆菌的 W205EC 处置中温度和 EDTA 的影响

[0409] 图 31 和 32 显示用添加了 0.1% EDTA 的不同本发明乳液对沙门氏菌的处置情况。在温度为 40°C (图 32) 和 50°C (图 33) 时, EDTA 提高了乳液的杀菌活性。乳液测试浓度为 10.0%、1.0% 和 0.1% 稀释度。

[0410] 实施例 14

[0411] X8PC 和 W<sub>20</sub>5EC 的抗菌性质

[0412] 如上所述,乳液 X8PC 由约 8% (体积) 的 TRITON X-100、约 8% (体积) 的 TBP、约 1% 的 CPC、约 64% (体积) 的大豆油和约 19% (体积) 的 DiH<sub>2</sub>O 组成;乳液 W<sub>20</sub>5EC 由约 5% (体积) TWEEN 20、约 8% (体积) 的乙醇、约 1% (体积) 的 CPC、约 64% (体积) 的油类 (例如,大豆油) 和约 22% (体积) 的 DiH<sub>2</sub>O 组成。测试 X8PC 和 W<sub>20</sub>5EC 在不同情况下减少一组微生物生长的能力。图 35 显示在室温和 37℃ 下用 10%、1% 和 0.1% 稀释的 X8PC 能引起偶发分枝杆菌对数降低。

[0413] 干细菌或者湿细菌与 2% W<sub>20</sub>5EC 的乳液 (含有或不含有 1%、2% 和 3% Natrosol) 在室温下培养 15 分钟后,每组中的大肠杆菌都显示有大约 2 对数减少。干细菌或者湿细菌与 2% W<sub>20</sub>5EC 的乳液 (含有或不含有 1%、2% 和 3% Natrosol) 在室温下培养 15 分钟后,每组中金黄色酿脓葡萄球菌显示了大约 4 对数减少。湿细菌与 2% W<sub>20</sub>5EC 的乳液 (含有或不含有 1%、2% 和 3% Natrosol) 在室温下培养 15 分钟后,每组淋病奈瑟氏球菌都显示了大约 3 对数减少。

[0414] 一种橡胶表面用于测试在不同温度下及用不同类型的水稀释的 1% W<sub>20</sub>5EC 的杀菌活性。一英寸的表面用 20g 皮带碎屑涂抹。鼠伤寒杆菌人工喷洒到表面上并干燥 20 分钟。该处置过程中有 3 次间隔,间隔为一分钟,在每一间隔操作暂停 1 分钟。随后在室温下培养 10 分钟。结果显示在图 36 中。该数据表明在每一测试温度下,在使用 diH<sub>2</sub>O、蒸馏水和自来水时,W<sub>20</sub>5EC 都是有效的。

[0415] 所有上文中体积的出版物和专利在此作为综合参考引用。在不背离本发明范围和主旨的情况下,本发明所述方法和体系的不同修改形式和变化对于本领域技术人员来都说是显而易见的。尽管本发明用一些特定优选的实施方案加以阐述,但是应当理解,我们要求保护的发明不能被限制于这些特定实施方案中。事实上,所述用以实施本发明的方法的不同修改形式对于相关技术人员来说是显而易见的,这些修改形式也包括在权利要求书的范围内。

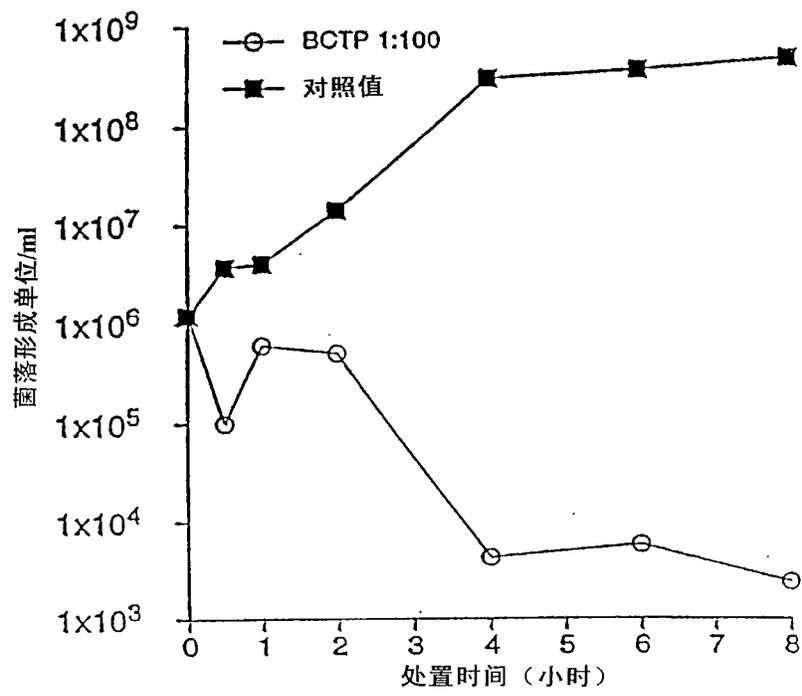
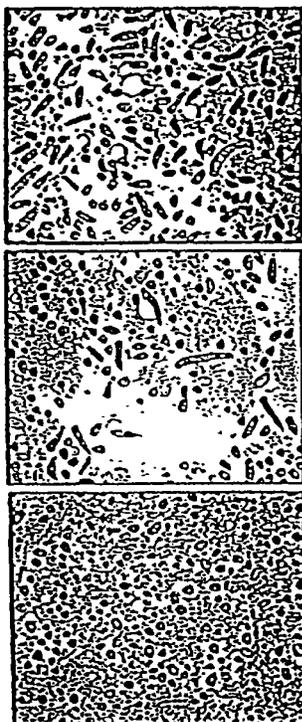


图 1



图 2A

零时刻



对照组  
孢子

图 2B

1 小时      2 小时      4 小时      6 小时



BCTP-处置组  
孢子

图 2C



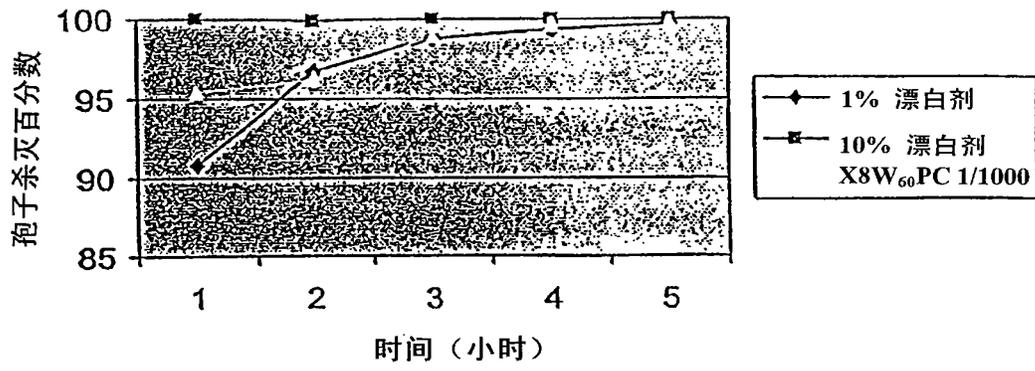


图 5

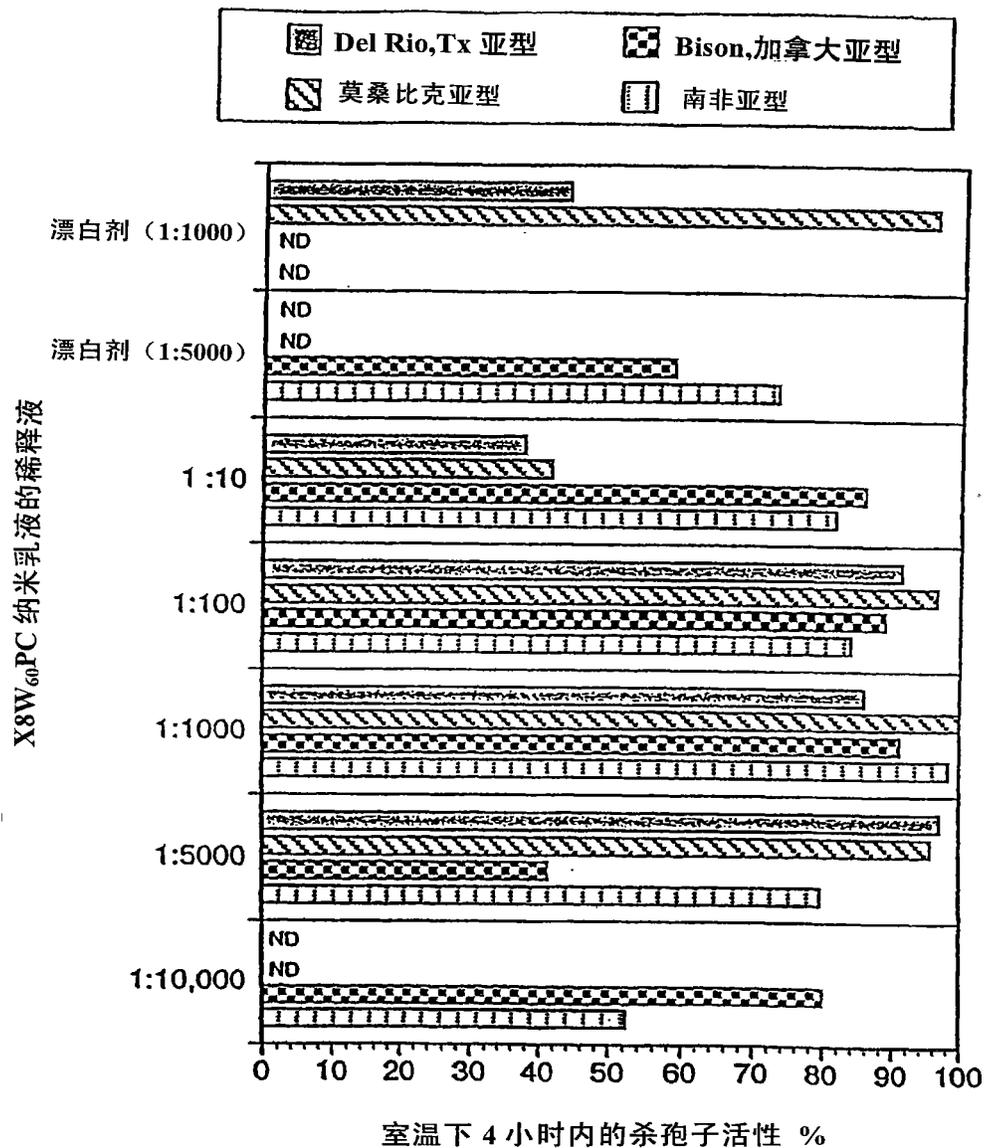


图 6

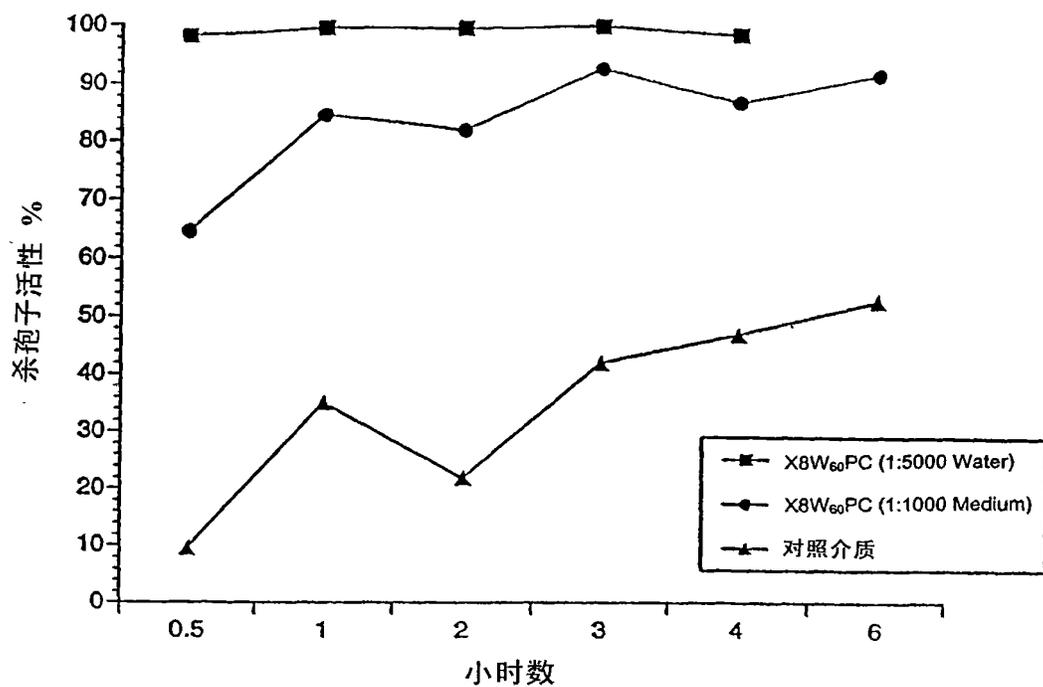


图 7

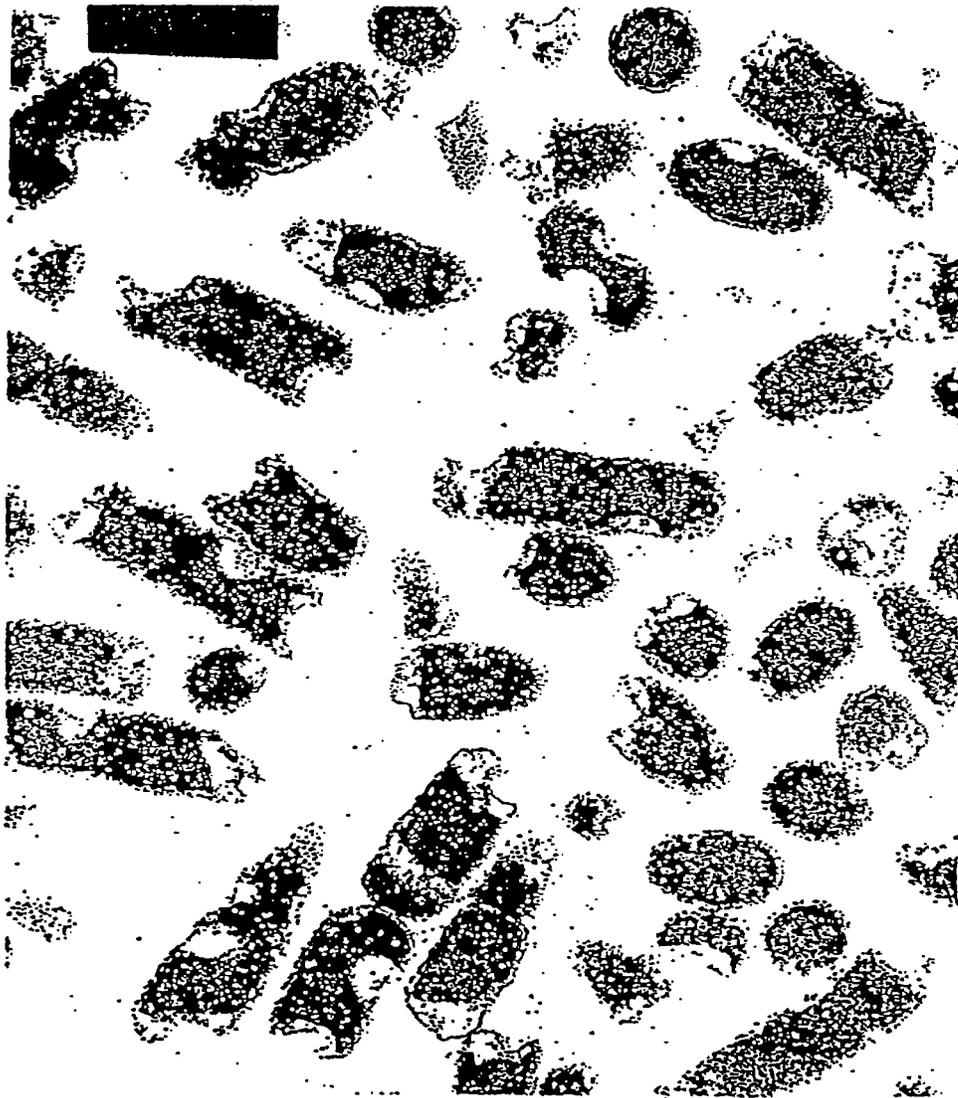


图 8



图 9

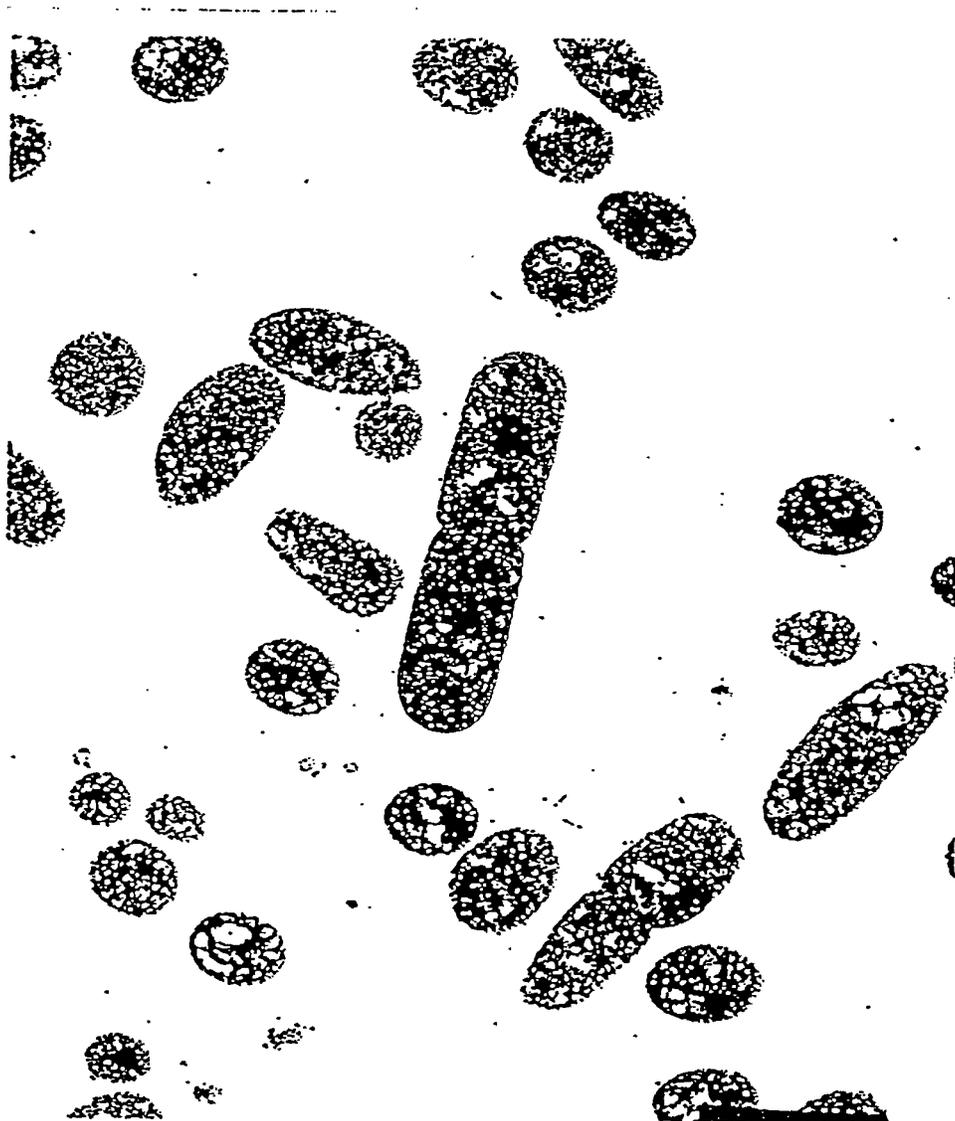


图 10



图 11

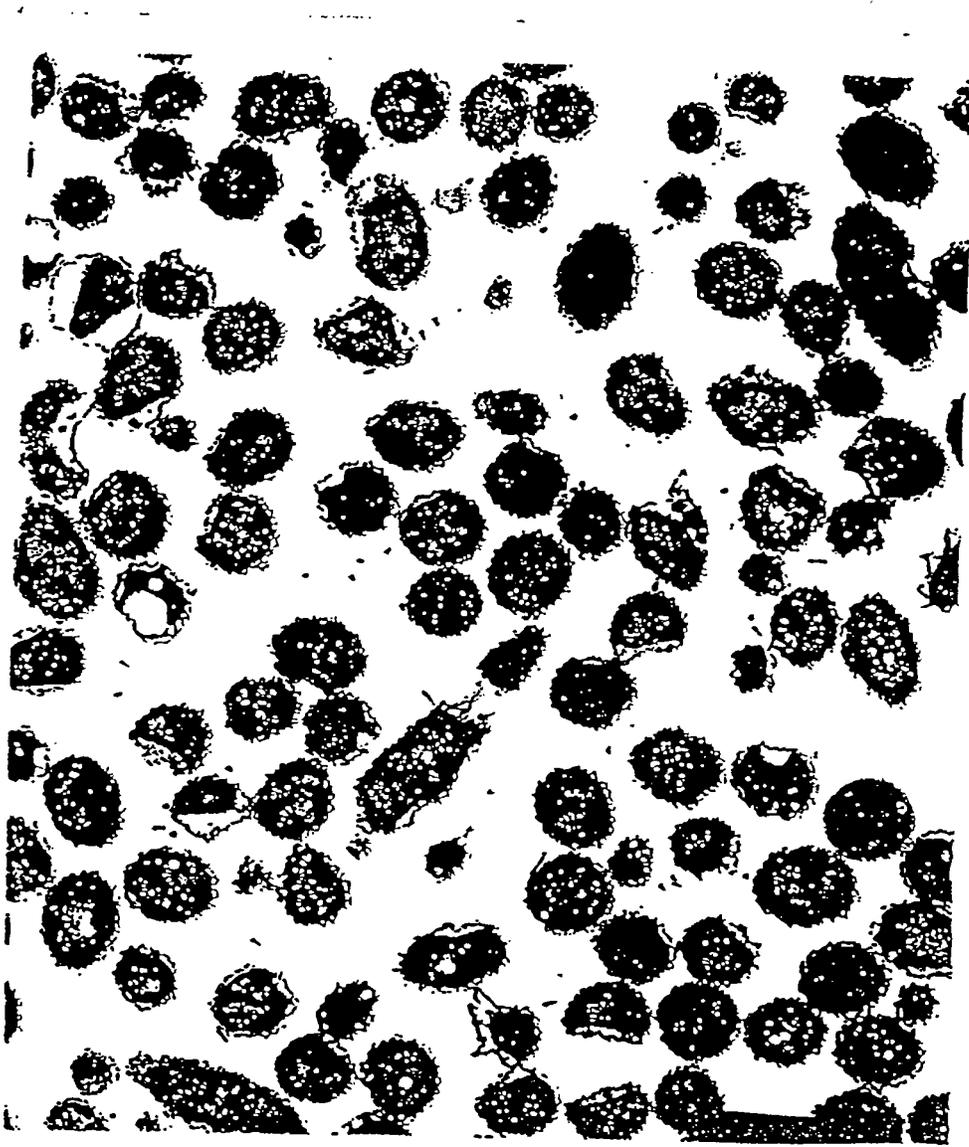


图 12

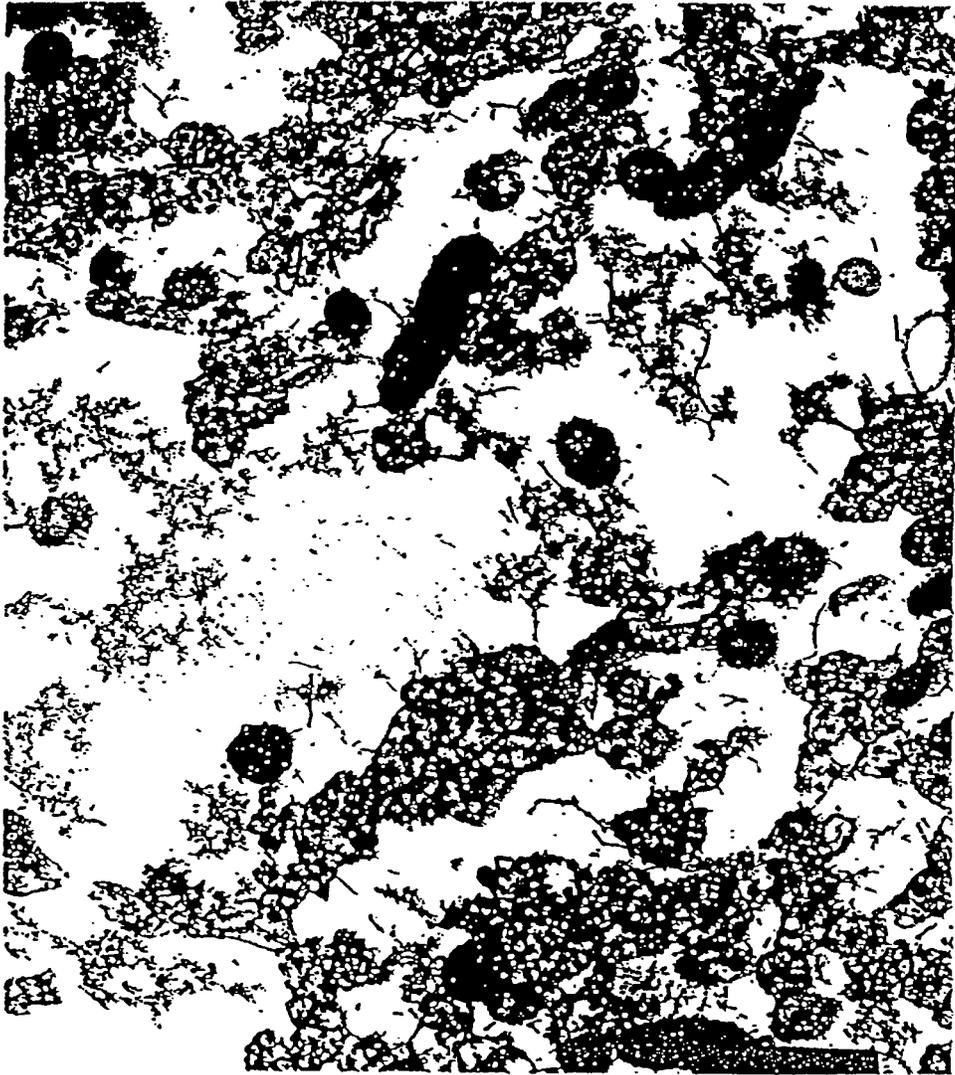


图 13

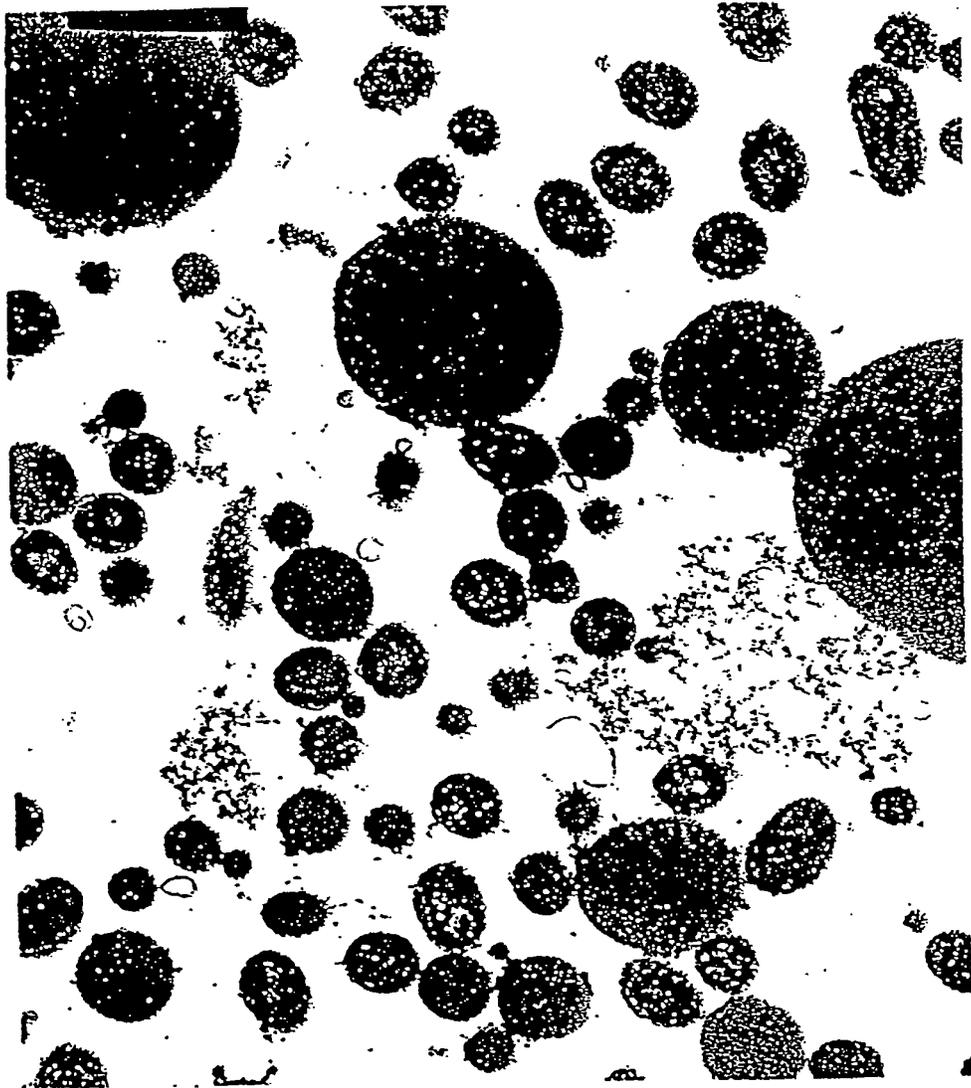


图 14

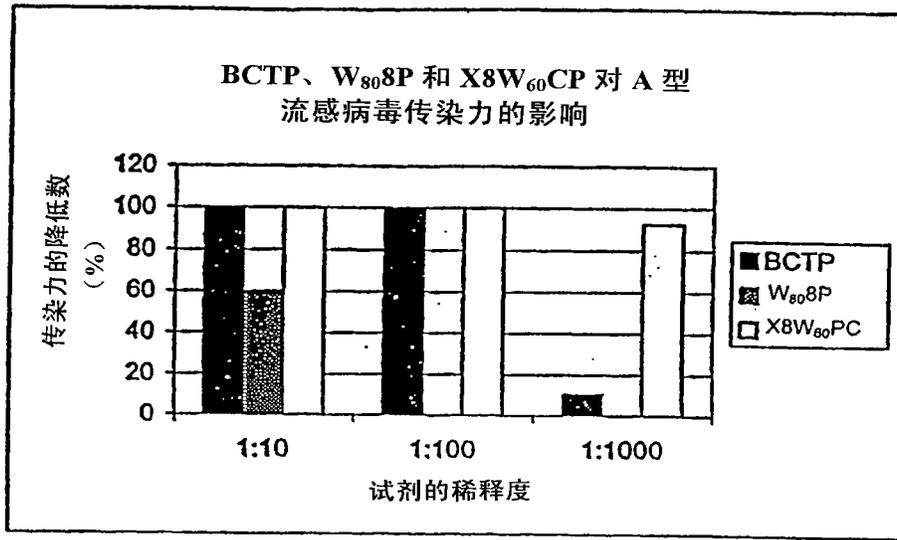


图 15

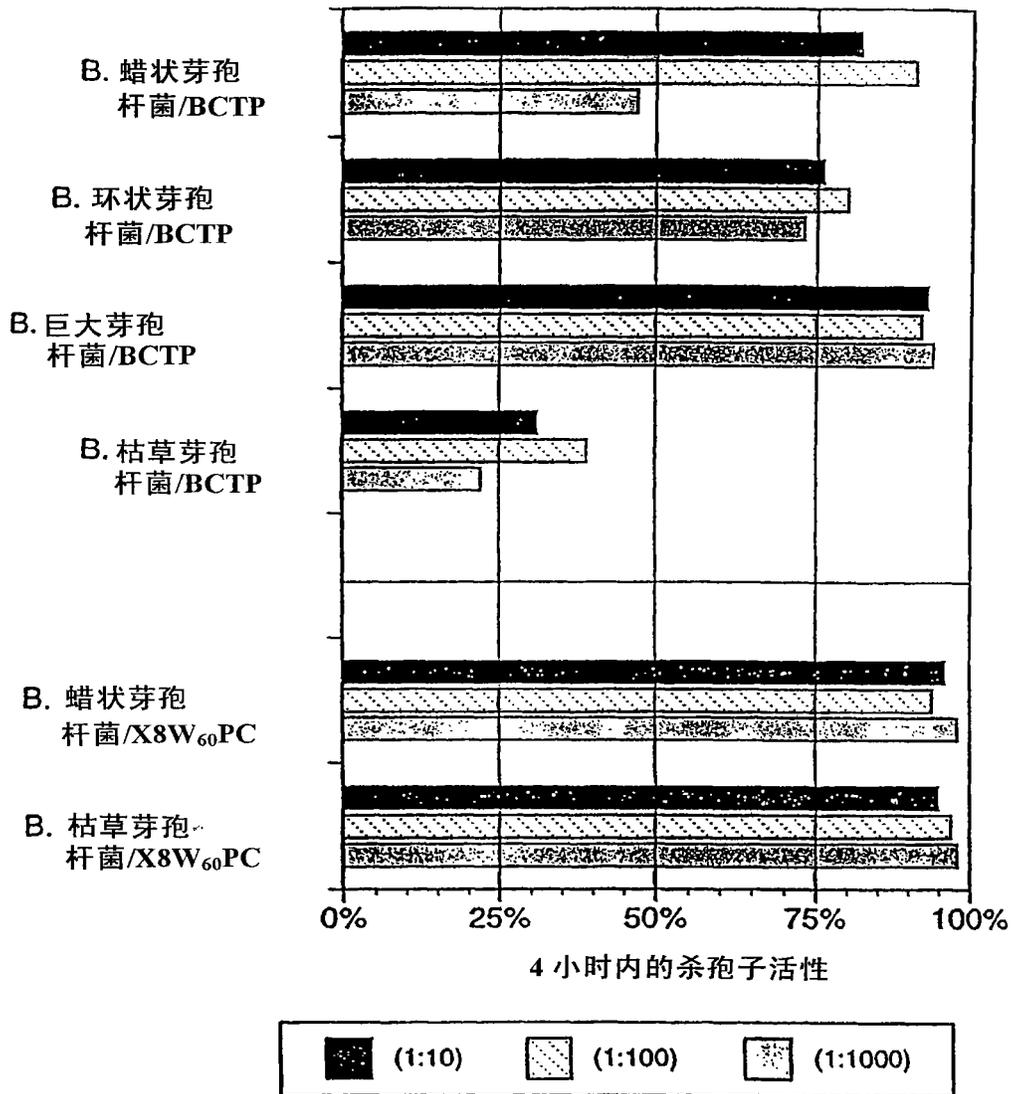


图 16

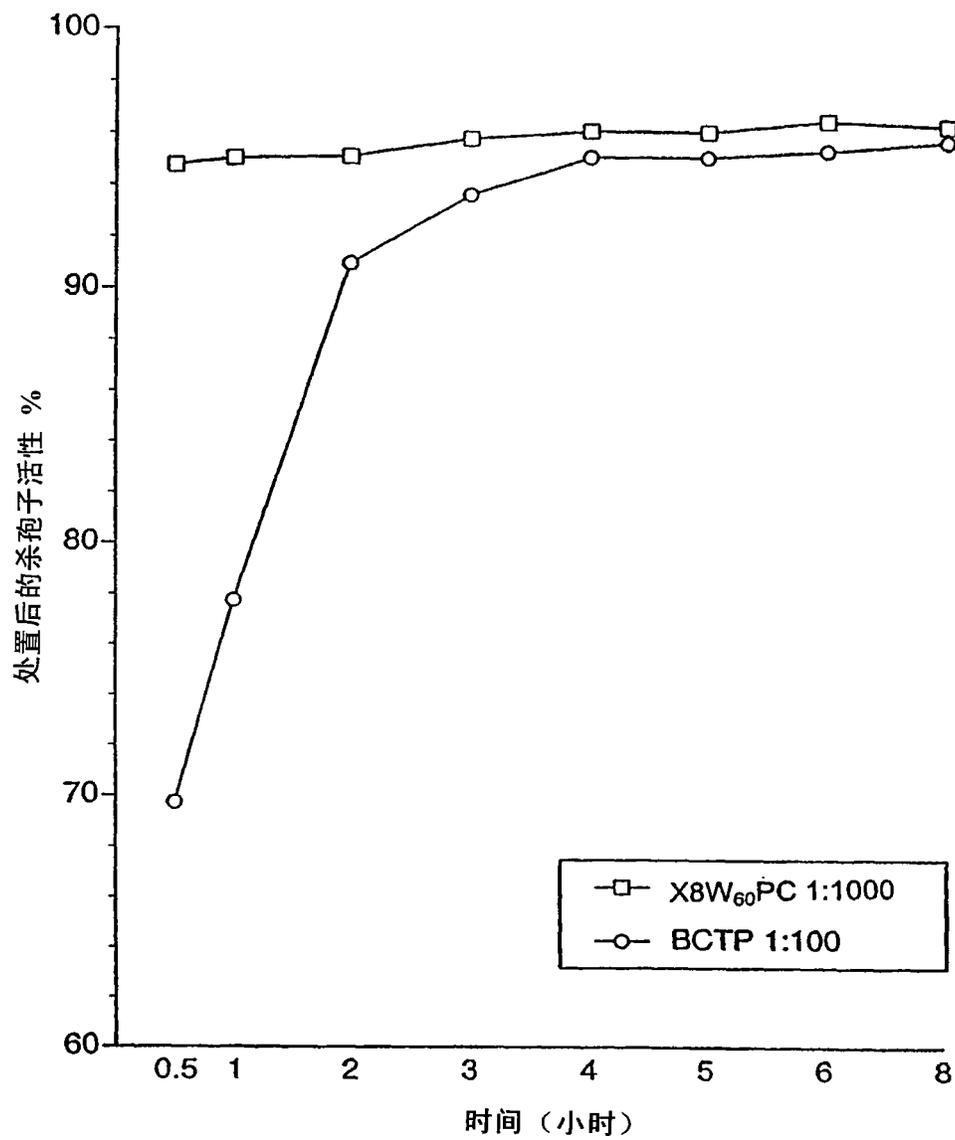


图 17

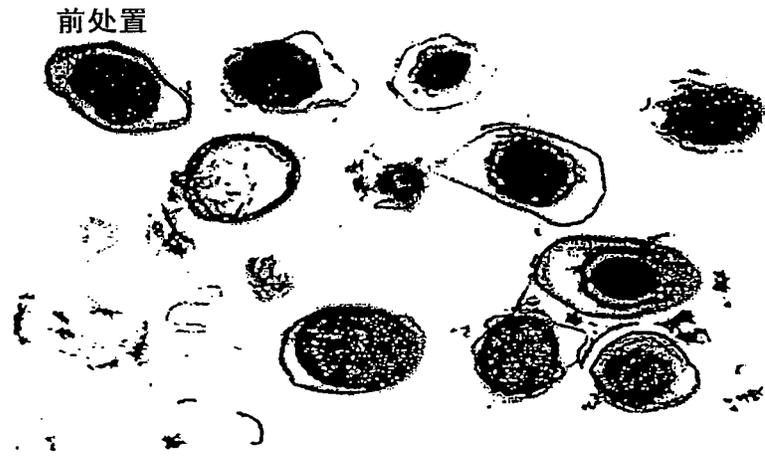


图 18A

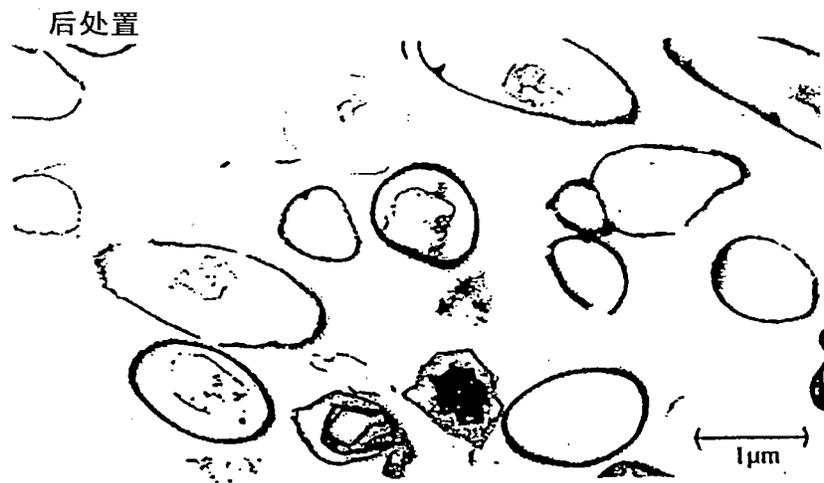


图 18B

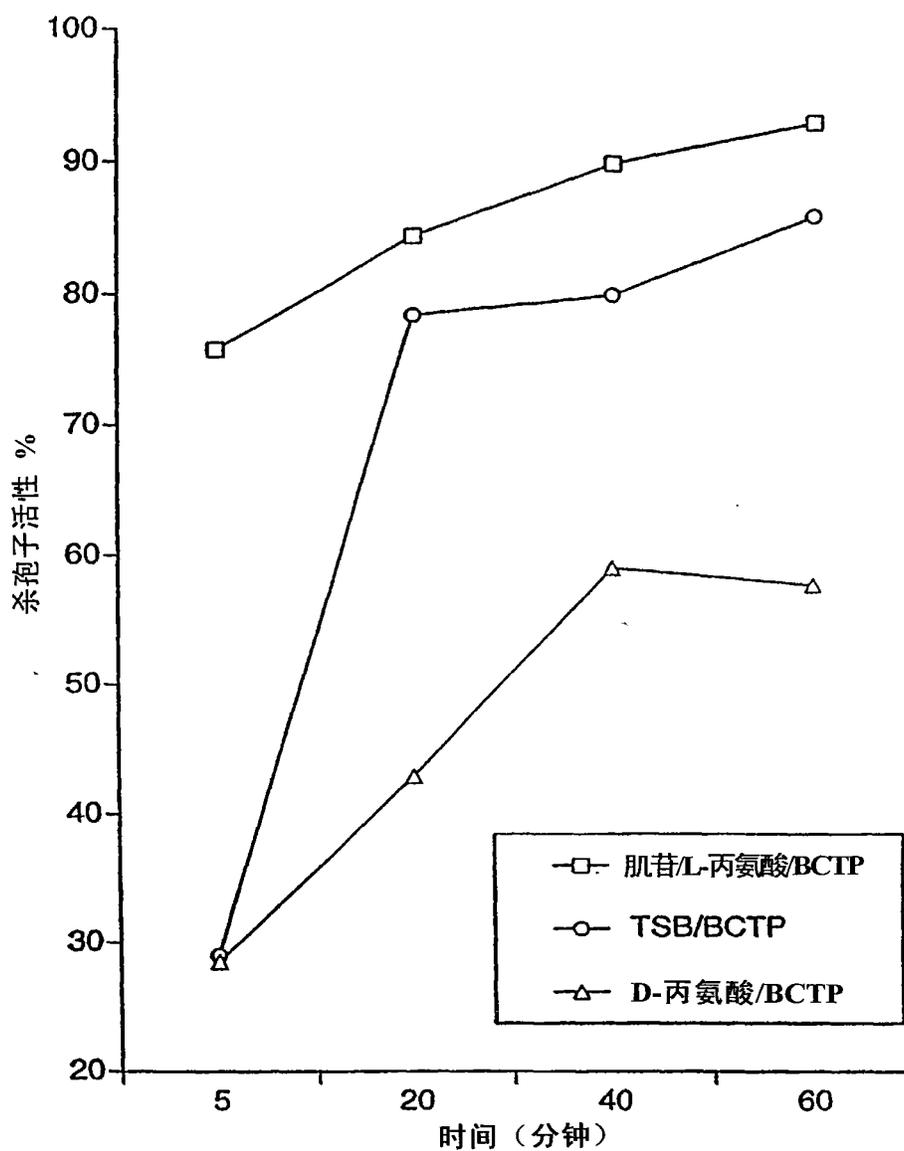


图 19

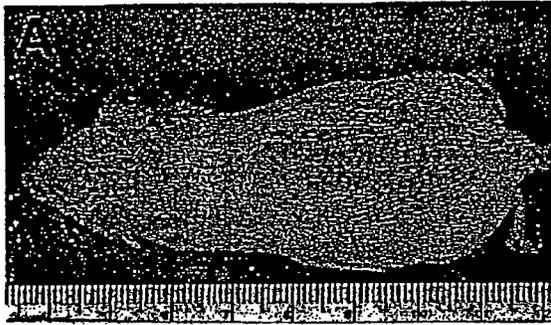


图 20A



图 20B

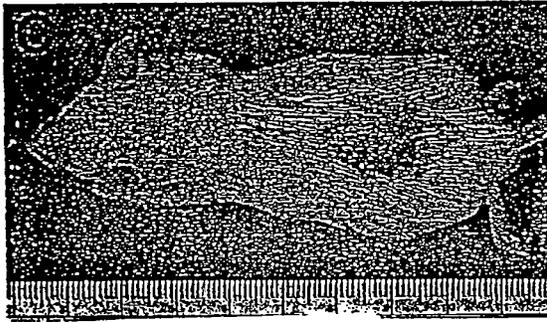


图 20C

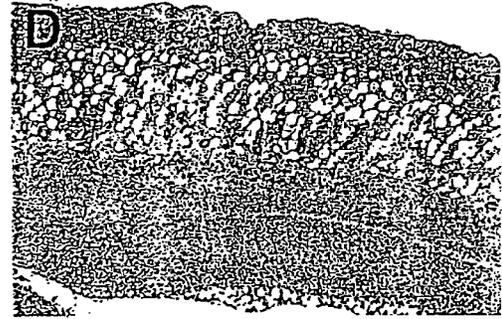


图 20D

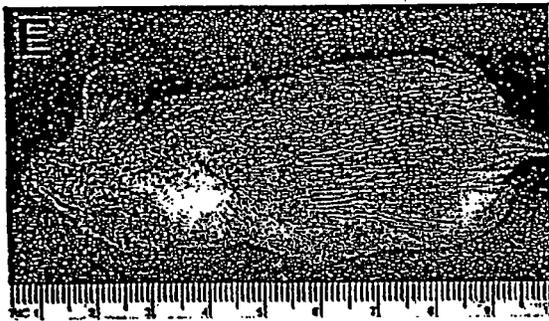


图 20E



图 20F

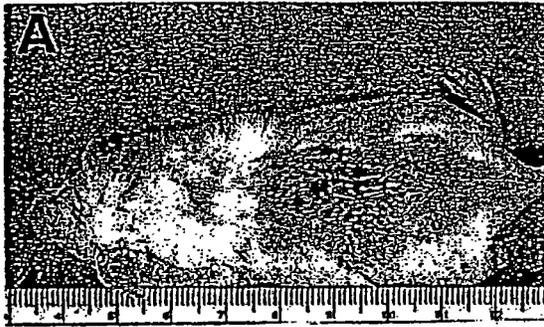


图 21A



图 21B

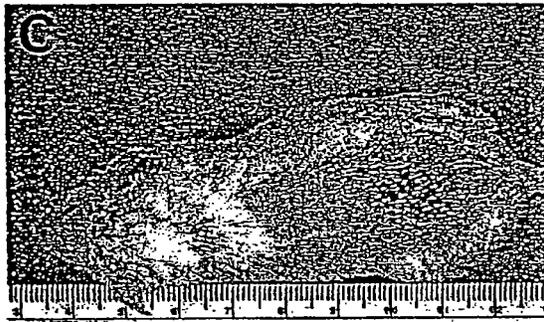


图 21C



图 21D

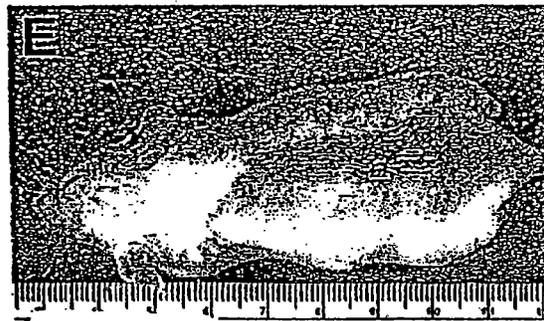


图 21E



图 21F

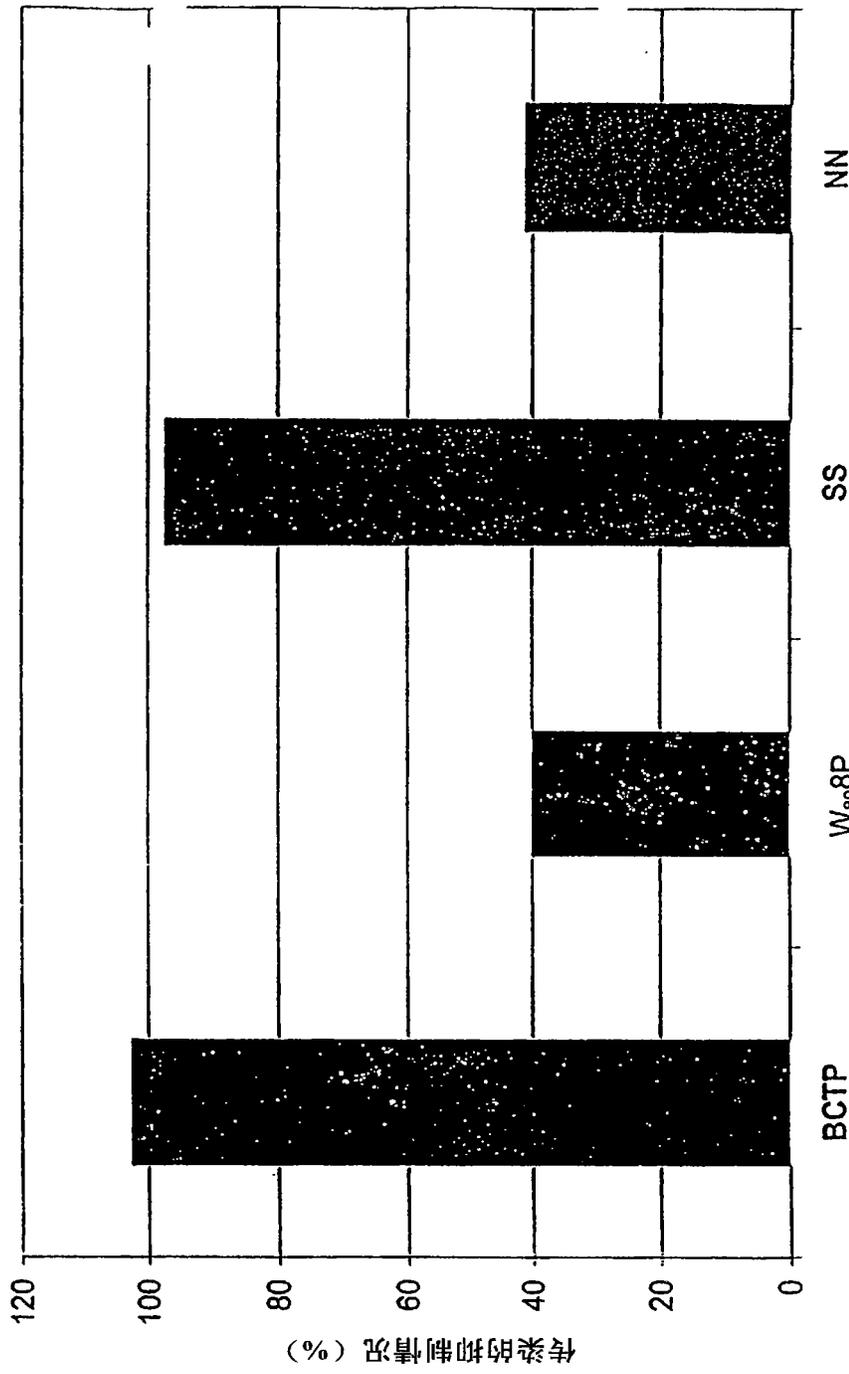


图 22A

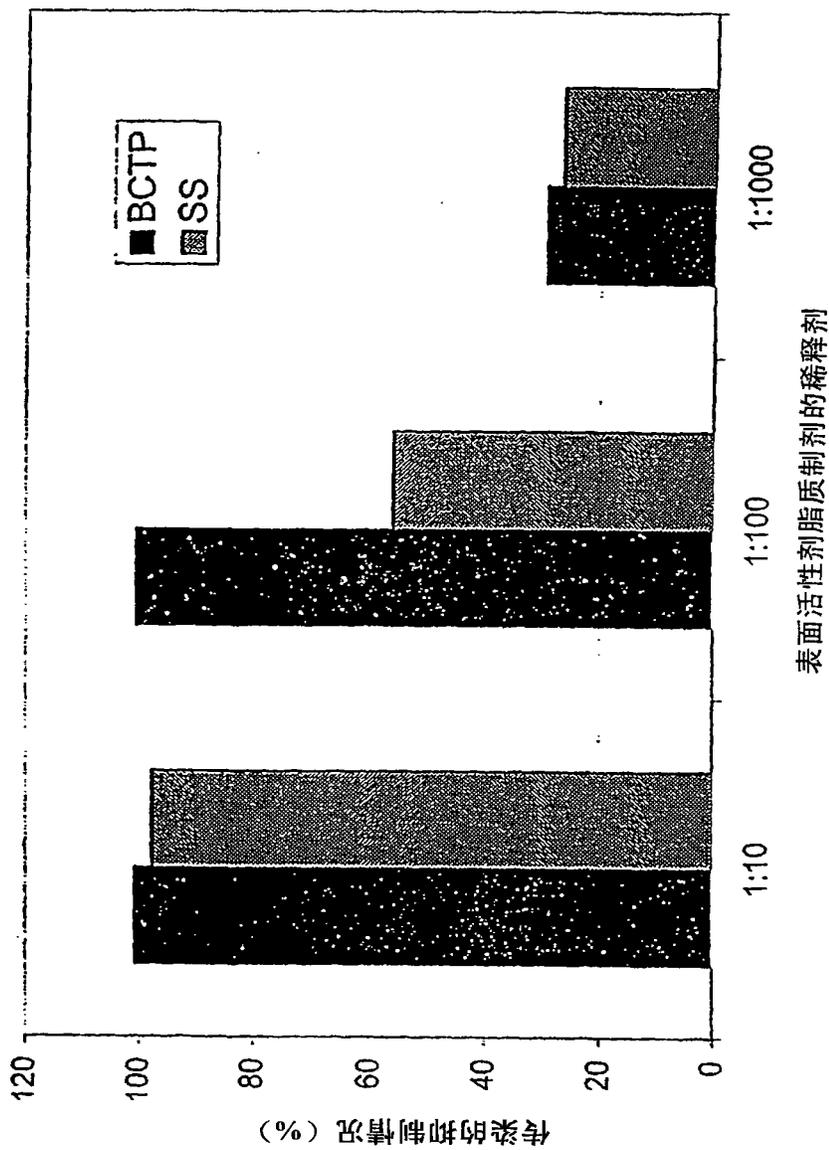
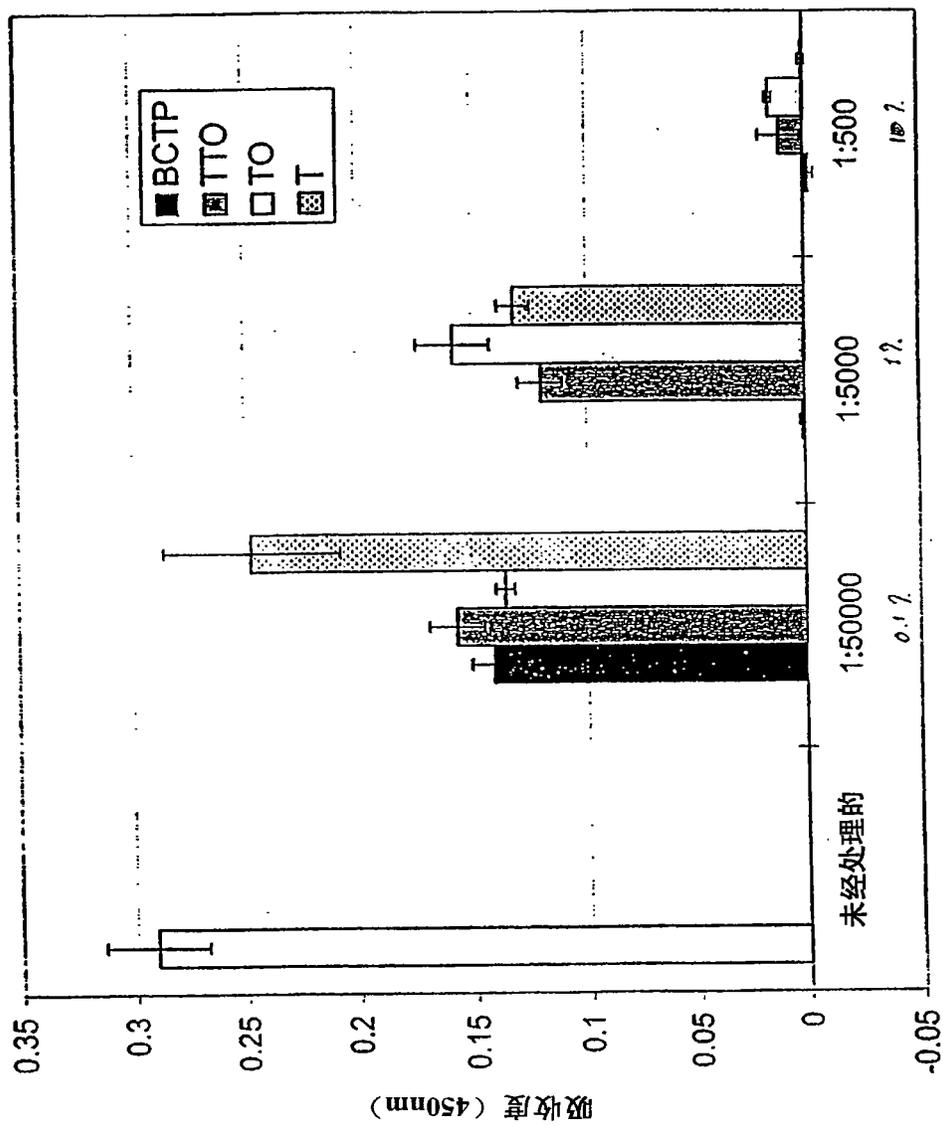


图 22B



TRITON X-100 的稀释度

图 23

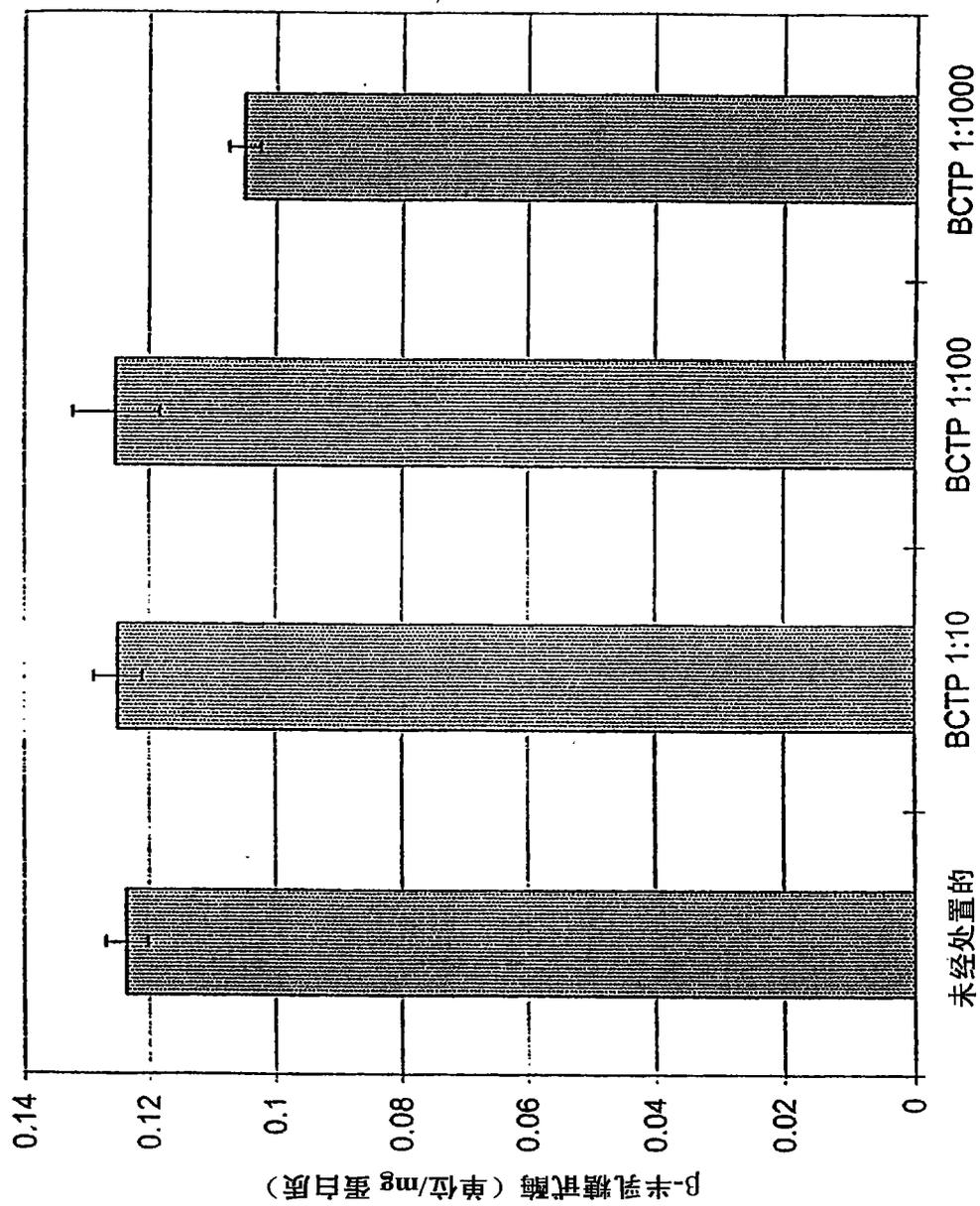


图 24

图 25A

图 25B

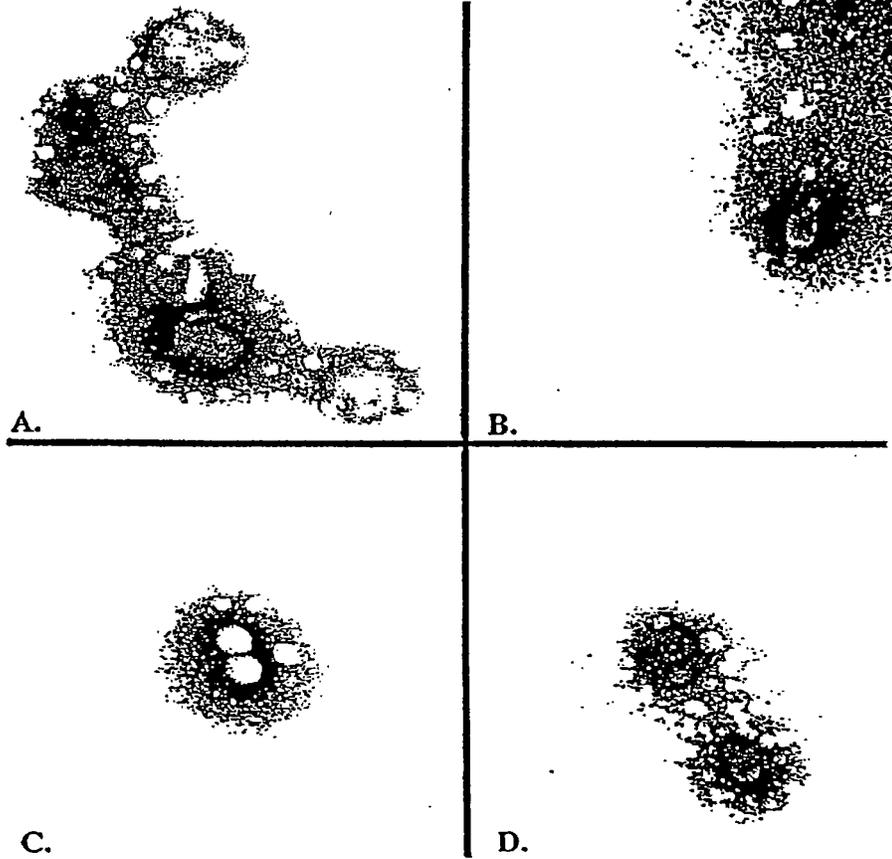


图 25C

图 25D

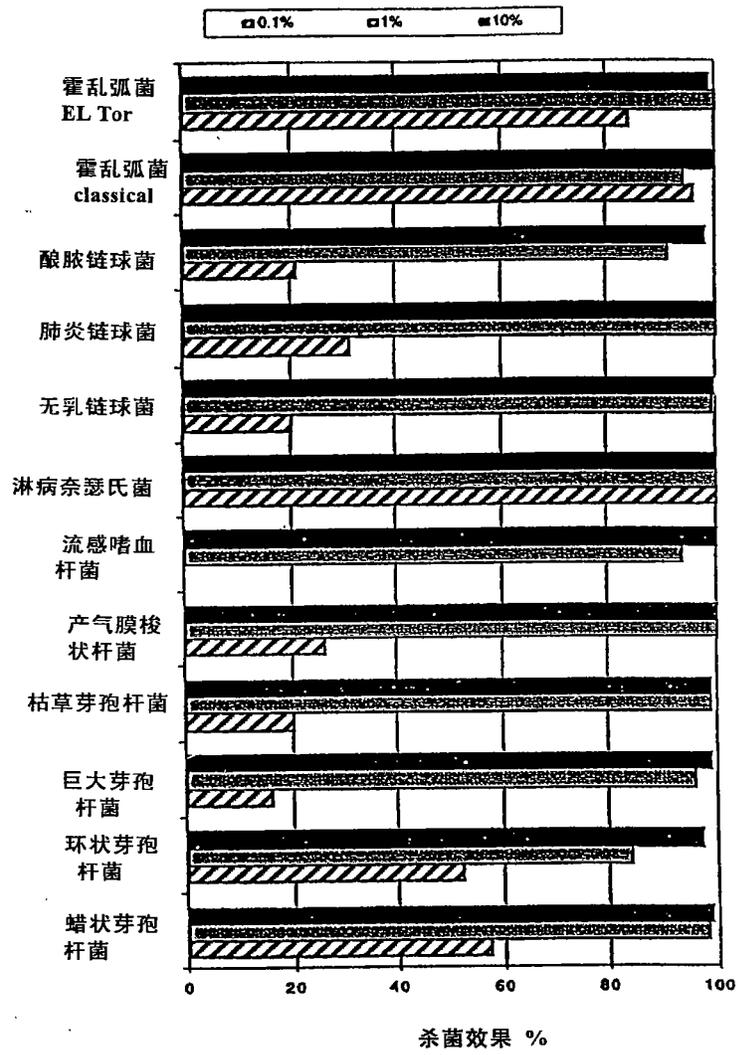


图 26

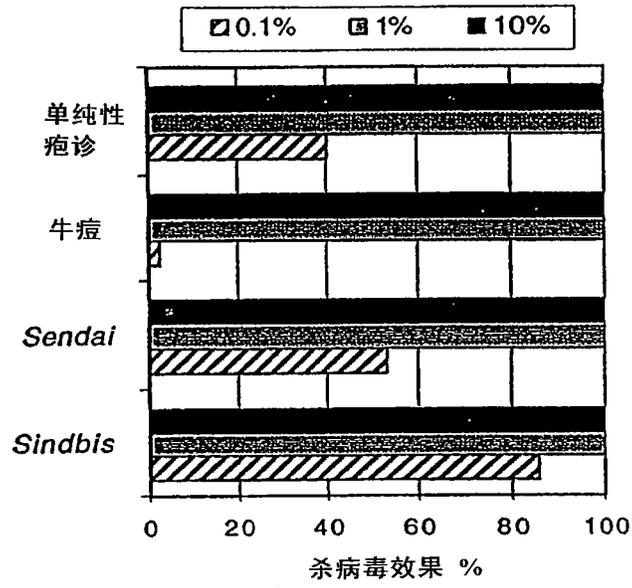


图 27

微生物	
细菌	杆菌属(包括, 蜡状芽孢杆菌、炭疽杆菌、环状芽孢杆菌、枯草杆菌和巨大芽孢杆菌); 梭状芽孢杆菌属(包括, 肉毒梭状芽孢杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌); 大肠杆菌; 嗜血杆菌属(包括流感嗜血杆菌); 单核细胞增多性李斯特氏菌; 奈瑟氏菌属(包括淋病奈瑟氏菌); 变形杆菌属(包括奇异变形杆菌); 假单胞菌属(包括包括绿脓杆菌) 志贺氏菌属(包括异型志贺氏菌); 沙门氏菌属(包括鼠伤寒沙门氏菌) 葡萄球菌属(包括金黄色酿脓葡萄球菌) 链球菌属(包括无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓链球菌); 弧菌属(包括霍乱弧菌、classical 和 Eltor 型); 耶尔森氏菌属(包括小肠结肠炎耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌); 及
包膜病毒	流感病毒(包括 A、B、C 型); 疱疹(包括单纯性疱疹); Sendai; Sindbis; 痘病毒(包括牛痘)
真菌	念珠菌属(包括白色念珠菌和 tropicalis 念珠菌); <u>发癣菌属(包括深红色发癣菌和须发癣菌);</u> <u>石膏样小孢子菌属;</u> <u><i>byssochlymus fulva</i></u>

图 28

乳液制剂		结果
<b>ATB-X100</b>		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
19%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB-T60</b>		较 ATB-X100 效果稍 弱; 对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
5%	TWEEN 60	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
22%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB-XT160</b>		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
0.71%	TWEEN 60	
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
18.29%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB-X</b>		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
5%	Triton X-100	
5%	磷酸三丁酯	
40%	大豆油	
1%	CPC	
49%	DiH <sub>2</sub> O	

图 29

ATB-X1001		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
50%	大豆油	
1%	CPC	
33%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-X1002		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效； 比 ATB-X100 更具刺激性；
5%	TWEEN 60	
8%	磷酸三丁酯	
50%	大豆油	
2%	CPC	
32%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-2		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
0.1%	薄荷油	
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
2%	CPC	
17.9%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-CPB		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌有效
0.1%	薄荷油	
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPB	
18.9%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-1/2		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效，稀释液没有 ATB-X100 足够的效果
0.05%	薄荷油	
4%	Triton X-100	
4%	磷酸三丁酯	
32%	大豆油	
0.5%	CPC	
59.45%	DiH <sub>2</sub> O	

ATB-T3		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效
3%	Tyloxapol	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
23.9%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-T3E pH7.1		对所有的革兰氏阳性 菌, 所有的革兰氏阴性 菌和孢子有效
3%	Tyloxapol	
8%	乙醇	
64%	大豆油	
1%	CPC	
23.8%	DiH <sub>2</sub> O	
0.1%	10N NaOH	
ATB-T22		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌 真菌有效; 尽管洗涤量减少却仍然 稳定
2%	Triton X-100	
2%	Tyloxapol	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
22.9%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-1X		对包膜病毒, 所有的革兰氏阳性菌, 所有的革兰氏阴性菌及 细菌孢子有效
8%	Triton X-100	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
5mM	肌苷	
5 mM	L-丙氨酸	
10 mM	氯化铵	
1 mM	磷酸钠	
13 mM	氯化钠	
18.9%	DiH <sub>2</sub> O	

ATB-T22/GE		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌及 细菌孢子有效
2%	Triton X-100	
2%	Tyloxapol	
8%	磷酸三丁酯	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
5mM	肌苷	
5 mM	L-丙氨酸	
10 mM	氯化铵	
1 mM	磷酸钠	
13 mM	氯化钠	
22.9%	DiH <sub>2</sub> O	
99% ATB-T22/GE		
1.8%	Triton X-100	
1.8%	Tyloxapol	
7.2%	磷酸三丁酯	
57.6%	大豆油	
0.9%	CPC	
0.09%	薄荷油	
5mM	肌苷	
5mM	L-丙氨酸	
10 mM	氯化铵	
1 mM	磷酸钠	
13 mM	氯化钠	
30.61%	DiH <sub>2</sub> O	
ATB-T22E		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌及 真菌有效； 增加口服给药的安全性
2%	Triton X-100	
5%	Tyloxapol	
8%	乙醇	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
23.8%	DiH <sub>2</sub> O	

<b>90% ATB-T22E/GE</b>		对包膜病毒， 所有的革兰氏阳性菌， 所有的革兰氏阴性菌及 真菌有效； 增加口服给药的安全性
1.8%	Triton X-100	
1.8%	Tyloxapol	
7.2%	乙醇 (200proof)	
8%	磷酸三丁酯	
57.6%	大豆油	
0.9%	CPC	
0.09%	薄荷油	
5mM	肌苷	
5 mM	L-丙氨酸	
10 mM	氯化铵	
1 mM	磷酸钠	
13 mM	氯化钠	
30.61%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB-T3E</b>		对所有的革兰氏阳性 菌，所有的革兰氏阴性 菌有效；增加口服给药 的安全性
3%	Tyloxapol	
8%	乙醇	
64%	大豆油	
1%	CPC	
0.1%	薄荷油	
23.9%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB-X100E</b>		
8%	Triton X-100	
8%	乙醇	
64%	大豆油	
1%	CPC	
19%	DiH <sub>2</sub> O	
<b>ATB Tween 20 E</b>		对所有的革兰氏阴性菌 及真菌有效
5%	Tween 20	
1%	CPC	
64%	大豆油	
8%	乙醇	
22%	DiH <sub>2</sub> O	

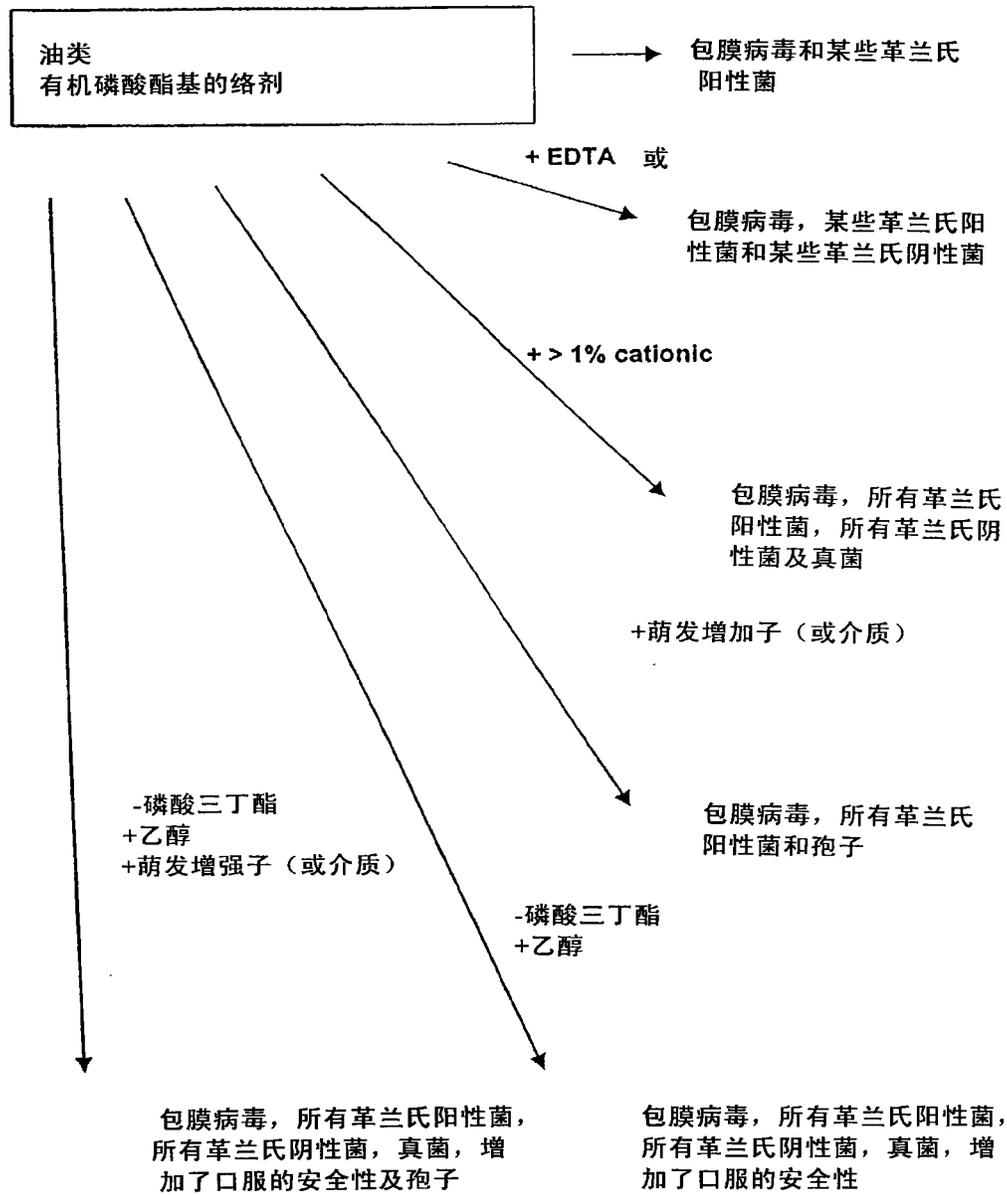


图 30

由不同乳液引起的大肠杆菌的对数下降 (旋转器, 在介质中旋转 15 分钟)

乳液	10%	1%	0.10%
50% X8PC	5.67	2.09	0
D2P	0.17	0	0
EC	5.81	5.81	4.42
GC10	6.02	6.02	6.02
P <sub>5</sub> C*	5.49	5.49	2.39
S <sub>60</sub> 8GL5	0	0	0
S8GL1B1	0	0	0
S8P	0.2	0.18	0.067
W <sub>20</sub> 10EA5*	0	0	0
W <sub>20</sub> 10ECH <sub>3</sub> *	0	0	0
W <sub>20</sub> 10EQ <sub>100X</sub>	0	0	0
W <sub>20</sub> 10EQ <sub>10X</sub>	0	0	0
W <sub>20</sub> 5EC	6.22	6.22	5.48
W <sub>60</sub> PC	5.81	5.81	2.62
W <sub>60</sub> 5EC	6.13	6.13	3.97
X2Y2C*	5.64	5.64	2.37
X2Y2EC	5.61	5.61	5.61
X2Y2P <sub>4</sub> C	5.93	5.93	4
X2Y2PC	5.67	5.67	5.67
X4Y4E	0	0	0
X8E	0	0	0
X8P BC	5.93	4.41	0
X8P CPB	5.59	5.59	2.8
X8P CPB	4.26	0.35	0
X8P CTAB	4.04	0.16	0
X8P X8P 鞣酸	3.84	0	0
X8PC	5.59	5.59	1.79
X8PC2	5.59	5.59	4.42
X8W <sub>60</sub> PC	5.58	5.58	1.05
Y3C	5.48	5.48	3.54
Y3E	0.25	0.19	0.05
Y3EC	6.13	6.13	6.13
Y3EVc5	0	0	0
Y3PC	5.31	5.31	5.31
Y8EC	5.81	5.81	4.62
Y8EC S	0.08	0.08	0.04

图 31A

由不同乳液引起的枯草芽孢杆菌的对数降低（旋转器，在萌发增强子中旋转 4 小时）

乳液	10%	1%	0.10%
50% X8PC	2.21	2.6	2.46
D2P	0.94	1.28	1.75
S8P	0.53	0.94	1.27
W <sub>80</sub> 4Y4E	1.01	1.09	1.5
W <sub>80</sub> 4Y4EC	1.84	2.46	2.62
W <sub>80</sub> 5E	0.73	1.12	1.94
W <sub>80</sub> 5EC	1.8	2.31	2.6
X2E	2.4	2.27	0.5
X2E	2.44	1.15	0.86
X2Y2C	2.63	2.37	4.22
X2Y2E	1.88	1.24	1.08
X2Y2EC	2.55	2.83	3.13
X2Y2EC	1.94	2.19	2.6
X2Y2P <sub>4</sub> C	2.78	2.71	3.44
X2Y2PC	2.93	2.72	4.11
X2Y2PC	2.67	2.57	3.73
X2Y2PC	2.8	2.71	3.95
X2Y6E	2.2	1.73	0.97
X3E	2.49	2.23	1.14
X4E	2.43	2.38	2.44
X4E	2.49	2.25	0.95
X4Y4E	2.61	1.89	1.31
X5E	2.44	2.51	0.41
X5P <sub>5</sub> C	2.39	2.42	2.62
X6E	2.44	2.64	0.92
X6Y2E	2.7	2.62	1.72
X8E	2.19	2.28	0.47
X8E	2.42	2.55	0.92
X8E O	1.26	1.32	0.96
X8PC	2.6	2.73	2.79
X8PC2	2.41	2.47	2.72
Y2PC*	1.37	1.57	3.2
Y3PC	2.32	2.57	3.8
Y3PC	2.33	2.44	3.31
Y8E	0.17	0.3	0.59
Y8E	0.49	0.59	0.6
Y8E O	1.02	0.56	0.7
Y8EC	2.01	2.39	2.56
Y8P	0.89	0.57	0.64

图 31B

纳米乳液系列处置的 A 型流感病毒的对数降低, 经空板降低测定法测定 (培养 30 分钟)

Logs of Reduction			
化合物	1:10	1:100	1:1000
X2Y2E	0	0	0
X4Y4E	0	0	0
X6Y2E	0	0	0
X2Y6E	1.93	0	0
S608GL5	0	0	0
Y8E	0	0	0
Y3E	0	0	0
Y8ES	0	0	0
Y8	0	0	0
X2E	2.08	1.38	0
X3E	2.6	0	0
X4E	3.16	1.61	0
X5E	3.16	1.61	0
X6E	3.42	3.42	3.42
X8E	3.86	3.86	0
X8E (未提纯的油)	3.86	3.21	0
X8G	2.74	2.74	0
X8B	3.82	2.36	0
X8EO	3.86	3.42	0
D2P	3.97	3.97	0.97
D2G	3.82	3.82	0.00
S3Y3G STS5	2.26	0	0.00
S8GL1B1	3.82	3.82	0.74
S8G	4.1	4.1	0.00
S8P	3.97	3.97	2.71
W <sub>80</sub> 5E	0	0	0
W <sub>80</sub> 4Y4E	0	0	0
W <sub>80</sub> 8	0	0	0
W <sub>20</sub> 5E	0	0	0
W <sub>80</sub> 4Y4EC	3	3	2
W <sub>80</sub> 5EC	3	3	3
W <sub>20</sub> 5EC	3	3	3.3
X2Y2EC	3	3	2
X2Y2PC	3	3	3
X8PC	4.98	4.98	4.98
X8GC	4.68	4.68	4.68
X8EC	4.1	4.1	1.97
Y8EC	3	3	2
Y3EC	3	3	2
Y3EC	3	3	2.12
Y3PC	3	3	2.63
EC	3	3	3
GC	4.14	4.14	4.14
ATB-EDTA	3	3	1.98
Y2X2SPC	1.10	1.10	0

S=山梨酸  
B=苯甲酸苄酯  
O=橄榄油  
S= SDS

图 31C

图 32

含有 0.1%EDTA 的 W<sub>20</sub>SEC 处置鼠伤寒沙门氏菌  
(40°C 水浴, 15 分钟, 用自来水稀释, 10% 生物载体)

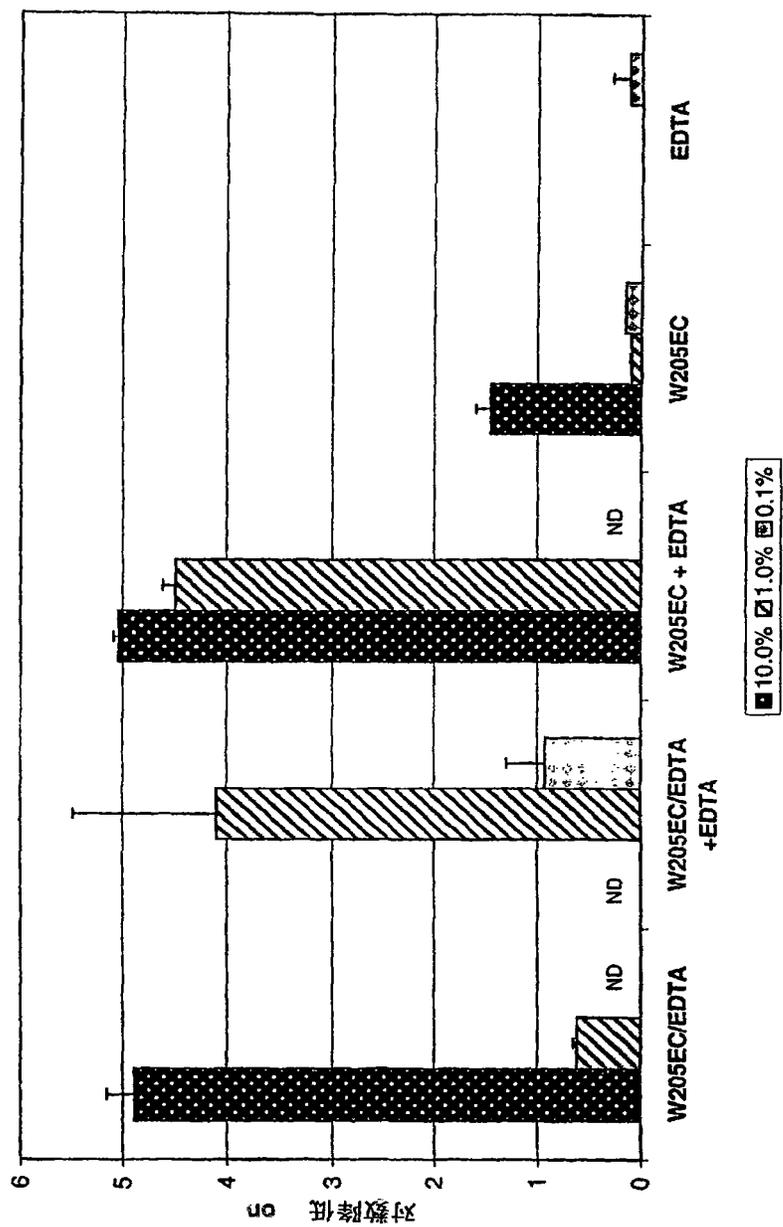


图 33  
含 0.1%EDTA 的 W<sub>205</sub>EC 处置鼠伤寒沙门氏菌  
(50°C水浴, 用自来水稀释, 10%生物载体)

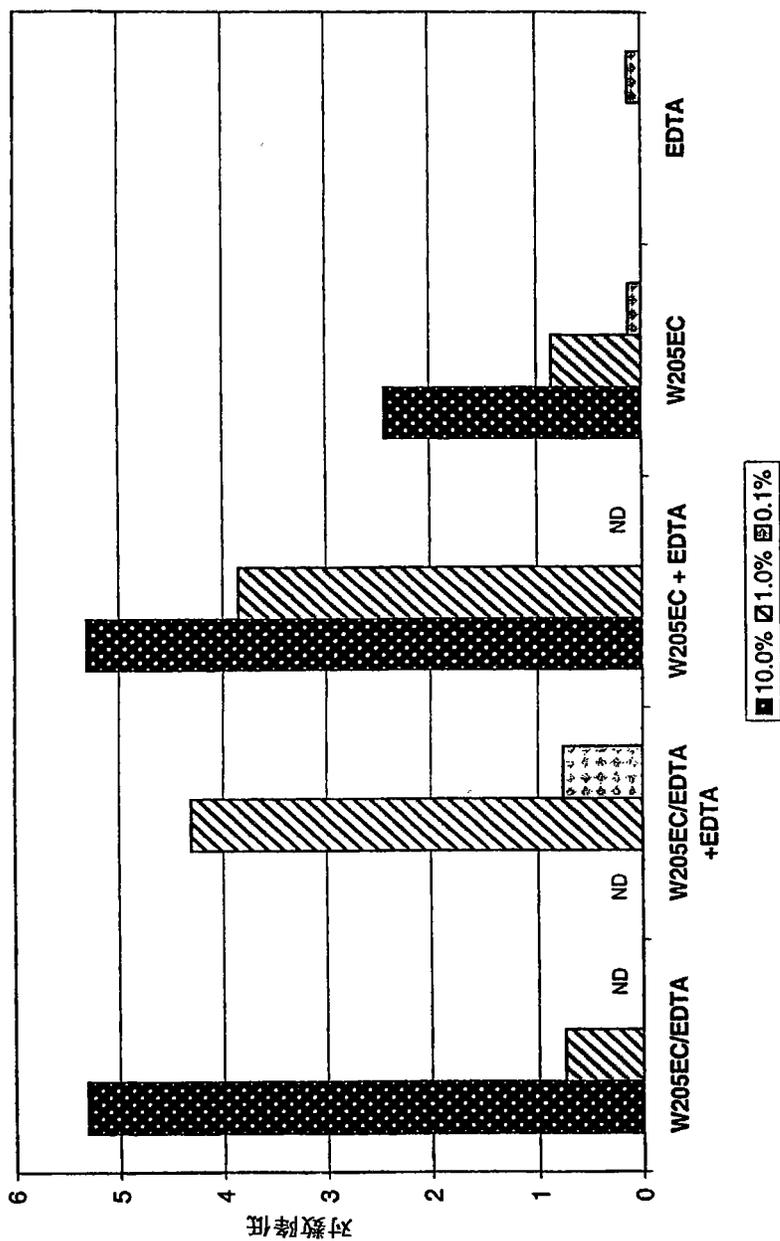
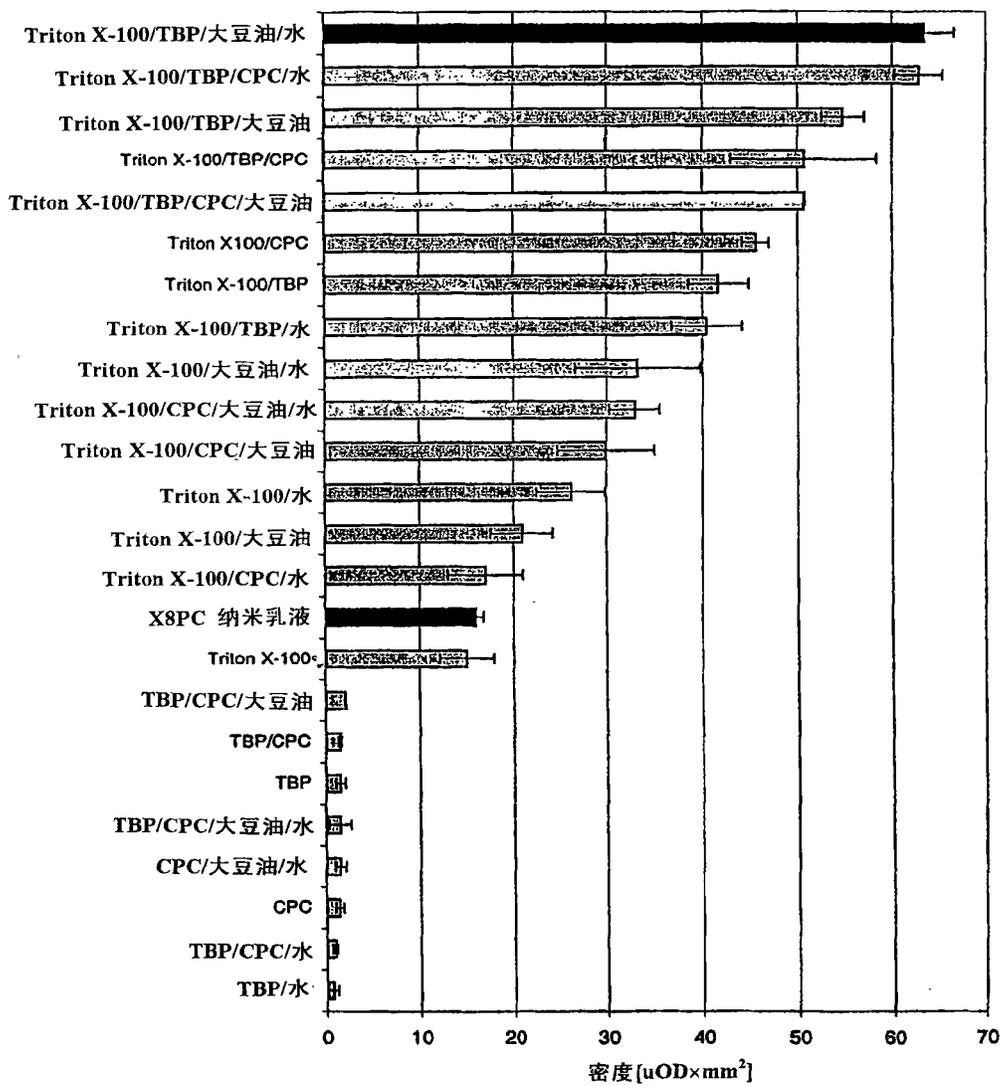
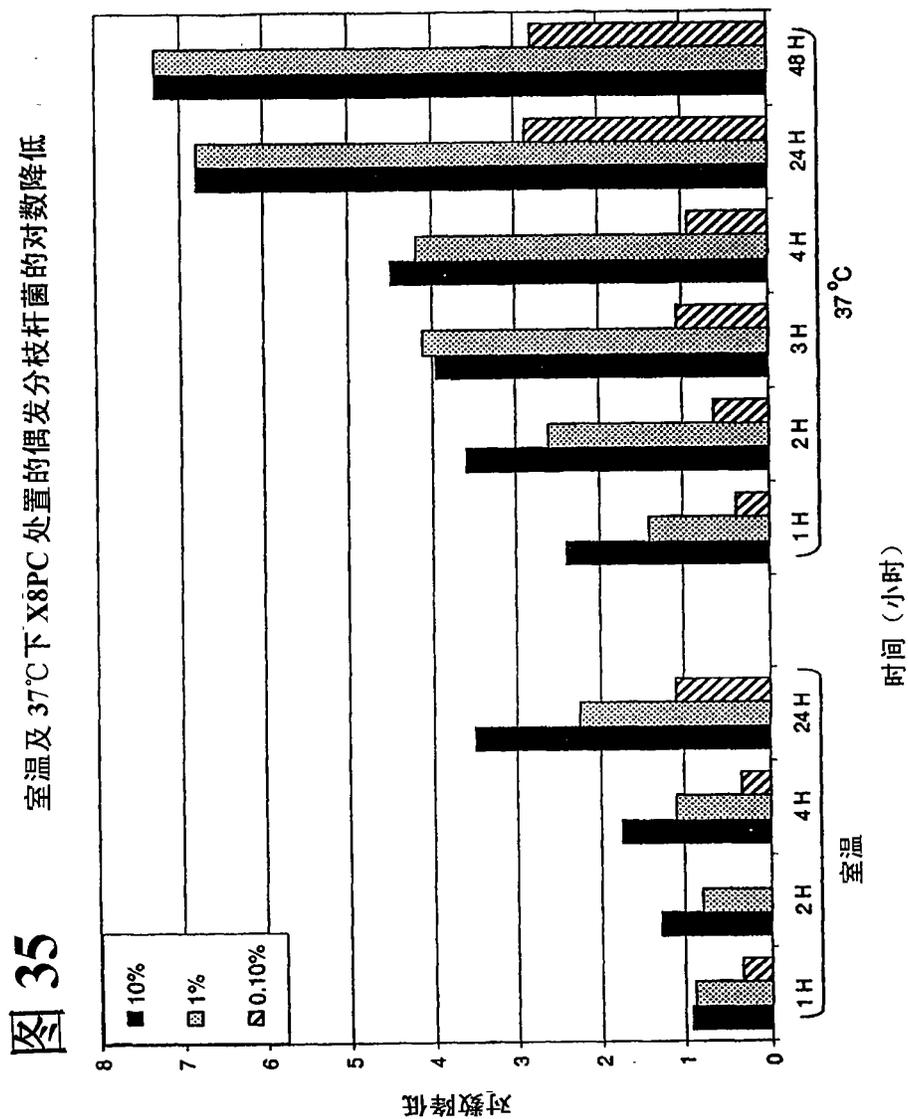


图 34

用血液琼脂平板测定 X8PC 的溶菌效果及其组分在绵羊血细胞上的作用





dH<sub>2</sub>O

处置类型	处置前数量/ sq ft	处置后数量/ sq ft	变化量 (5 分钟)
W <sub>20</sub> 5EC 50°C	5.63 X 10 <sup>7</sup>	0	0
W <sub>20</sub> 5EC RT	8.05 X 10 <sup>7</sup>	0	6 X 10 <sup>5</sup>
H <sub>2</sub> O 50°C	7.96 X 10 <sup>7</sup>	0	too 多得难以计数 unt
H <sub>2</sub> O RT	1.15 X 10 <sup>8</sup>	0	too 多得难以计数 unt

## 蒸馏水

处置类型	处置前数量/ sq ft	处置后数量/ sq ft	变化量 (5 分钟)
W <sub>20</sub> 5EC 50°C	2.9 X 10 <sup>8</sup>	0	0
W <sub>20</sub> 5EC 40°C	1.7 X 10 <sup>8</sup>	3.46 X 10 <sup>5</sup>	1.8 X 10 <sup>5</sup>
H <sub>2</sub> O 50°C	2.13 X 10 <sup>7</sup>	0	1.5 X 10 <sup>8</sup>
H <sub>2</sub> O 40°C	1.3 X 10 <sup>8</sup>	2.3 X 10 <sup>5</sup>	6.7 X 10 <sup>7</sup>

## 自来水

处置类型	处置前数量/ sq ft	处置后数量/ sq ft	变化量 (5 分钟)
W <sub>20</sub> 5EC 50°C	1.4 X 10 <sup>8</sup>	0	3 X 10 <sup>5</sup>
W <sub>20</sub> 5EC 40°C	5.65 X 10 <sup>7</sup>	0	6 X 10 <sup>5</sup>
W <sub>20</sub> 5EC RT	1.9 X 10 <sup>8</sup>	5.76 X 10 <sup>4</sup>	1.26 X 10 <sup>6</sup>
H <sub>2</sub> O 50°C	1.75 X 10 <sup>8</sup>	0	4.68 X 10 <sup>7</sup>
H <sub>2</sub> O 40°C	6.35 X 10 <sup>7</sup>	0	2.2 X 10 <sup>8</sup>
H <sub>2</sub> O RT	2.74 X 10 <sup>8</sup>	4 X 10 <sup>5</sup>	1.5 X 10 <sup>8</sup>

图 36