



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115884758 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 31

(21) 申请号 202180044441.X

(22) 申请日 2021.04.19

(30) 优先权数据

2005987.9 2020.04.23 GB

2008288.9 2020.06.02 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/050935 2021.04.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/214440 EN 2021.10.28

(71) 申请人 三十呼吸有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 H·S·芒罗 C·B·伍德

N·D·布特 C·波尔

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 徐婕超

(51) Int.Cl.

A61K 31/047 (2006.01)

A61K 31/194 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

权利要求书4页 说明书85页 附图31页

(54) 发明名称

用于治疗SARS-CoV和SARS-CoV-2的一氧化氮或释放一氧化氮的组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种或多种剂,其选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮(NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物的成分的组合或组合式联合以及它们的混合物,所述剂用作针对SARS-CoV或SARS-CoV-2冠状病毒的抗病毒剂。

1. 一种或多种剂,其选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮(NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物成分的组合物或组合式联合以及它们的混合物,所述剂用作针对SARS-CoV冠状病毒和疾病SARS或SARS-CoV-2冠状病毒和疾病COVID-19的抗病毒剂。

2. 根据权利要求1所述的供使用的剂,其中所述抗病毒剂是针对SARS-CoV冠状病毒和疾病SARS的剂。

3. 根据权利要求1所述的供使用的剂,其中所述抗病毒剂是针对SARS-CoV-2冠状病毒和疾病COVID-19的剂。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的剂,其中所述剂是或包含一种或多种有机羧酸,例如柠檬酸。

5. 根据权利要求1或权利要求2或权利要求3所述的供使用的剂,其中所述产生一氧化氮的组合物或所述产生一氧化氮的组合物成分的组合物或组合式联合包含一种或多种亚硝酸盐、包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸的质子源以及任选的一种或多种有机多元醇。

6. 根据权利要求5所述的供使用的剂,其中所述一种或多种有机多元醇在存在时包含糖醇,所述糖醇包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元。

7. 根据权利要求5所述的供使用的剂,其中所述有机多元醇包含甘露糖醇、乳糖醇或它们的混合物。

8. 根据权利要求5至7中任一项所述的供使用的剂,其中所述质子源包含柠檬酸、抗坏血酸或它们的混合物。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的剂,其中所述剂是或包含一种或多种有机羧酸或一种或多种有机非羧酸还原酸,其中所述酸被缓冲到比所述酸的水溶液在相同浓度下所表现出的pH值更高的pH值。

10. 根据权利要求9所述的供使用的剂,其中所述更高的pH值在约5至8的范围内。

11. 根据权利要求9所述的供使用的剂,其中所述更高的pH值大于或等于5.2。

12. 根据权利要求11所述的供使用的剂,其中所述更高的pH值在5.2至6的范围内。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的剂,其中所述剂是或包含一氧化氮、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物成分的组合物或组合式联合或者它们的混合物。

14. 根据权利要求5至从属于权利要求5的权利要求13中任一项所述的供使用的剂,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备,所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的所述组合物中所需的浓度以所需比例混合,以形成浓缩预混合物,随后适当地用水稀释所述浓缩预混合物,从而提供有待使用的所述组合物。

15. 根据权利要求5至从属于权利要求5的权利要求13中任一项所述的供使用的剂,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备,所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以呈有待使用的形式的所述组合物所需的浓度以所需比例混合,从而提供有待使用的所述组合物。

16. 根据权利要求14或权利要求15所述的供使用的剂,其中所述抗病毒剂是针对SARS-

CoV冠状病毒和疾病SARS的剂。

17. 根据权利要求14或权利要求15所述的供使用的剂,其中所述抗病毒剂是针对SARS-CoV-2冠状病毒和疾病COVID-19的剂。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的剂,其中所述一氧化氮、所述产生一氧化氮的组合物、所述产生一氧化氮的组合物成分的组或组合式联合、用于进行所述使用的方法、用于进行所述使用的物质或组合物、用于进行所述使用的试剂盒或用于进行所述使用的分配器中的一者或多者如本申请第124页至第138页上的陈述1至43中的任一项所定义。

19. 根据权利要求18所述的供使用的剂,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求14或从属于权利要求14的权利要求16或17中定义的方法来制备。

20. 根据权利要求18所述的供使用的剂,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求15或从属于权利要求15的权利要求16或17中定义的方法来制备。

21. 一种治疗或减轻或预防人类或动物受试者中由SARS-CoV或SARS-CoV-2冠状病毒引起的感染的方法,所述方法包括向所述人类或动物受试者,例如向所述受试者的肺施用抗病毒有效量的一种或多种剂,所述剂选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮(NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物成分的组或组合式联合以及它们的混合物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述抗病毒剂是用于治疗SARS-CoV冠状病毒和SARS的剂。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中所述抗病毒剂是用于治疗SARS-CoV-2冠状病毒和COVID-19的剂。

24. 根据权利要求21或权利要求22或权利要求23所述的方法,其中用于所述方法的所述剂是根据权利要求2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中任一项所述的供使用的剂,条件是本申请第124页至第138页上的陈述1至43中提及有机羧酸和有机非羧酸还原酸作为“质子源”应理解为同等地适用于鉴定和例示可用作根据权利要求21所述的方法中的活性剂或活性剂的组分的有机羧酸和有机非羧酸还原酸。

25. 根据权利要求21或权利要求22或权利要求23或权利要求24所述的方法,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备,所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的所述组合物中所需的浓度以所需比例混合,以形成浓缩预混合物,随后适当地用水稀释所述浓缩预混合物,从而提供有待使用的所述组合物。

26. 根据权利要求21或权利要求22或权利要求23或权利要求24所述的方法,其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备,所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以呈有待使用的形式的所述组合物所需的浓度以所需比例混合,从而提供有待使用的所述组合物。

27. 根据权利要求21至26中任一项所述的方法,其中所述一氧化氮、所述产生一氧化氮的组合物、所述产生一氧化氮的组合物成分的组或组合式联合、用于进行所述方法的物质或组合物、用于进行所述方法的试剂盒或用于进行所述方法的分配器中的一者或多者如本申请第124页至第138页上的陈述1至43中的任一项所定义。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求25中所定义的方法制备。

29. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求26中所定义的方法制备。

30. 一种处理表面或空间以减少所述表面上或所述空间中的活SARS-CoV或SARS-CoV-2冠状病毒的量的方法, 所述表面或空间例如作为人体或动物体的一部分的例如肺的表面或空间或者无生命的表面或空间, 所述方法包括将抗病毒有效量的一种或多种剂施加于所述表面或所述空间或它们的附近, 所述剂选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮(NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物成分的组合物或组合式联合以及它们的混合物。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述抗病毒剂是用于治疗SARS-CoV冠状病毒的剂。

32. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述抗病毒剂是用于治疗SARS-CoV-2冠状病毒的剂。

33. 根据权利要求30或权利要求31或权利要求32所述的方法, 其中用于所述方法的所述剂是根据权利要求2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中任一项所述的供使用的剂, 条件是本发明第124页至第138页上的陈述1至43中提及有机羧酸和有机非羧酸还原酸作为“质子源”应理解为同等地适用于鉴定和例示可用作根据权利要求30所述的方法中的活性剂或活性剂的组分的有机羧酸和有机非羧酸还原酸。

34. 根据权利要求30或权利要求31或权利要求32或权利要求33所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备, 所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的所述组合物中所需的浓度以所需比例混合, 以形成浓缩预混合物, 随后适当地用水稀释所述浓缩预混合物, 从而提供有待使用的所述组合物。

35. 根据权利要求30或权利要求31或权利要求32或权利要求33所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如下方法来制备, 所述方法包括将所述亚硝酸盐、所述质子源和所述有机多元醇组分以呈有待使用的形式的所述组合物所需的浓度以所需比例混合, 从而提供有待使用的所述组合物。

36. 根据权利要求30至35中任一项所述的方法, 其中所述一氧化氮、所述产生一氧化氮的组合物、所述产生一氧化氮的组合物成分的组合物或组合式联合、用于进行所述方法的物质或组合物、用于进行所述方法的试剂盒或用于进行所述方法的分配器中的一者或多者如本发明第124页至第138页上的陈述1至43中的任一项所定义。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求34中所定义的方法制备。

38. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述产生一氧化氮的组合物是或能通过如权利要求35中所定义的方法制备。

39. 一种组合物、物质、试剂盒、分配器或装置, 其用于根据权利要求21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37和38中任一项所述的方法中。

40. 一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体, 当使用根据权利要求39所述

的分配器进行分配时,用于治疗或减轻或预防人类或动物受试者中由SARS-CoV或SARS-CoV-2冠状病毒引起的感染,或用于处理表面或空间以减少所述表面上或所述空间中的活SARS-CoV或SARS-CoV-2冠状病毒的量,所述表面或空间例如作为人体或动物体的一部分的例如肺的表面或空间或者无生命的表面或空间。

41.根据权利要求40所述的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,当被分配时,用于治疗或减轻或预防人类或动物受试者中由SARS-CoV引起的SARS感染。

42.根据权利要求40所述的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,当被分配时,用于处理无生命的表面或空间以减少所述表面上或所述空间中活SARS-CoV冠状病毒的量。

43.根据权利要求40所述的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,当被分配时,用于治疗或减轻或预防人类或动物受试者中由SARS-CoV-2引起的COVID-19感染。

44.根据权利要求40所述的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,当被分配时,用于处理无生命的表面或空间以减少所述表面上或所述空间中活SARS-CoV-2冠状病毒的量。

用于治疗SARS-CoV和SARS-CoV-2的一氧化氮或释放一氧化氮的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗 and 抗击冠状病毒SARS CoV和SARS-CoV-2的方法和组合物,冠状病毒SARS CoV和SARS-CoV-2分别是引起疾病SARS和COVID-19的病毒。

背景技术

[0002] 呼吸道病毒是发病率和死亡率的主要原因。甲型流感、人鼻病毒 (HRV)、呼吸道合胞病毒 (RSV) 和冠状病毒 (CoV) 是单链RNA病毒,它们会引起肺炎或诱发慢性呼吸道疾病,如哮喘和慢性阻塞性肺病 (COPD) 的恶化 (Johnston, S L, Proc. Am. Thorac. Soc. 2, 150-156 (2005); Kurai, D等人, Front. Microbiol. 4, 1-12 (2013))。已在体外显示一氧化氮抑制许多呼吸道病毒的复制,所述病毒包括甲型和乙型流感病毒 (Rimmelzwaan, G F等人, J. Virol 73, 8880-8883 (1999); Regev-Shoshani, G等人, Nitric Oxide 31, 48-53 (2013))、人鼻病毒 (HRV) (Sanders, S P等人, J. Virol 72, 934-942 (1998))、呼吸道合胞病毒 (RSV) (Ahmad, A等人, Frontiers in Biosciences 8, a48-53 (2003)) 和严重急性呼吸综合征 (SARS) - 冠状病毒 (CoV) (Akerstrom, S等人, J. Virology 79, 1966-1969 (2005))。以上引用的出版物的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0003] 呼吸道疾病COVID-19是由SARS-CoV-2冠状病毒引起的,世界卫生组织 (World Health Organisation, WHO) 在2020年3月宣布其为大流行。

[0004] 本发明基于以下意外的发现:选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮 (NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物的组分或成分的组合或组合式联合以及它们的混合物的一种或多种剂是针对SARS-CoV-2冠状病毒的体外有效抗病毒剂,提供了对人和动物中由SARS-CoV-2冠状病毒引起的COVID-19的有效体内治疗 (治疗与预防)。研究针对SARS-CoV-2和SARS-CoV的抗病毒活性之间的相似性的实验工作与这些病毒的先验知识一起显示或表明,相同的剂也对SARS-CoV具有活性。本发明还提供了对表面 (包括无生命的表面以及手、手臂和人体或动物体的其它外表面) 和空间的有效抗病毒处理,从而预防SARS-CoV和SARS-CoV-2冠状病毒的传播和表面的污染。在本发明的一个优选的实施方案中,一氧化氮可以通过NO产生系统产生,该系统本身包括质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸的酸。这类系统可以具体化为产生NO的组合物,它可以施用于患者的肺。

[0005] 活性剂,例如一种或多种羧酸、一种或多种有机非羧酸还原酸、产生NO的组合物、产生一氧化氮的组合物的组分或成分的组合或组合式联合或者它们的混合物可以呈任何合适的物理形式,例如呈液体形式或呈夹带在载气中或空气中的液滴形式,例如呈气溶胶或雾状递送到患者的肺中。

[0006] 根据本发明,还发现用作产生一氧化氮的质子源的酸活性剂或酸在缓冲到相对较高的pH值时可有效的,例如pH值介于约5与约8之间,例如为或高于约5.2,例如在5.2至5.8的范围内,即,在生理学上为患者的口腔、鼻腔通道、气道和肺的组织耐受的pH值。

[0007] 产生一氧化氮和NO的组合物具有一系列的抗微生物和其它有利的生理活性,如本文中所论述,因此,本发明提供的针对SARS-CoV和SARS-CoV-2的抗病毒作用可伴随有同时针对其它可能感染患者或患者容易感染的病原体(包括继发性细菌、病毒、寄生虫和真菌感染)的有益活性。

[0008] 产生NO的组合物可通过以下方法之一来制备:

[0009] (a) 制备产生NO_x的组合物的方法,所述方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的组合物中所需的浓度以所需比例混合,以形成浓缩预混合物,随后适当地用水稀释所述浓缩预混合物,从而提供有待使用的组合物;

[0010] (b) 制备产生NO_x的组合物的方法,所述方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以呈有待使用的形式的组合物所需的浓度以所需比例混合,从而提供有待使用的组合物。

[0011] 这些替代性方法构成了本发明的具体方面。

[0012] 先前已经报告了有机羧酸的某些抗病毒活性。Koromyslova等人于2015年(A D Koromyslova等人,Virology 485,199-204)描述了柠檬酸治疗诺如病毒(norovirus)颗粒的用途。美国专利No.8,034,844 (Fox等人)要求一种降低表面上的病毒群体的方法,所述方法包括使表面与固体组合物接触,所述固体组合物包含粉末状固体基质和杀病毒有效量的有机酸,所述有机酸包含(i)两种或更多种选自以下组成的组的多元羧酸:丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、癸二酸、富马酸、马来酸、酒石酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、乌头酸和它们的混合物,和(ii)选自以下组成的组的水溶性或水分散性聚合酸:聚合羧酸、聚合磺酸、硫酸化聚合物、聚合磷酸和它们的混合物。美国专利No.6,034,133 (Hendley等人)要求一种用于杀死鼻病毒和预防鼻病毒诱发的感冒的传播的方法,所述方法包括以下步骤:鉴定正患有鼻病毒感冒或可能暴露于鼻病毒的患者;和以适合于根除鼻病毒的量向所述患者的手施加杀病毒组合物,所述杀病毒组合物包含柠檬酸、苹果酸和C₁₋₆醇,所述施加步骤在所述患者被鉴定为正患有鼻病毒感冒之后或在所述患者暴露于鼻病毒之前进行。以上引用的出版物的公开内容以引用的方式并入本文中。然而,现有技术中没有一者教导或提出有机羧酸针对冠状病毒SARS-CoV和SARS-CoV-2的活性。

[0013] 已经对一氧化氮(NO)和一氧化氮前体作为潜在的药剂进行了广泛的研究。一氧化氮是一种有效的血管扩张剂,它由血管内皮细胞合成和释放,在调控尤其血管局部阻力和血流中起重要作用。在哺乳动物细胞中,通过L-精氨酸的酶促氧化,一氧化氮主要与L-瓜氨酸一起产生。一氧化氮还通过似乎与NO合酶无关的机制从皮肤中释放。一氧化氮还参与对血小板和白细胞的聚集和粘附的抑制、对细胞增殖的抑制、超氧化物自由基的清除和内皮细胞层渗透性的调节。一氧化氮在癌症治疗中的作用论述于Biochemistry (Moscow) ,63 (7) ,802-809 (1998) ,公开内容以引用的方式并入本文中。已经显示一氧化氮具有抗微生物性质,如F C Fang在J.Clin.Invest.99 (12) ,2818-2825 (1997) 中所评述,以及如例如在WO 95/22335和WO 02/20026 (AberdeenUniversity) 中所述,公开内容以引用的方式并入本文中。本发明的以下描述中给出了用于产生一氧化氮、其它氮氧化物和其前体的系统的其它已知用途和应用。

[0014] 与一氧化氮、其它氮氧化物和其前体的有效产生和递送到生物体和细胞进行治疗有关的问题仍然相当多。广泛用于产生一氧化氮的系统依赖于使用无机酸来酸化亚硝酸

盐,最初产生与起始亚硝酸盐相比等摩尔量的亚硝酸(HNO_2),然后亚硝酸容易分解成一氧化氮和硝酸盐与氢离子和水。分解可由以下平衡方程(1)表示:



[0016] 通常在小于约4的pH值下进行亚硝酸盐的酸化,一般在该pH值下有助于亚硝酸的形成,以设法最大程度地产生NO。然而,pH<4的使用不适合于酸与动物组织接触的体内使用。pH值越高,对细胞和生物系统越温和,但在超过4的pH值下,先前的系统无法产生NO的令人满意的产率。为了设法在超过pH 4下增加产生的NO的量,需要大量的亚硝酸盐,这在治疗应用中是不切实际的,并且不经济。另外,考虑到亚硝酸的半衰期短,方程(1)表示的转化率不容易控制,因此难以控制用于治疗用途的一氧化氮的释放。在一种或多种亚硝酸盐与质子源之间进行的产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应在本文中称为“产生NO_x的反应”或“NO_x产生反应”或类似的词语,并且“NO_x”用于指亚硝酸盐酸化的产物,尤其是一氧化氮、其它氮氧化物和其前体,个别地和呈任何组合一起。应了解,产生的NO_x的每种组分可呈气体释出,或可在反应混合物中溶入溶液,或可最初溶入溶液,随后呈气体释出,或它们的任何组合。

[0017] WO 00/53193(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了一种乳膏或软膏,其用于治疗皮肤局部缺血和促进伤口愈合,其中质子源是抗坏血酸。实施例1描述了一种基于KY Jelly™的凝胶,在实施例7中,在与皮肤直接接触的情况下和用膜保护皮肤的情况下测试凝胶。据称抗坏血酸的使用避免了显著的皮肤炎症(WO 00/53193第2页)。然而,实际上,当凝胶直接接触皮肤时,由凝胶低pH值引起的皮肤炎症程度是令人不满意的,而当存在膜时,皮肤保护膜会减弱凝胶的作用。结果凝胶无法上市。WO 00/53193的组合物不含多元醇。

[0018] WO 02/20026(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了一种皮肤制剂,其用于治疗皮肤的耐药性感染,其中质子源是柠檬酸或水杨酸。从双筒分配器中分配含亚硝酸盐的组合物和含酸的组合物,然后所述组合物进行混合,以使酸与亚硝酸盐反应,然后涂敷到皮肤上。教示丙二醇和聚乙二醇是任选的防腐剂,教示甘油(丙三醇)是任选的触变剂,供亚硝酸盐组合物使用。丙二醇用于分别柠檬酸和亚硝酸盐的一对乳膏中,当场进行混合以引发酸与亚硝酸盐之间的反应(例如WO 02/20026实施例3制剂1)。丙三醇与十六十八醇一起用于分别柠檬酸和亚硝酸盐的一对洗剂中,当场进行混合以引发酸与亚硝酸盐之间的反应(例如WO 02/20026实施例3制剂3)。反应混合物的优选pH值是5或更低、特别是4或更低的pH值,预计该pH值将引起不良的皮肤炎症。还教示鼻喷雾,其可使用还原酸,例如抗坏血酸或抗坏血酸棕榈酸盐,以使得可使用更高的pH值以避免刺激敏感的鼻粘膜。然而,公认的是(WO 02/20026第16页第二段)更高的pH值将减慢反应。

[0019] US 6103275(2000年8月15日公布)(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了例如抗坏血酸的还原剂与pKa介于1与4之间的有机酸如马来酸一起用于酸化亚硝酸盐。粘性(凝胶)组合物用于减缓反应产物的释放以供局部使用。酸和亚硝酸盐保持分开,直到开始产生一氧化氮,并说明还原剂包括于第一凝胶和第二凝胶中的至少一者中。方法使用的pH值范围未指定。然而,缓冲剂组分称为酸的事实可指示这些化合物主要以质子化形式存在,因此组合物的pH值应基本上低于4。pKa介于1与4之间的酸的存在确保制剂在该pH值下良好的缓冲能力。虽然并入这类酸是一种确保pH值维持在使亚硝酸盐转化成一氧化氮的效率得以持续保持的水平下的适宜方式,但预计与皮肤一接触,低pH值会引起显著不良的皮肤刺

激。US 6103275的组合物不含多元醇。

[0020] 在W0 2003/013489 (公开内容以引用的方式并入本文中) 中, 提出3%聚乙烯醇(PA)作为分别柠檬酸和亚硝酸盐的凝胶基料, 当场混合在一起(W02003/013489实施例7)。然而, 测试数据(W0 2003/013489表11和12)显示PA无法形成稳定的凝胶, PA组合物从不混合在一起或一起使用。除了未坚持到最终组合物的以上提议外, W0 2003/013489的组合物不含多元醇。

[0021] 美国专利申请No.2005/0037093 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了基于亚硝酸盐-酸反应的产生一氧化氮的组合物, 并提到了任选的赋形剂, 包括聚乙烯醇、丙二醇和聚乙二醇。

[0022] 中国专利申请No.CN 101028229 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了化妆品, 其通过亚硝酸盐与酸反应来产生一氧化氮。教导了任选地使用尤其甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为另外的成分。进一步提到三羟基乙胺作为特定实例中的成分。

[0023] 中国专利申请No.CN 101062050 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了促进毛发生长的产品, 其通过亚硝酸盐与酸反应来产生一氧化氮。教导了任选地使用尤其甘油、丙二醇和单硬脂酸甘油酯作为另外的成分。提到D-泛醇以及泛醇与肌醇的组合作为特定实例中的成分。

[0024] W0 2008/110872 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了可发泡性一氧化氮供体组合物, 其任选地含有例如选自多元醇和聚乙二醇的极性溶剂(段落[0055]和[0056])。指出特定的多元醇是丙二醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、甘油、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇和己-1,2,6-三醇。在许多聚合物剂的清单中提到聚乙烯醇、聚乙二醇1000 (PEG 1000)、PEG 4000、PEG 6000和PEG 8000作为任选的其它成分(段落[0062])。还在段落[0190]和[0191]中提到多元醇, 例如丙三醇(甘油)、丙二醇、己二醇、二乙二醇和丙二醇以及乙二醇、己二醇、其它二醇以及聚乙二醇。

[0025] W0 2009/019498 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了pKa不在1与4之间的非硫醇还原剂用作亚硝酸盐和质子源以外的组分。指出非硫醇还原剂的实例是碘阴离子、丁基化氢醌、生育酚、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯和 β -胡萝卜素。除丁基化氢醌之外, W0 2009/019498的组合物不含多元醇。

[0026] W0 2014/188174和W0 2014/188175 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了一种用于皮肤损害的敷药系统和一种经皮递送系统, 其中质子源是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸和磺酸侧基的水凝胶。接触皮肤的第一层是亚硝酸盐吸收到上面的聚丙烯网。当网位于皮肤上并且水凝胶覆盖在网上作为顶层时, 发现酸与亚硝酸盐的反应产物被充分递送到皮肤, 没有不可接受的皮肤刺激。在W0 2014/188175中, 公开了一种替代的接触皮肤的初级层, 它是一层可溶解的膜, 由例如聚乙烯醇形成并含有亚硝酸盐。在两个参考文献中教导了水凝胶可包含丙三醇, 未说明它的目的。然而, 众所周知, 丙三醇作为增塑剂添加到这类水凝胶中(参见例如W0 00/06215第14页, 公开内容以引用的方式并入本文中)。参考文献公开了对不存在的某些含羟基的成分的偏爱, 尤其是1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、抗坏血酸和丁基化氢醌。

[0027] 美国专利申请No.2014/0335207 (公开内容以引用的方式并入本文中) 描述了一种

局部混合物,其在“亚硝酸盐介质”与“酸化介质”混合时产生一氧化氮。“亚硝酸盐介质”的特定实施方案单独描述在段落[0050]至[0055]中,其中亚硝酸盐与一种或多种多元醇组分一起存在。段落[0054]和[0055]中描述的通用亚硝酸盐介质含有选自甘油、硬脂酸甘油酯、辛甘醇、乙基己基甘油和己二醇的多元醇,其它段落中描述的特定实施方案含有上述多元醇中的一些和丁二醇。这些多元醇也是段落[0056]至[0062]中描述的“酸化介质”的实施方案的组分。

[0028] 美国专利申请No.2015/0030702(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了一种基于亚硝酸盐-酸反应的皮肤敷药。该皮肤敷药包含非硫醇还原剂,例如氢醌或丁基化氢醌。皮肤敷药可包含水凝胶,其例如包含亲水性聚合物,例如聚乙烯醇或聚乙二醇。

[0029] 美国专利申请No.2017/0209485(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了一种用于局部施加泡沫或血清载体中的一氧化氮的设备和方法。段落[0070]中描述了丙三醇和(未指明的)“丙三醇样组分”用作任选的添加剂以增加表面张力和/或降低蒸汽压力。

[0030] 美国专利申请No.2019/0134080(公开内容以引用的方式并入本文中)描述了一种用于将由多部分组合形成的泡沫形成的一氧化氮产生系统局部施加到皮肤的组合物和方法,所述多部分组合包括包含至少一种亚硝酸盐反应物的第一溶液和包含至少一种酸性反应物的第二溶液。还描述了用于保持、充气 and 分配泡沫形式的组合的组分的装置。提到了丙三醇用作任选的添加剂以增加表面张力和/或降低蒸汽压力(段落[0068])。

[0031] 如上所提到,本发明基于以下意外的发现:选自有机羧酸、有机非羧酸还原酸、一氧化氮(NO)、产生一氧化氮的组合物、产生一氧化氮的组合物或成分的组合或组合式联合以及它们的混合物的一种或多种活性剂是针对SARS-CoV-2冠状病毒的体外有效抗病毒剂,提供了对人和动物中由SARS-CoV-2冠状病毒引起的COVID-19的有效体内治疗(治疗与预防)。研究针对SARS-CoV-2和SARS-CoV的抗病毒活性之间的相似性的实验工作与所述病毒的先验知识一起显示或表明,相同的剂也对SARS-CoV具有活性。本发明还提供了对表面(包括无生命的表面以及手、手臂和人体或动物体的其它外表面)和空间的有效抗病毒治疗,从而预防SARS-CoV和SARS-CoV-2冠状病毒的传播和表面的污染。

[0032] 在本发明的一个优选的实施方案中,一氧化氮可通过NO产生系统产生,所述NO产生系统本身包括质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸的酸。这类NO产生系统可包括亚硝酸盐和质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸。这类系统可以具体化为产生NO的组合物,其可以施用于患者的肺。

[0033] 活性剂,例如一种或多种有机羧酸、一种或多种有机非羧酸还原酸和/或产生NO的组合物,可以呈任何合适的物理形式,例如呈液体形式或呈夹带在载气中或空气中的液滴形式,例如呈气溶胶或雾状递送到患者的肺中。

[0034] 用于本发明的一种或多种有机羧酸和一种或多种有机非羧酸还原酸的实例与下文和实施例中给出的一种或多种有机羧酸和一种或多种有机非羧酸还原酸的类别中的“质子源”的实例相同。特别提到柠檬酸,不违背本文中的大部分公开内容。在一个实施方案中,酸或质子源不是以上公认的美国专利No.8,034,844和美国专利No.6,034,133中教导的杀病毒混合物中的一种,即:(a)有机酸,其包含(i)两种或更多种选自由以下组成的组的多元羧酸:丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、癸二酸、富马酸、马来酸、酒石酸、苹果酸、马来酸、柠檬酸、乌头酸和它们的混合物,和(ii)选自由以下组成的组的水溶

性或水分散性聚合酸：聚合羧酸、聚合磺酸、硫酸化聚合物、聚合磷酸和它们的混合物；或(b)杀病毒组合物，其包含柠檬酸、苹果酸和 C_{1-6} 醇。

[0035] 根据本发明，还发现用作产生一氧化氮的质子源的酸活性剂或酸在缓冲到相对较高的pH值时可有效的，例如pH值为或高于约5.2，例如在5.2至5.8的范围内，即，在生理学上为患者的口腔、鼻腔通道、气道和肺的组织耐受的pH值。

[0036] 产生一氧化氮和NO的组合物具有一系列的抗微生物和其它有利的生理活性，如本文中所述，因此，本发明提供的针对SARS-CoV和SARS-CoV-2的抗病毒作用可伴随有同时针对其它可能感染患者或患者容易感染的病原体(包括细菌、继发性病毒、寄生虫和真菌感染)的有益活性。

[0037] 产生NO的组合物可通过以下方法之一来制备：

[0038] (a) 制备产生NO_x的组合物方法，所述方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的组合物中所需的浓度以所需比例混合，以形成浓缩预混合物，随后适当地用水稀释所述浓缩预混合物，从而提供有待使用的组合物；

[0039] (b) 制备产生NO_x的组合物方法，所述方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以呈有待使用的形式的组合物所需的浓度以所需比例混合，从而提供有待使用的组合物。

[0040] 这些替代性方法构成了本发明的具体方面。

[0041] 与目前的状况相比，在一种或多种有机多元醇存在下，使用包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸的质子源作为亚硝酸盐盐酸化剂，可更有效地产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体(统称为NO_x)，并且增强反应输出。另外，发现使用有机还原酸作为亚硝酸盐盐酸化剂的这类反应系统的抗微生物有效的反应产物可在生理学上可耐受的pH值下，例如在约5与约8之间的pH值下递送，使用或没有使用一种或多种有机多元醇，这使得反应系统可在这类pH值下操作，呈组合物直接递送，并具有有益的生理活性，例如体内抗微生物活性。已经发现构成本发明的基础的产生一氧化氮的方法任选地在NO_x气体产生的初始强烈突释之后产生生理有效量的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体，历时很长一段时间，例如超过约2小时、例如超过约5小时、例如超过约10小时，这使得在药物和其它应用中可能有重大用途。如果不需要初始强烈突释，那么可在产生NO_x的反应开始之后一段时间后，例如在产生NO_x的反应开始之后约10分钟、30分钟或一小时或更长时间，将反应混合物施用于受试者。

发明内容

[0042] 本发明在随附权利要求书中并由随附权利要求书定义，并且是以下描述中公开的当前更通用的发明进展的特定实施方案。如在随附权利要求书中和由随附权利要求书定义的本发明涉及通用发明进展的应用，其涉及进行产生NO的反应的组合和组合物以及该反应的气体产物经由受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺递送到人类或动物受试者。本文关于本公开所述的所有方面、实施例、实施方案和优选方案彼此同等且独立地应用于如随附权利要求书中和由随附权利要求书定义的本发明。

[0043] 本公开提供了使用有效量的一种或多种有机羧酸、一种或多种有机非羧酸还原酸或它们的任何混合物治疗或预防SARS-CoV和SARS-CoV-2传播的系统、方法、组合、试剂盒和

组合物。本文中对适用作产生一氧化氮和任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的质子源的羧酸和有机非羧酸还原酸的描述相应地适用于适用作针对SARS-CoV和SARS-CoV-2的抗病毒剂的羧酸和有机非羧酸还原酸。

[0044] 在采用一氧化氮和任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体产生的实施方案中，系统、方法、组合、试剂盒和组合物包括一种或多种亚硝酸盐和质子源作为反应物，所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸。系统、方法、组合、试剂盒和组合物还包括一种或多种有机多元醇。还原酸(即，羧酸还原酸和非羧酸还原酸)的使用允许一氧化氮和任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体在略高于4，例如在5至8的范围内的pH值下产生。本公开还提供了用于抗微生物用途的系统、方法、组合、试剂盒和组合物，其中一种或多种有机多元醇是任选的并且在5至8的范围内的质子源的起始pH值下进行反应。

[0045] 根据第一方面，本公开提供了一种用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的方法，所述方法包括使一种或多种亚硝酸盐与质子源在适于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应条件下反应，所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸，其中所述反应在一种或多种有机多元醇存在下进行；

[0046] 特征在于以下中的一者或多者：

[0047] (a) 一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在；

[0048] (b) 质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶；

[0049] (c) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0050] (d) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0051] (e) 当使用一种或多种增塑剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0052] (f) 一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0053] (g) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0054] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者，其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代；

[0055] (i) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0056] (j) 一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0057] 通过根据本公开的第一方面的方法制备的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体构成了本公开的第二方面。

[0058] 根据第三方面，本公开提供了一种增强一种或多种亚硝酸盐与质子源进行的产生

一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应的输出的方法,所述方法包括使用包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸的质子源并在增强反应输出的量的一种或多种有机多元醇存在下进行反应。反应输出的增强是与在相同条件但没有一种或多种有机多元醇下进行的反应进行比较。

[0059] 根据第四方面,本公开提供了一种或多种有机多元醇在反应混合物中的使用以增强反应混合物中一种或多种亚硝酸盐与质子源进行的产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应的输出,其中所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸。反应输出的增强是与在相同条件但没有一种或多种有机多元醇下进行的反应进行比较。

[0060] 根据第五方面,本公开提供了一种组合、试剂盒或组合物,其通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,所述组合、试剂盒或组合物包含:

[0061] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0062] (ii) 质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸;以及

[0063] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0064] 特征在于以下中的一者或多者:

[0065] (a) 一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在;

[0066] (b) 质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0067] (c) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0068] (d) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0069] (e) 当使用一种或多种增塑剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0070] (f) 一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0071] (g) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0072] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0073] (i) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0074] (j) 一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0075] 当质子源包括包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶并且组合或试剂盒包含两种或更多种分开的组合物时,优选一种或多种多元醇不与水凝胶直接接触或

混合存在于分开的组合物中。

[0076] 本公开的第五方面的组合、试剂盒或组合物的化学物质可例如基本上由上述组分(i)、(ii)和(iii)和任选的水和/或pH缓冲液组成。表述“基本上由……组成”可例如允许少量的一种或多种另外的组分存在,条件是不会不利地影响上述组分(i)、(ii)和(iii)和任选的水和/或pH缓冲液的作用。这类一种或多种另外的组分的总量宜小于组合、试剂盒的化学成分或组合物的约20重量%或体积%,例如小于约15重量%或体积%,例如小于约10重量%或体积%,例如小于约5重量%或体积%。

[0077] 组合、试剂盒或组合物的化学物质可例如由以下组成:上述组分(i)、(ii)和(iii)和任选的水和/或pH缓冲液,和/或量小于组合、试剂盒的化学成分或组合物的约20重量%或体积%,例如小于约15重量%或体积%,例如小于约10重量%或体积%,例如小于约5重量%或体积%的一种或多种另外的组分。

[0078] 根据第六方面,本公开提供了一种制备组合、试剂盒或组合物的方法,所述组合、试剂盒或组合物包含:

[0079] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0080] (ii) 质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸;以及

[0081] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0082] 所述方法包括使组分(i)、(ii)和(iii)彼此接近,形成组合或试剂盒或混合形成组合物;

[0083] 特征在于以下中的一者或多者:

[0084] (a) 一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在;

[0085] (b) 质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0086] (c) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0087] (d) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0088] (e) 当使用一种或多种增塑剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0089] (f) 一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0090] (g) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0091] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0092] (i) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0093] (j) 一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、

它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0094] 本文中使用的表述“组合”是指接近并一起使用的分开的物质或组合物(称为“组分”)。使组分接近可分多个阶段实现,其中最初使一些但不是全部的组分汇集成为子组合或部分组合,随后与一种或多种其它组分或其它子组合或部分组合接近。“接近”可包括密切混合物、溶液或悬浮液,或可表示不等同于密切混合物、溶液或悬浮液的紧密物理接近,例如在试剂盒中的单独容器中,其中组分提供在一起,方便以后使用。例如,分别包含一种或多种亚硝酸盐(或其中的一些)和一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸(或其中的一些)的亚硝酸盐组分和质子源组分可以分开存储或存储在试剂盒的单独容器中,并通过混合汇集在一起,供用于引发产生NO_x的反应。一种或多种有机多元醇可以提供于亚硝酸盐组分和质子源组分中的一者或两者中,或可以呈有机多元醇组分分开提供,同样在引发产生NO_x的反应时混合。组分中的任一者或多者本身可存在于多个部分中和多个容器中。可以通过立即引发产生NO_x的反应的方式使组合接近,例如因为亚硝酸盐和质子源在相同溶液中,因此能够进行反应。或者,可以通过不立即引发产生NO_x的反应,而是在引发前需要进行一个或多个其它步骤或行动的方式使组合接近,例如因为亚硝酸盐和质子源呈干粉混合物或呈封装颗粒存在,所以在产生NO_x的反应开始前需要水(例如来自与组合接触的粘膜)。

[0095] 在实施方案中,本公开的第一至第六方面可彼此独立由以下表征:仅以上提及的特征(a);或仅特征(b);或仅特征(c);或仅特征(d);或仅特征(e);或仅特征(f);或仅特征(g);或当仅涉及(b)时的特征(h);或当仅涉及(c)时的特征(h);或当仅涉及(d)时的特征(h);或当仅涉及(e)时的特征(h);或当仅涉及(f)时的特征(h);或当仅涉及(g)时的特征(h);或仅特征(a)和(b);或当涉及特征(a)和(b)时的特征(h);或仅特征(a)和(c);或当涉及特征(a)和(c)时的特征(h);或仅特征(a)和(d);或当涉及特征(a)和(d)时的特征(h);或仅特征(a)和(e);或当涉及特征(a)和(e)时的特征(h);或仅特征(a)和(f);或当涉及特征(a)和(f)时的特征(h);或仅特征(a)和(g);或当涉及特征(a)和(g)时的特征(h);或仅特征(b)和(c);或当涉及特征(b)和(c)时的特征(h);或仅特征(b)和(d);或当涉及特征(b)和(d)时的特征(h);或仅特征(b)和(e);或当涉及特征(b)和(e)时的特征(h);或仅特征(b)和(f);或当涉及特征(b)和(f)时的特征(h);或仅特征(a)、(b)、(c)和(f);或当涉及特征(a)、(b)、(c)和(f)时的特征(h);或特征(a)至(g)全部;或特征(a)和(b)连同当涉及特征(c)至(g)全部时的特征(h)。

[0096] 在其它实施方案中,本发明的第一至第六方面可彼此独立由以下表征:仅以上提及的特征(c)、(f)和(i);或仅特征(c)、(f)和(j);或特征(i)和当涉及特征(c)和(f)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(c)和(f)时的特征(h);或仅特征(d)、(g)和(i);或仅特征(d)、(g)和(j);或特征(i)和当涉及特征(d)和(g)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(d)和(g)时的特征(h);或仅特征(e)、(f)和(i);或仅特征(e)、(f)和(j);或特征(i)和当涉及特征(e)和(f)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(e)和(f)时的特征(h)。

[0097] 优选本公开的第一至第六方面由以下表征:特征(a)至(g)全部;或特征(a)和(b)连同当涉及特征(c)至(g)全部时的特征(h);或仅特征(c)、(f)和(i);或特征仅(c)、(f)和(j);或特征(i)和当涉及特征(c)和(f)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(c)和(f)时的特征(h);或仅特征(d)、(g)和(i);或仅特征(d)、(g)和(j);或特征(i)和当涉及特征(d)

和(g)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(d)和(g)时的特征(h);或仅特征(e)、(f)和(i);或仅特征(e)、(f)和(j);或特征(i)和当涉及特征(e)和(f)时的特征(h);或特征(j)和当涉及特征(e)和(f)时的特征(h)。注意,当特征(c)和(f)表征本公开时,特征(d)、(e)和(g)是多余的;在那种情况下,特征(d)、(e)和(g)(或当涉及特征(d)、(e)和(g)时的特征(h))可从清单中省略,并被视为特性特征(c)和(f)(或当涉及特征(c)和(f)时的特征(h))的实例。

[0098] 本文中使用的表述“增强反应输出的量的一种或多种有机多元醇”意指这种量的一种或多种有机多元醇引起一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一者的量和/或从产生NO_x的反应输出的时间段高于在相同条件但没有一种或多种有机多元醇下进行的反应。表述“量”意指可用于在起始反应系统中反应的每克亚硝酸盐放出的气体一氧化氮的总质量。构成本发明的基础的实验工作已经测量了放出的气体一氧化氮、任选地还有其它气体的量,并发现这些量得到了增强。由此相信本发明增强所产生的NO_x的总质量,因此还应理解表述“量”包括反应混合物中溶入溶液中的一氧化氮的总质量以及NO_x反应产物的总质量。表述“输出时间段”尤其意指在反应结束之前反应中放出气体一氧化氮、任选地还有其它气体中的至少一者的时长。与上文在短语“增强反应输出的量的一种或多种有机多元醇”的论述中所解释的理由相同,相信短语“输出时间段”还包括反应混合物中一氧化氮溶入溶液的时长以及产生NO_x反应产物的时长。众所周知,最终与质子源的反应耗尽亚硝酸盐,在产生NO_x的反应期间升高的pH值达到它的最大值,并且反应停止。优选地,本发明的第一方面的方法增强产生NO_x的反应的产率,尤其但不仅仅是产生的NO的量,例如产生的气体NO的量,增强了至少约5%、例如至少约10%、例如至少约25%,例如增强程度高达约150%,例如增强程度高达约125%,例如增强程度高达约100%,例如增强程度高达约75%。优选地,本发明的第一方面的方法增强在反应结束之前反应中放出一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一者、优选地一氧化氮的时长,增强了至少约5%、例如至少约10%。使用本发明,放出一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体中的至少一者、优选地一氧化氮和最优选地气体一氧化氮、尤其放出有效量的时间段可以增强到至少约2小时,例如至少约5小时,例如长达或超过约10小时。放出一氧化氮的时间段的增强程度可以表示例如高达或超过在没有使用多元醇组分下放出相同量的一氧化氮的时间段的约150%的增强程度,例如高达约125%的增强程度,例如高达约100%的增强程度,例如高达约75%的增强程度。

[0099] 一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的前体的产生可以用于达成任何目的。下文例示和论述了治疗目的和非治疗目的。

[0100] 根据第七方面,本公开提供了一种治疗或非治疗方法,其将一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到目标位置,例如任何细胞、器官、表面、结构、受试者或其中的内部空间,所述方法包括:(a)向目标位置或其附近施用根据本公开的第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本公开的第一或第三方面的方法,或进行根据本公开的第四方面的使用,或使用根据本公开的第五方面的组合、试剂盒或组合物,产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此产生的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到目标位置或其附近;或(c)将根据本公开的第二方面的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到目标位置或其附近。

[0101] 本公开的第七方面的方法可以是例如一种治疗有需要的受试者的微生物感染的方法。受试者可以是例如人类受试者或其它哺乳动物受试者。微生物感染可以是例如细菌、病毒、真菌、微寄生物或它们的任何组合。

[0102] 本公开的第七方面的方法可以是例如一种在受试者上进行的血管舒张方法。受试者可以是例如人类受试者或其它哺乳动物受试者。

[0103] 本公开的第七方面的方法可以是例如抗微生物方法。抗微生物方法可以是减少所在地的微生物、例如细菌、病毒、真菌细胞和/或微寄生物生物体的数目,预防它们繁殖,或限制它们繁殖的速率。这类方法靶向的微生物可以是例如浮游细胞或颗粒或呈生物膜或其它集落存在。本公开靶向的任何微生物群体,无论是否是浮游生物,都可以由一种微生物物种或株系组成,或可以包含超过一种物种或株系。

[0104] 根据第八方面,本公开提供了根据本公开的第五方面的组合、试剂盒或组合物,或根据本公开的第二方面的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,用于疗法中。

[0105] 根据本公开的第八方面使用的组合、试剂盒或组合物或者一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体可以是例如用于一种治疗方法中,其将一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到受试者或其中的内部空间,所述方法包括:(a)向受试者或内部空间或其附近施用根据本公开的第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本公开的第一或第三方面的方法,或进行根据本公开的第四方面的使用,或使用根据本公开的第五方面的组合、试剂盒或组合物,产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此产生的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到受试者或内部空间或其附近;或(c)将根据本公开的第二方面的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到受试者或内部空间或其附近。

[0106] 根据本公开,意外地发现,当质子源是初始pH值在5至8的范围内的柠檬酸(一种有机羧酸)或抗坏血酸(一种有机非羧酸还原酸)时,就生物稳定和杀生物作用而言,还提供了良好的抗微生物活性,从以下得到证明:3天后杀死脓肿分枝杆菌(*M. abscessus*)高达100%,和/或杀死结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、H1N1流感病毒、SARS-CoV病毒和SARS-CoV-2病毒。本文中的表述“初始pH值”是指在反应混合物的将影响初始pH值的其它组分存在之前,质子源最初形成的水溶液的pH值,包括任何所需pH缓冲液。该抗微生物作用不依赖于一种或多种有机多元醇的存在,尽管一种或多种有机多元醇、例如甘露糖醇或山梨糖醇的存在似乎会增强该作用。酸(例如柠檬酸或抗坏血酸)具有在5至8的范围内的初始pH值的产生NO_x的反应产物产生强烈的抗微生物作用的这一发现尤其令人意外,这有望应用于治疗呼吸道和肺感染,包括难以治疗和/或耐抗生素的感染,包括结核、多药耐药结核和非结核分枝杆菌感染。可建议经由吸入含有反应混合物或其组分或前体的pH值在5至8的范围内雾化水性组合物来治疗这类感染。本发明还能够治疗包含多种病原体,可能包括来自超过一组细菌、病毒、真菌和寄生虫的病原体的感染,称为“广谱”治疗(包括治疗性治疗和/或预防性治疗以及有生命和无生命表面和空间的体外处理以防病原体传播)。

[0107] 根据第九方面,本公开提供了根据第七方面的抗微生物方法的改良,所述改良包括:(a)向有待靶向的微生物或其附近或者感染微生物的受试者或这类受试者的内部空间施用根据本公开的第五方面的组合或组合物;或(b)使用根据本公开的第一或第三方面的

方法,或进行根据本公开的第四方面的使用,或使用根据本公开的第五方面的组合、试剂盒或组合物,产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,并将由此产生的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到有待靶向的微生物或其附近或者感染微生物的受试者或这类受试者的内部空间;或(c)将根据本公开的第二方面的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体递送到有待靶向的微生物或其附近或者感染微生物的受试者或这类受试者的内部空间;条件是在存在产生NO_x的反应混合物的将影响pH值的其它组分之前包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH值或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开始时反应混合物的pH值在5至8的范围内,并且一种或多种多元醇是任选的,并且可以省去。

[0108] 在进行根据本公开的第九方面的方法时,根据本公开的第五或第八方面的组合、试剂盒或组合物可以用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体;条件是在存在产生NO_x的反应混合物的将影响pH值的其它组分之前包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH值或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开始时反应混合物的pH值在5至8的范围内,并且一种或多种多元醇是任选的,并且可以省去。

[0109] 本公开的第九方面的方法可以是例如一种治疗有需要的受试者的微生物感染的方法。受试者可以是例如人类受试者或其它哺乳动物受试者。微生物感染可以是例如细菌、病毒、真菌、微寄生虫感染或它们的任何组合。微生物感染可以在受试者的皮肤上,包括粘膜。微生物感染可以在受试者的内部空间中,例如根据本发明,在受试者的鼻、口腔、呼吸道、肺或肺部胸膜的内层中。

[0110] 本公开的所有方面中使用的向人体或动物体施用的组分和混合物以及向人体或动物体施用的任何载体和赋形剂优选是生物相容的和/或药学上可接受的,以最大程度地减少施用组织组织的刺激和炎症。

[0111] 根据本公开的组合、试剂盒和组合物可以存储和用于多种合适的设备和装置,下文将更详细地描述这些设备和装置。根据本公开的方法宜使用这类设备和装置来进行,如下文将更详细地描述的。

[0112] 将理解关于本公开的任一个或多个方面具体描述的所有实施方案、实施例和优选方案适用于本公开的任一个或多个其它方面。另外,必要时,根据本公开的一方面的任何方法或使用可以使用根据任何其它方面的组合、试剂盒或组合物进行。

具体实施方式

[0113] 现在参考具体的实施方案详细描述本公开的方面。下文描述的具体的实施方案可以应用于本公开的任一个方面,除非明显与这类方面矛盾。具体的实施方案还可以与每个其它具体的实施方案组合,除非这样做会产生矛盾。

[0114] 亚硝酸盐和亚硝酸盐组分

[0115] 本公开的方面涉及一种或多种亚硝酸盐的使用。在下文中,术语“亚硝酸盐组分”涵盖一种或多种亚硝酸盐本身,和用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应系统的含有一种或多种亚硝酸盐的任何组分。

[0116] 亚硝酸盐的选择没有特别限制。可以用于本公开的组合物中的亚硝酸盐的特定实例包括碱金属亚硝酸盐或碱土金属亚硝酸盐。在一些实施方案中,一种或多种亚硝酸盐选

自 LiNO_2 、 NaNO_2 、 KNO_2 、 RbNO_2 、 CsNO_2 、 FrNO_2 、 AgNO_2 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 以及它们的任何混合物。

[0117] 在具体的实施方案中,亚硝酸盐为 NaNO_2 或 KNO_2 。在一个实施方案中,亚硝酸盐为 NaNO_2 。

[0118] 在一个实施方案中,亚硝酸盐组分可呈干燥形式,任选地呈微粒形式如粉末提供,用于本公开中。必要时,亚硝酸盐组分可以封装或微囊封装,例如以控制或延迟一种或多种亚硝酸盐与质子源之间的反应。干燥形式和/或封装可有助于亚硝酸盐组分的存储,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。更进一步地,干燥形式和/或封装可有助于亚硝酸盐组分掺入到小的物体如医疗装置中,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。这类物体包括例如伤口敷药、绷带、血管和其它支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、整形外科螺钉和销以及其它薄的医疗和/或可植入物品和吸入器(手提式和雾化器)。更多细节请参见下文标题为“组分的任选封装(例如微囊封装)”的章节。

[0119] 必要时,任选地封装或微囊封装的亚硝酸盐组分可以呈干粉或结晶存在,或与凝胶或其它载体系统、例如水性载体结合,例如呈含水凝胶或其溶液。呈干燥或粉末形式的亚硝酸盐组分在使用之前宜通过添加水制成溶液。在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在酸化之前(例如在即将酸化时)这类亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度可以在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在酸化之前(例如在即将酸化时)亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在酸化之前(例如在即将酸化时)亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更具体的实施方案中,在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在酸化之前(例如在即将酸化时)亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在酸化之前(例如在即将酸化时)亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度可以在0.8至1.2M的范围内。举例来说,在添加产生 NO_x 的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在与有机羧酸组分组合之前(例如在即将组合时)亚硝酸盐溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0120] 应当注意,将产生 NO_x 的反应混合物的两种或更多种前体溶液进行组合的行为将会稀释每种溶质或溶质组合在每个溶液中的浓度,这是本领域的技术人员众所周知的。举例来说,溶质A和B的两个1M溶液以同等体积混合的行为引起A的浓度变成0.5M,B的浓度变成0.5M。除非另有说明或暗示,否则本文所述的亚硝酸盐的浓度是在添加产生 NO_x 的反应混合物的呈液体、例如溶液形式添加的任何其它组分之前(例如,即将添加时)它在初始溶液中的浓度。已知反应混合物组分和制备方式,容易推导产生 NO_x 的反应混合物中的实际浓度。

[0121] 必要时,无论是呈干燥形式还是呈载体液体,亚硝酸盐组分都可以包括一种或多种多元醇或这类多元醇中的一些。

[0122] 如果希望亚硝酸盐组分呈凝胶或其它载体系统、如水性载体、例如呈含水凝胶或溶液形式存储,那么优选地,含有亚硝酸盐的系统缓冲到合适的pH值以防止亚硝酸盐在存储期间降解。约6-9、例如约7的pH值是优选的。

[0123] 优选地,直到希望产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体时,亚硝酸盐组分才与质子源接触。为此,亚硝酸盐组分优选地保存在试剂盒、设备或装置的贮存器或容器中。然而,可替代地,亚硝酸盐组分、质子源和一种或多种多元醇的干燥组分可呈干燥组合物、例如微粒混合物形式保存,并且通过简单添加水或另一种合适的溶剂或液体载体来引发反应。

[0124] 亚硝酸盐可以是药学上可接受等级的亚硝酸盐。在一些实施方案中,亚硝酸盐是药典级的。换句话说,亚硝酸盐可以遵循亚硝酸盐的一篇或多篇现行药典专题论文。例如,亚硝酸盐可以遵循美国药典(USP)、欧洲药典或日本药典中的一者或多者的亚硝酸盐专题论文。

[0125] 在具体的实施方案中,使用的亚硝酸盐在其特征上有一个或多个以下限制:

[0126] (i) 亚硝酸盐含有至多约0.02重量%、约0.01重量%或约0.001重量%的碳酸钠;

[0127] (ii) 亚硝酸盐含有至多约10ppm(0.001重量%)的防结块剂,例如烷基-萘磺酸钠;

[0128] (iii) 亚硝酸盐是白色至灰白色固体;

[0129] (iv) 亚硝酸盐具有根据相关USP中的相关方法测定的针对阳离子的阳性鉴定;

[0130] (v) 亚硝酸盐具有根据相关USP中的相关方法测定的针对亚硝酸根的阳性鉴定试验;

[0131] (vi) 任选地如通过相关USP量热测定法所测定,例如,如通过离子色谱法,例如离子色谱法联合抑制电导检测所测定,亚硝酸盐含有不少于约97重量%或不少于98重量%的亚硝酸盐和/或至多102重量%或至多101重量%的亚硝酸盐;

[0132] (vii) 任选地根据相关USP和/或使用pH计所测量,当在10%溶液在25℃下测量时,亚硝酸盐的pH值介于约7与约9之间或约8与约9之间;

[0133] (viii) 亚硝酸盐具有至多约0.25重量%或约0.01重量%的干燥失重;

[0134] (ix) 任选地如通过卡尔-费歇尔法(Karl Fischer method)所测定,亚硝酸盐具有至多约0.5重量%的水含量;

[0135] (x) 亚硝酸盐中的重金属含量为至多约10ppm重金属,任选地,亚硝酸盐中的重金属含量至多为约10ppm;

[0136] (xi) 亚硝酸盐含有至多约0.4重量%的硝酸盐,任选地当亚硝酸盐是亚硝酸钠时含有至多约0.4重量%硝酸钠,并且当亚硝酸盐是亚硝酸钾时含有至多约0.4重量%硝酸钾;

[0137] (xiii) 亚硝酸盐含有至多约0.005重量%或约0.001重量%的不溶物质;

[0138] (xiii) 亚硝酸盐含有至多约0.005重量%的氯化物;

[0139] (xiv) 亚硝酸盐含有至多约0.01重量%的硫酸盐;

[0140] (xv) 亚硝酸盐含有至多约0.001重量%的铁;

[0141] (xvi) 亚硝酸盐含有至多约0.01重量%的钙;

[0142] (xvii) 当亚硝酸盐不是亚硝酸钾时亚硝酸盐含有至多约0.005重量%或约0.001重量%的钾,或者当亚硝酸盐不是亚硝酸钠时亚硝酸盐含有至多约0.005重量%或约0.001

重量%的钠；

[0143] (xviii) 亚硝酸盐含有至多约0.1重量%、至多约5000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的有机挥发性化合物；

[0144] (xix) 亚硝酸盐含有至多约0.1重量%、至多约5000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的乙醇；

[0145] (xx) 亚硝酸盐含有至多约3000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的甲醇；

[0146] (xxi) 亚硝酸盐含有至多约50ppm、至多约25ppm、至多约20ppm、至多约10ppm、至多约7.9ppm、至多约8ppm、至多约6ppm、至多约5.6ppm或至多约2.5ppm的非挥发性有机碳；

[0147] (xxii) 亚硝酸盐含有至多约0.05ppm的汞；

[0148] (xxiii) 亚硝酸盐含有至多约2ppm或0.2ppm的铝；

[0149] (xxiv) 亚硝酸盐含有至多约3ppm或1ppm的砷；

[0150] (xxv) 亚硝酸盐含有至多约0.003重量%或约0.001重量%的硒；

[0151] (xxvi) 亚硝酸盐中的微生物负荷的总好氧计数至多为约100CFU/g；

[0152] (xxvii) 硝酸盐中的总酵母和霉菌计数至多为约20CFU/g；

[0153] (xxviii) 亚硝酸盐含有至多约0.25EU/mg或0.018EU/mg的细菌内毒素；以及

[0154] (xxix) 亚硝酸盐含有小于约0.1ppm的磷酸盐，例如磷酸钠、磷酸氢二钠或磷酸三钠，并且优选地，亚硝酸盐不含可检测量的磷酸盐。

[0155] 在某些实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的两个或更多个。在其它实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的五个或更多个。在其它实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的十个或更多个。在其它实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的十五个或更多个。在一些实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的二十个或更多个。在一个具体实施方案中，亚硝酸盐具有特性(i)至(xxix)中的全部。在一个更具体的实施方案中，亚硝酸盐是具有特性(i)至(xxix)中的全部的亚硝酸钠。

[0156] 在一些实施方案中，任选地如通过相关USP量热测定法所测定，例如，如通过离子色谱法，例如离子色谱法联合抑制电导检测所测定，亚硝酸盐含有在约97重量%至约101重量%的范围内的亚硝酸盐。在替代实施方案中，任选地如通过相关USP量热测定法所测定，例如，如通过离子色谱法，例如离子色谱法联合抑制电导检测所测定，亚硝酸盐含有在约98重量%至约102重量%的范围内的亚硝酸盐。

[0157] 在具体的实施方案中，亚硝酸盐具有以下特性：

[0158] (i) 亚硝酸盐含有至多约0.02重量%的碳酸钠；

[0159] (ii) 亚硝酸盐含有至多约10ppm的防结块剂；

[0160] (vi) 如通过USP量热测定法所测定，亚硝酸盐含有不少于97重量%的亚硝酸盐和至多101重量%的亚硝酸盐；

[0161] (viii) 亚硝酸盐具有至多约0.25重量%的干燥失重；

[0162] (ix) 亚硝酸盐具有至多约0.5重量%的水含量；

[0163] (x) 亚硝酸盐中的重金属含量至多为约10ppm；

[0164] (xi) 亚硝酸盐含有至多约0.4重量%的硝酸盐；

[0165] (xii) 亚硝酸盐含有至多约0.005重量%的不溶物质；

- [0166] (xiii) 亚硝酸盐含有至多约0.005重量%的氯化物；
- [0167] (xiv) 亚硝酸盐含有至多约0.01重量%的硫酸盐；
- [0168] (xv) 亚硝酸盐含有至多约0.001重量%的铁；
- [0169] (xvi) 亚硝酸盐含有至多约0.01重量%的钙；
- [0170] (xviii) 亚硝酸盐含有至多约至多约5000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的有机挥发性化合物；
- [0171] (xxi) 亚硝酸盐含有至多约10ppm或至多约2.5ppm的非挥发性有机碳；
- [0172] (xxii) 亚硝酸盐含有至多约0.05ppm的汞；
- [0173] (xxiii) 亚硝酸盐含有至多约2ppm的铝；
- [0174] (xxiv) 亚硝酸盐含有至多约3ppm的砷；
- [0175] (xxv) 亚硝酸盐含有至多约0.003重量%的硒；
- [0176] (xxvi) 亚硝酸盐中的微生物负荷的总好氧计数至多为约100CFU/g；
- [0177] (xxvii) 硝酸盐中的总酵母和霉菌计数至多为约20CFU/g；以及
- [0178] (xxviii) 亚硝酸盐含有至多约0.25EU/mg的细菌内毒素。
- [0179] 在这些实施方案中，亚硝酸盐可以是亚硝酸钠并且含有至多约0.005重量%的钾。优选地，亚硝酸钠还具有一个或多个以下限制：
- [0180] (iii) 亚硝酸钠是白色至灰白色固体；
- [0181] (iv) 亚硝酸钠具有根据相关USP中的相关方法测定的针对钠的阳性鉴定；
- [0182] (v) 亚硝酸钠具有根据相关USP中的相关方法测定的针对亚硝酸根的阳性鉴定试验；
- [0183] (vii) 任选地根据相关USP和/或使用pH计所测量，当在10%溶液在25℃下测量时，亚硝酸钠的pH值介于约7与约9之间或约8与约9之间；
- [0184] (xix) 亚硝酸钠含有至多约0.1重量%、至多约5000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的乙醇；
- [0185] (xx) 亚硝酸盐含有至多约3000ppm、至多约1000ppm、至多约500ppm、至多约100ppm或至多约10ppm的甲醇；以及
- [0186] (xxix) 亚硝酸盐含有小于约0.1ppm的磷酸盐，例如磷酸钠、磷酸氢二钠或磷酸三钠，并且优选地，亚硝酸盐不含可检测量的磷酸盐。
- [0187] 特性(i)至(xxix)可以根据USP XXXII (2009)中的相关方法测定。用于测定特性(i)至(xxix)的方法提供于WO 2010/093746 (公开内容以引用的方式整体并入本文中)中。WO 2010/093746中还描述了制备具有特性(i)至(xxix)中的一者或多者的亚硝酸钠的方法。
- [0188] 包含一种或多种有机羧酸的质子源和质子源组分
- [0189] 本公开的方面涉及质子源，该质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸。在下文中，术语“质子源组分”涵盖质子源本身，和用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应系统的含有质子源的任何组分。
- [0190] 在本节中，将更详细地举例说明有机羧酸。
- [0191] 本文中的表述“有机羧酸”是指分子中含有一个或多个-COOH基团的任何有机酸。有机羧酸可以是直链或支链的。羧酸可以是饱和或不饱和的。羧酸可以是脂族的或芳族的。

羧酸可以是非环状的或环状的。羧酸可以是乙烯类羧酸。

[0192] 有机羧酸可以携带一个或多个取代基,例如一个或多个羟基。可以用于本公开中的羟基取代的有机羧酸的实例包括 α -羟基-羧酸、 β -羟基-羧酸和 γ -羟基-羧酸。

[0193] 一种或多种有机羧酸,或如果有超过一种则其中的每一种,应优选地具有小于约7、更优选地小于7.0的 pK_{a1} 。

[0194] 一种或多种羧酸可以是、包含一种或多种还原羧酸或由其组成。

[0195] 羧酸可以是酸水凝胶,其含有与形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子共价连接的-COOH侧基。这类含有羧酸的水凝胶的实例描述于例如W02007/007115、W0 2008/087411、W0 2008/087408、W0 2014/188174和W02014/188175以及其中提及的文献中,所有这些文献的公开内容以引用的方式并入本文中。这类水凝胶典型地包含与三维聚合物基质共价键结的呈酸或盐形式的羧酸和磺酰基侧基。关于进一步的论述,请参见下文标题为“组分的其它贮存器:水凝胶”的章节。

[0196] 然而,一般优选地,一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸中的至少一者不与聚合物或大分子,例如形成水凝胶的三维聚合物或大分子基质的聚合物或大分子共价键结。不希望受理论束缚,证据,例如在下文标题为“有机多元醇”的章节中论述的对多元醇的立体异构的作用的依赖性的证据,表明了本公开的增强一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应输出的作用至少部分地通过酸化反应时与亚硝酸盐和质子相互作用的有机多元醇分子的作用实现的,这暗示了在反应期间在多元醇分子的影响下反应物分子取向和重定位的移动性可为重要的。即使多元醇不一定存在,例如在本公开的第八方面中,也可以推测在一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应中反应物之间的相同移动性可为重要的。

[0197] 有机羧酸可以例如选自水杨酸、乙酰水杨酸、乙酸、柠檬酸、乙醇酸、扁桃酸、酒石酸、乳酸、马来酸、苹果酸、苯甲酸、甲酸、丙酸、 α -羟基丙酸、 β -羟基丙酸、 β -羟基丁酸、 β -羟基- β -丁酸、萘甲酸、油酸、棕榈酸、帕莫酸(扑酸)、硬脂酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、葡庚糖酸、葡糖醛酸、乳糖酸、肉桂酸、丙酮酸、乳清酸、甘油酸、甘草酸、山梨酸、透明质酸、海藻酸、草酸、它们的盐和它们的组合。在具体的实施方案中,有机羧酸选自柠檬酸、其盐以及它们的组合。在一个具体的实施方案中,有机羧酸是柠檬酸或其盐。羧酸可以是或包含聚合物或聚合羧酸,例如聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、丙烯酸与甲基丙烯酸的共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸或乳酸与乙醇酸的共聚物。本文中使用的术语“有机羧酸”还涵盖有机羧酸的部分或完全酯或其部分或完全盐,条件是那些酯或盐可以用作根据本发明使用的质子源。

[0198] 优选地,在一种或多种亚硝酸盐与质子源之间即将接触时质子源的pH值进行缓冲,以控制pH值在已知的范围内并随着亚硝酸盐的消耗,限制pH值的增加速率。更多细节请参见下文标题为“pH控制;任选的缓冲系统”的章节。具体地说,设想质子源的至少一种有机羧酸适合与其共轭碱一起存在。酸和其共轭碱适合在水性载体中形成缓冲液。可以选择缓冲液,以使得在产生 NO_x 的反应进行时由此维持所需pH值,优选地pH值在约3至9、例如约4至8的范围内,优选地对于生理接触或与活细胞和生物体接触,在约5至约8的范围内。共轭碱在存在的情况下可以分开添加,或者可以通过使用酸和/或碱、优选地无机酸和/或无机碱调整pH值当场从质子源产生共轭碱。

[0199] 在添加产生 NO_x 的反应混合物的将影响pH值的其它组分之前(例如,即将添加时)包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH值或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开

始时反应混合物的pH值适合在约3至9、例如约4至8、例如约5至8的范围内。本文中结合质子源使用的表述“初始pH值”意指在添加产生NO_x的反应混合物的将影响pH值的其它组分(包括其一些但不是所有的组分)之前(例如,即将添加时)包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的pH值。干粉质子源材料或者质子源的水溶液的其它前体将以适于产生具有所需初始pH值的水溶液的量使用。

[0200] 如果希望质子源组分呈凝胶或其它载体系统、如水性载体、例如呈含水凝胶或溶液形式存储,那么优选地,含有质子源的系统缓冲到合适的pH值以在存储期间维持质子源的酸性并防止质子源降解。约3-6、例如约3-5的pH值是优选的。必要时,可以通过在快要使用质子源组分时添加碱来提高pH值。

[0201] 一些患者例如对柠檬酸不耐受。应在治疗前测试患者对酸可能的不耐性,并相应地选择酸组分。

[0202] 在一个实施方案中,质子源组分或其部分可呈干燥形式,任选地呈微粒形式如粉末提供,用于本公开中。必要时,质子源组分或其部分可以封装或微囊封装,例如以控制或延迟一种或多种亚硝酸盐与质子源之间的反应。尤其当质子源在室温下通常具有液体或凝胶状态时可以使用封装形式。干燥形式和/或封装可有助于质子源的存储,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。更进一步地,干燥形式和/或封装可有助于质子源组分掺入到小的物体如医疗装置中,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。这类物体包括例如伤口敷药、绷带、血管和其它支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、整形外科螺钉和销以及其它薄的医疗和/或可植入物品。更多细节请参见下文标题为“组分的任选封装(例如微囊封装)”的章节。

[0203] 必要时,任选地封装或微囊封装的一种或多种有机羧酸可以呈干粉或结晶存在于质子源组分中,或与凝胶或其它载体系统、例如水性载体结合,例如呈含水凝胶或其溶液。呈干燥或粉末形式的含有有机羧酸的质子源组分在使用之前宜通过添加水制成溶液。在添加产生NO_x的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在引发与亚硝酸盐的反应之前(例如在即将引发时)这类溶液中的总质子源(包括存在的任何有机非羧酸还原酸)的摩尔浓度可以在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在添加产生NO_x的反应混合物的任何其它组分之前(例如在即将添加时)且尤其在引发与亚硝酸盐的反应之前(例如在即将引发时)这类溶液中的总质子源的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总质子源的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更具体的实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总质子源的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总质子源的摩尔浓度可以在0.8至1.2M的范围内。举例来说,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总质子源的摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0204] 本文中使用的表述“总质子源的摩尔浓度”、“总质子源的浓度”等应理解为是指在使用质子(H⁺)供体部分或质子(H⁺)供体部分(在超过一种的情况下)中的至少一者大部分被质子化,即,以摩尔计超过50%被质子化的pH值,用作根据本发明的质子源的有机羧酸和/或有机非羧酸任何一者的浓度。换句话说,如果在引发产生NO_x的反应前,pH值调到更高的pH值,借此质子化程度降低,那么不认为总质子源的摩尔浓度或浓度相应地降低。

[0205] 应当注意,将产生NO_x的反应混合物的两种或更多种前体溶液进行组合的行为将会稀释每种溶质或溶质组合在每个溶液中的浓度,这是本领域的技术人员众所周知的。举例来说,溶质A和B的两个1M溶液以同等体积混合的行为引起A的浓度变成0.5M,B的浓度变成0.5M。除非另有说明或暗示,否则本文所述的质子源的浓度是在添加产生NO_x的反应混合物的呈液体、例如溶液形式添加的任何其它组分之前(例如,即将添加时)它在初始溶液中的浓度。已知反应混合物组分和制备方式,容易推导产生NO_x的反应混合物中的实际浓度。

[0206] 呈干燥或粉末形式的质子源组分在使用之前宜通过添加水制成溶液。

[0207] 必要时,无论是呈干燥形式还是呈载体液体,一种或多种有机羧酸都可以与一种或多种多元醇或这类多元醇中的一些一起混合存在或形成溶液

[0208] 优选地,直到希望产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体时,亚硝酸盐组分才与质子源接触反应。为此,质子源组分或其一部分优选地保存在试剂盒、设备或装置的贮存器或容器中。然而,可替代地,一种或多种亚硝酸盐或亚硝酸盐组分、质子源和一种或多种多元醇的干燥组分可呈干燥组合物、例如微粒混合物形式保存,并且通过简单添加水或另一种合适的溶剂或液体载体来引发反应。

[0209] 包含一种或多种有机非羧酸还原酸的质子源组分

[0210] 对包含一种或多种有机羧酸或由其组成的质子源组分的以上论述类似地适用于包含一种或多种有机非羧酸还原酸或由其组成的质子源组分。在本节中,将更详细地举例说明有机非羧酸还原酸。

[0211] 本文中的表述“有机非羧酸还原酸”是指分子中不含-COOH基团的任何有机还原酸。有机非羧酸还原酸可以是直链或支链的。非羧酸还原酸可以是饱和或不饱和的。非羧酸还原酸可以是脂族的或芳族的。非羧酸还原酸可以是非环状的或环状的。非羧酸还原酸可以是乙烯类的。

[0212] 一种或多种有机非羧酸还原酸或如果有超过一种则其中的每一种应优选地具有小于约7、更优选地小于7.0的pK_{a1}。

[0213] 出于以上解释的原因,一般优选地,一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸中的至少一者不与聚合物分子,例如形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子共价键结。

[0214] 有机非羧酸还原酸可以例如选自抗坏血酸;抗坏血酸棕榈酸(抗坏血酸棕榈酸酯);抗坏血酸衍生物,例如3-O-乙基抗坏血酸、其它3-烷基抗坏血酸、6-O-辛酰基抗坏血酸、6-O-十二酰基抗坏血酸、6-O-十四酰基抗坏血酸、6-O-十八酰基抗坏血酸和6-O-十二烷二酰基抗坏血酸;酸性还原酮,例如还原酸;异抗坏血酸;草酸;它们的盐;以及它们的组合。在一个具体的实施方案中,有机非羧酸还原酸是抗坏血酸或其盐。

[0215] 有机非羧酸还原酸可以携带一个或多个取代基,例如一个或多个羟基。可以用于本公开中的羟基取代的有机非羧酸还原酸的实例包括酸性还原酮,例如还原酸(2,3-二羟基-2-环戊酮)。

[0216] 优选地,在一种或多种亚硝酸盐与质子源之间接触之后质子源和/或反应混合物的pH值进行缓冲,以控制pH值在已知的范围内并随着亚硝酸盐的消耗,控制pH值的增加。更多细节参见下文标题为“pH控制;任选的缓冲系统”的章节。具体地说,设想质子源的至少一种有机非羧酸还原酸适合与其共轭碱一起存在。酸和其共轭碱适合在水性载体中形成缓冲

液。可以选择缓冲液,以使得在产生NO的反应进行时由此维持所需pH值,优选地pH值在约3至9、例如约4至8的范围内,优选地对于生理接触或与活细胞和生物体接触,在约5至约8的范围内。共轭碱在存在的情况下可以分开添加,或者可以通过使用酸和/或碱、优选地无机酸和/或无机碱调整pH值当场从质子源产生共轭碱。

[0217] 在添加产生NO_x的反应混合物的将影响pH值的其它组分之前(例如,即将添加时)包括任何所需缓冲液的质子源的水溶液的初始pH值或在与一种或多种亚硝酸盐的反应开始时反应混合物的pH值适合在约3至9、例如约4至8、例如约5至8的范围内。干粉质子源材料或者质子源的水溶液的其它前体将以适于产生具有所需初始pH值的水溶液的量使用。

[0218] 如果希望质子源组分呈凝胶或其它载体系统、如水性载体、例如呈含水凝胶或溶液形式存储,那么优选地,含有质子源的系统缓冲到合适的pH值以在存储期间维持质子源的酸性并防止质子源降解。约3-6、例如约3-5的pH值是优选的。必要时,可以通过在快要使用质子源组分时添加碱来提高pH值。

[0219] 一些还原酸如草酸具有毒性。相应地选择酸组分。

[0220] 除了呈上述方式的一种或多种有机羧酸之外或者代替该一种或多种有机羧酸,质子源组分中还可以使用一种或多种有机非羧酸还原酸。进一步细节请参见标题为“包含一种或多种有机羧酸的质子源和质子源组分”的章节。

[0221] 有机多元醇和有机多元醇组分

[0222] 本公开的方面涉及一种或多种有机多元醇。在下文中,术语“有机多元醇组分”或“多元醇组分”涵盖有机多元醇本身,和用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应系统的含有有机多元醇的任何组分。

[0223] 本文中的表述“有机多元醇”是指具有两个或更多个羟基的一种有机分子,它不是质子源,尤其对于亚硝酸盐反应来说,也不是糖或多糖(术语“糖”和“多糖”包括寡糖、聚糖和氨基多糖)。因此,有机多元醇将具有约7或更大,例如7.0或更大的pK_{a1}。

[0224] 本文中的表述“有机多元醇”优选排除还原剂。在本发明的一个实施方案中,在其所有的方面,因此有机多元醇排除还原剂。作为具有两个或更多个羟基的有机分子但不是糖或多糖的还原剂的实例是硫代甘油(例如1-硫代甘油)、氢醌、丁基化氢醌、抗坏血酸、抗坏血酸盐、异抗坏血酸和异抗坏血酸盐。因此,优选地从表述“有机多元醇”排除硫代甘油(例如1-硫代甘油)、氢醌、丁基化氢醌、抗坏血酸盐和异抗坏血酸盐,因为它们是还原剂。不管怎样都从该表述中排除抗坏血酸和异抗坏血酸,因为它们是质子源,尤其对于亚硝酸盐反应来说。为了避免疑议,确认不从本发明的质子源或本发明的质子源组分、组合、试剂盒、组合物、使用、方法或任何其它部分以及它们作为质子源存在的付诸实践的手段中排除如抗坏血酸和/或异抗坏血酸等是质子源的还原剂。

[0225] 有机多元醇可以是环状的或非环状的,或者可以是一种或多种环状有机多元醇与一种或多种非环状有机多元醇的混合物。举例来说,一种或多种有机多元醇可以选自被两个或更多个OH基团取代的一种或多种烷烃、被两个或更多个OH基团取代的一种或多种环烷烃、被两个或更多个OH基团取代的一种或多种环烷基烷烃以及它们的任何组合。最优选地,有机多元醇不携带任何除OH以外的取代基。

[0226] 优选地,一种或多种有机多元醇是一种或多种非环状有机多元醇。优选的一种或多种非环状有机多元醇选自具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的糖

醇。优选的一种或多种非环状有机多元醇选自醛醇,例如具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的醛醇。优选地,一种或多种有机多元醇不包括皂角苷、皂角苷配基、甾类或甾类糖苷。

[0227] 可替代地,一种或多种有机多元醇可以是一种或多种环状有机多元醇。在这些实施方案中,一种或多种环状有机多元醇可以是环状糖醇或环状醛醇。举例来说,一种或多种环状多元醇可以是具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的环状糖醇或具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的环状醛醇。环状多元醇的特定实例是肌醇。

[0228] 在一些实施方案中,一种或多种有机多元醇具有7个或更多的羟基。在具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有7个或更多的羟基的糖醇或醛醇。在更具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇具有9个或更多的羟基。在其它实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有9个或更多的羟基的糖醇或醛醇。在一些实施方案中,一种或多种有机多元醇具有20个或更少的羟基。在具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有20个或更少的羟基的糖醇或醛醇。在更具体的实施方案中,一种或多种有机多元醇具有15个或更少的羟基。在其它实施方案中,一种或多种有机多元醇是具有15个或更少的羟基的糖醇或醛醇。一种或多种有机多元醇可具有在7至20范围内、更具体地说在9至15范围内的多个羟基。在某些实施方案中,一种或多种有机多元醇包括9个、12个、15个或18个羟基。

[0229] 优选地,一种或多种有机多元醇是糖醇化合物,所述糖醇化合物包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元,例如由这些单元组成。一种或多种有机多元醇可以是糖醇化合物,所述糖醇化合物包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元的直链或者一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元的支链,例如由所述直链或支链组成。

[0230] 如本文所用的单糖单元是指与化合物中的至少一个其它单元(无论另一个单糖单元还是非环状糖醇单元)共价连接的单糖。如本文所用的非环状糖醇单元是指与化合物中的至少一个其它单元(无论单糖单元还是另一个非环状糖醇单元)共价连接的非环状糖醇。化合物中的单元可以通过醚键连接。在一些实施方案中,一个或多个单糖单元通过糖苷键与化合物的其它单元共价连接。在具体的实施方案中,每个单糖单元通过糖苷键与化合物的其它单元共价连接。在某些实施方案中,糖醇化合物是具有单糖或寡糖糖基和非环状糖醇糖苷配基的糖苷。

[0231] 优选的非环状糖醇单元是具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的糖醇单元。在具体的实施方案中,非环状糖醇单元选自赤藓醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇和庚七醇的单元组成的组。

[0232] 在具体的实施方案中,一个或多个单糖单元是C₅或C₆单糖单元。换句话说,一个或多个单糖单元是戊糖或己糖单元。在更具体的实施方案中,每个单糖单元是C₅或C₆单糖单元。在具体的实施方案中,一个或多个糖醇单元是C₅或C₆糖醇单元。在更具体的实施方案中,每个糖醇单元都是C₅或C₆糖醇单元。

[0233] 在某些实施方案中,糖醇化合物包含n个单糖单元和m个非环状糖醇单元,例如由这些单元组成,其中n是整数,至少是1,m是整数,至少是1,并且(n+m)至多为10。在某些实施方案中,糖醇化合物包含用一种非环状糖醇单元封端的n个单糖单元的链,例如由该链组

成,其中n是1与9之间的整数。在这些实施方案中,单糖单元的链可以通过糖苷键共价连接。在具体的实施方案中,每个单糖单元通过糖苷键与另一个单糖单元或非环状糖醇单元共价连接。在某些实施方案中,糖醇化合物包含用一个非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链,例如由该链组成。1个、2个、3个或每个单糖单元可以是C₅或C₆单糖单元。非环状醇单元可以是C₅或C₆糖醇单元。糖醇化合物的实例包括但不限于:异麦芽糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇(n=1);麦芽三糖醇(n=2);和麦芽四糖醇(n=3)。

[0234] 这类糖醇化合物可以描述为衍生自二糖或寡糖的糖醇。如本文所用,寡糖是指由三个至十个单糖单元组成的糖。衍生自二糖或寡糖的糖醇可以(例如通过氢化)由二糖、寡糖或多糖(例如由水解和氢化)合成,但不限于由二糖、寡糖或多糖合成的化合物。举例来说,衍生自二糖的糖醇可以由单糖和糖醇的脱水反应形成。一种或多种有机多元醇可以是衍生自二糖、三糖或四糖的糖醇。衍生自二糖的糖醇的实例包括但不限于异麦芽糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。衍生自三糖的糖醇的一个实例包括但不限于麦芽三糖醇。衍生自四糖的糖醇的一个实例包括但不限于麦芽四糖醇。

[0235] 作为合适的有机多元醇,可提及选自以下的任一者:赤藓醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚多羟糖醇和它们的任何组合。可以使用丙三醇,并且当存在时,优选地与一种或多种其它有机多元醇结合,例如赤藓醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚多羟糖醇或它们的任何组合。

[0236] 许多有机多元醇含有一个或多个手性中心,因此呈立体异构形式存在。意图有机多元醇的所有立体异构形式和光学异构体和异构体混合物包括在本公开和专利的范围内。具体地说,可以使用所有手性有机多元醇的D和/或L形式以及它们的所有混合物。

[0237] 有趣地,已经发现在本公开中使用多元醇的作用是取决于立体化学的。因此,用于本公开的一种或多种有机多元醇的光学异构形式或光学异构体混合物的选择可能影响亚硝酸盐与质子源之间的反应结果,至少在产生的NO的量方面。

[0238] 举例来说,山梨糖醇是甘露糖醇的立体异构体,彼此的不同之处在于一个羟基的取向。如下文实施例2D和2E所示(图5和6),山梨糖醇和甘露糖醇对亚硝酸盐与质子源之间的反应输出的作用在其它方面均相同的反应系统中有差异。

[0239] 在具体的实施方案中,有机多元醇选自以下的组:阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇和它们的任何组合。阿糖醇可以是D或L阿糖醇或者它们的混合物。木糖醇可以是D或L木糖醇或者它们的混合物。山梨糖醇可以是D或L山梨糖醇或者它们的混合物。甘露糖醇可以是D或L甘露糖醇或者它们的混合物。

[0240] 在特定实施方案中,当用于本文所述的系统、方法、组合、试剂盒和组合物中,用于结核感染的治疗中或用于治疗结核感染或用于减少结核细菌数目的抗微生物方法时,一种或多种多元醇是如本文所述的包含一个或多个单糖单元和一个或多个非环状糖醇单元(包括衍生自二糖或寡糖的糖醇),例如由这些单元组成的糖醇化合物。

[0241] 在一个实施方案中,有机多元醇组分可呈干燥形式,任选地呈微粒形式如粉末提供,用于本公开中。必要时,有机多元醇可以封装或微囊封装,例如以控制或延迟一种或多种亚硝酸盐与质子源之间的反应中多元醇的参与。尤其当有机多元醇在室温下通常具有液

体或凝胶状态时可以使用封装形式。干燥形式和/或封装可有助于有机多元醇组分的存储,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。更进一步地,干燥形式和/或封装可有助于有机多元醇组分掺入到小的物体如医疗装置中,无论单独还是与根据本公开产生一氧化氮的反应的其它组分混合。这类物体包括例如伤口敷药、绷带、血管和其它支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、整形外科螺钉和销以及其它薄的医疗和/或可植入物品。更多细节请参见下文标题为“组分的任选封装(例如微囊封装)”的章节。

[0242] 可替代地,有机多元醇组分可包括载体介质,例如水性载体液体或凝胶载体。如果有机多元醇在室温下通常是液体,那么它可用作载体介质,没有任何另外的载体组分,或者可以与一种或多种载体添加剂如水混合使用。

[0243] 必要时,任选地封装或微囊封装的一种或多种有机多元醇可以呈干粉或结晶存在于多元醇组分中,或与凝胶或其它载体系统、例如水性载体结合,例如呈含水凝胶或其溶液。呈干燥或粉末形式的含有有机多元醇的多元醇组分在使用之前宜通过添加水制成溶液。在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度可以是高达溶液中的多元醇或每种多元醇的饱和极限的任何浓度。例如,总一种或多种有机多元醇的摩尔浓度可在约0.001M至约5M的范围内。在一些实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.01M至约2M的范围内。在一些实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.1M至约2M的范围内。在更具体的实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度在约0.2M至约1.6M的范围内。在实施方案中,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度可在0.8至1.2M的范围内。举例来说,在引发与亚硝酸盐的反应之前这类溶液中的总一种或多种多元醇的摩尔浓度可以是约0.8M、约0.9M、约1.0M、约1.1M、约1.2M、约1.5M或约1.7M。

[0244] 应当注意,将产生NO_x的反应混合物的两种或更多种前体溶液进行组合的行为将会稀释每种溶质或溶质组合在每个溶液中的浓度,这是本领域的技术人员众所周知的。举例来说,溶质A和B的两个1M溶液以同等体积混合的行为引起A的浓度变成0.5M,B的浓度变成0.5M。除非另有说明或暗示,否则本文所述的有机多元醇的浓度是在添加产生NO_x的反应混合物的呈液体、例如溶液形式添加的任何其它组分之前(例如,即将添加时)它在初始溶液中的浓度。已知反应混合物组分和制备方式,容易推导产生NO_x的反应混合物中的实际浓度。

[0245] 呈干燥或粉末形式的多元醇组分在使用之前宜通过添加水制成溶液。

[0246] 必要时,无论是呈干燥形式还是呈载体液体,多元醇都可以与一种或多种亚硝酸盐或质子源或这类质子源中的一些一起混合存在或形成溶液。

[0247] 在亚硝酸盐在使用前与产生一氧化氮的反应的其它组分保持分开的具体实施方案中,亚硝酸盐组分可以包括一种或多种多元醇。在这些实施方案中,有机羧酸组分可以基本上不含多元醇。在替代性实施方案中,有机羧酸组分包括一种或多种多元醇。在这些实施方案中,亚硝酸盐组分可以基本上不含多元醇。在其它实施方案中,有机羧酸组分和亚硝酸盐组分每一者可包括一种或多种多元醇,在这两种组分之间多元醇可以相同或不同。

[0248] 在另一个实施方案中,有机羧酸组分和亚硝酸盐组分可以基本上不含多元醇并且

一种或多种多元醇可以包括在单独的多元醇组分中。

[0249] 反应混合物中亚硝酸盐、质子源和任何多元醇的相对浓度

[0250] 在产生NO_x的反应开始时(或在开始之前)多元醇组分中或反应溶液中的任一种或多种有机多元醇的总克分子浓度适合介于亚硝酸盐组分中或反应溶液中的亚硝酸根离子的总克分子浓度的约0.05倍与约3倍之间,例如亚硝酸根离子的总克分子浓度的约0.1倍与约2倍之间,例如约0.25倍与约1.5倍之间,例如约0.3倍与约1.2倍之间。在引发产生NO_x的反应前(或在即将引发时),根据本发明的组合或试剂盒的组分中或者根据本发明的组合物中适合提供相同的一种或多种有机多元醇与亚硝酸根离子之间的相对克分子浓度。

[0251] 在产生NO_x的反应开始时(或在开始之前)多元醇组分中或反应溶液中的任一种或多种有机多元醇的总克分子浓度适合介于质子源组分中或反应溶液中的质子源的总克分子浓度的约0.05倍与约3倍之间,例如质子源的总克分子浓度的约0.1倍与约2倍之间。在引发产生NO_x的反应前(或在即将引发时),根据本发明的组合或试剂盒的组分中或者根据本发明的组合物中适合提供相同的一种或多种有机多元醇与质子源之间的相对克分子浓度。

[0252] 任选的另外的组分

[0253] 用于本公开的组合、试剂盒或组合物可以掺入一系列稀释剂、载体和赋形剂中和/或与一种或多种另外的组分联合提供,具体的功能组分意图为其使用的组合、试剂盒或组合物提供一种或多种具体的益处。当希望在体内使用时,这类稀释剂、载体、赋形剂和/或另外的组分一般是生理学上相容的。

[0254] 合适的生理学上相容的稀释剂、载体和/或赋形剂的实例包括不限于乳糖、淀粉、磷酸二钙、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、纤维素衍生物、交联羧甲基纤维素钠、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁、氯化镁、硫酸镁、氯化钙等。

[0255] 一般来说,取决于预定施用模式,药物制剂将含有约0.005重量%至约95重量%、优选地约0.5重量%至约50重量%的本发明的组合或组合物或它们的组分。制备这类剂型的实际方法是已知的,或者是本领域的技术人员显而易见的。

[0256] 赋形剂可以选自己知的赋形剂,取决于预定用途或将反应物和/或反应产物递送到靶位以递送一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的施用途。例如,可以通过将亚硝酸盐掺入赋形剂,例如乳膏、洗剂和软膏基质,或其它增稠剂和增粘剂(例如Eudragit L100、卡波普(carbopol)、羧甲基纤维素或羟甲基纤维素)中来配制乳膏、洗剂和软膏。质子源可以掺入选自卡波普、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、甲基纤维素的赋形剂中或水性基质中。如果希望形成膜,则可以使用成膜赋形剂,例如丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(聚乙烯酮)、明胶、瓜尔胶和虫胶。

[0257] 任选的另外的组分可例如选自甜味剂、遮味剂、增稠剂、增粘剂、湿润剂、润滑剂、粘合剂、成膜剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、增味剂、盐、包覆剂、抗氧化剂、药物活性剂和防腐剂。这类组分是本领域中众所周知的,对于熟练的读者来说,无需对它们作详细论述。例如湿润剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂和增溶剂的辅助物质的实例包括例如磷酸钠、磷酸钾、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、单月桂酸山梨醇酐酯、三乙醇胺乙酸酯、三乙醇胺油酸酯等。甜味剂或遮味剂可例如包括糖、糖精、阿斯巴特(aspartame)、三氯蔗糖、纽甜或者有利地影响味道、余味、感觉不愉快的咸味、酸味或苦味、减少口服或吸入制剂刺激接受者(例如通过引起咳嗽或喉咙痛或其它不希望有的副作用,例如可能减少递送剂

量或不利地影响患者对规定的治疗方案的顺应性)的倾向的其它化合物。某些遮味剂可与一种或多种亚硝酸盐形成复合物。上文已经给出了增稠剂、增粘剂和成膜剂的实例。

[0258] 对药物活性剂和其它另外的组分、例如用作稀释剂、载体和赋形剂的组分的选择可以由它对相关疾病或医学疾患的治疗方案的适合性以及根据本公开的组合或组合物的期望施用途来决定。可参考标准参考资料,例如Martindale,第39版(2017),the Merck Index,第15版(2013);Goodman&Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics",第13版(2017);the British National Formulary在线(<https://bnf.nice.org.uk/>);Remington: "The Science&Practice of Pharmacy",第22版(2012);或the Physician's Desk Reference,第71版(2017)。

[0259] 可向动物(包括人类)受试者施用根据本公开的组分和组合物以达成治疗目的的施用途的实例包括局部(例如乳膏、洗剂、凝胶、软膏、糊剂、润肤剂、喷雾)、耳、鼻(例如喷雾)、阴道、直肠(例如栓剂)、口腔(例如雾剂、喷雾、漱口水、气溶胶)、肠(例如片剂、软锭剂、口含锭、胶囊、舔膏剂、酏剂)和肠胃外(例如可注射液)、眼、耳、鼻或喉(例如滴剂)或经由呼吸道或肺(例如雾剂、气溶胶、粉末吸入)。

[0260] 可以掺入根据本公开的组分和组合物中或与根据本公开的组分和组合物共同施用的药物活性剂的实例包括抗生素、甾类、麻醉剂(例如局部麻醉剂,例如利诺卡因(lignocaine)(利多卡因(lidocaine))、阿美索卡因(amethocaine)(丁卡因(tetracaine))、木卡因(xylocaine)、丁哌卡因(bupivacaine)、丙胺卡因(prilocaine)、罗哌卡因(ropivacaine)、苯佐卡因(benzocaine)、甲哌卡因(mepivocaine)、古柯碱或它们的任何组合)、止痛剂、消炎剂(例如非甾类抗炎药(NSAID))、抗感染剂、疫苗、免疫抑制剂、抗惊厥剂、抗痴呆药物、前列腺素、退热剂、抗霉菌剂、抗牛皮癣剂、抗病毒剂、血管扩张剂或血管收缩剂、防晒制剂(例如PABA)、抗组胺剂、激素(例如雌激素、黄体酮或雄激素)、抗皮脂溢剂、心血管治疗剂(例如 α 或 β 阻滞剂或Rogaine)、维生素、皮肤软化剂、酶、肥大细胞稳定剂、杀疥螨药、杀虱剂、角质层分离剂、润滑剂、麻醉药、洗发剂、抗粉刺制剂、烧伤治疗制剂、清洁剂、除臭剂、褪色剂、尿布(尿片)疹治疗产品、润肤剂、保湿剂、感光剂、毒叶藤或毒栎或漆树产品、晒伤治疗制剂、蛋白质、肽、蛋白多糖、核苷酸、寡核苷酸(例如DNA、RNA等)、矿物质、生长因子、含焦油制剂、含蜂蜜制剂(例如含有麦卢卡蜂蜜(Manuka honey)的制剂)、疣治疗制剂、湿敷药、伤口护理产品或它们的任何组合。

[0261] 具体的实例包括止痛剂,例如布洛芬(ibuprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、双氯芬酸(diclofenac)、乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid)、扑热息痛(paracetamol)、普萘洛尔(propranolol)、美托洛尔(metoprolol)和羟考酮(oxycodone);甲状腺释放激素;性激素,例如雌激素、黄体酮和睾丸激素;胰岛素;维拉帕米(verapamil);加压素;氢化可的松;东莨菪碱;硝化甘油;二硝酸异山梨醇酯;抗组胺剂,例如特非那定(terfenadine);可尼丁(clonidine);烟碱;非甾类免疫抑制药物,例如环孢霉素(cyclosporine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、咪唑硫嘌呤(azathioprine)、霉酚酸酯(mycophenylate)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、TNF- α 拮抗剂和抗IL5、抗IL4Ra、抗IL6、抗IL13、抗IL17、抗IL23细胞因子单克隆抗体;抗惊厥剂;以及用于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、痴呆和/或帕金森病(Parkinson's disease)的药物,例如阿朴吗啡(apamorphine)和利凡斯的明(rivastigmine)。必要时,任选的另外的组分中的任一者可以进行封装或微囊封装,例如以

控制或延迟它的释放。更多细节请参见下文标题为“组分的任选封装(例如微囊封装)”的章节。

[0262] 组分的任选封装(例如微囊封装)

[0263] 用于本公开的组合、试剂盒和组合物的至少一些组分可以进行封装,例如微囊封装。

[0264] 使用微囊封装的组分来产生NO是适用的,因为它拖延相对不稳定的化合物(例如NO)从处于化学稳定形式的前体产生。多种微囊封装的反应物和/或一种或多种任选的另外的组分容易混合并相互接触存储于干燥环境中,并且仅仅通过将少量的水提供到前体混合物就可引发NO的产生。可替代地,微囊封装的反应物和/或一种或多种任选的另外的组分的这类混合物可以直接施加于受试者,例如皮肤、粘膜表面或根据本发明,施加到受试者的鼻、口腔、呼吸道和/或肺中,其中生理环境本身提供充足的水来引起治疗量的NO释放。另一个优点是微囊封装的反应物和/或一种或多种任选的另外的组分占据的体积相对较小,因此它们容易掺入小的物体如医疗装置中。这类物体包括例如伤口敷药、绷带、血管和其它支架、导管、起搏器、除颤器、心脏辅助装置、人工瓣膜、电极、整形外科螺钉和销以及其它薄的医疗和/或可植入物品。

[0265] 用于封装或微囊封装反应物和/或一种或多种任选的另外的组分的产生方法的一个实例是反应物和/或一种或多种任选的另外的组分的熔体或聚合物溶液的喷雾干燥以产生各个颗粒的极细粉末,其包含分散在聚合物基质内的材料。还可以使用其它的封装或微囊封装方法,例如锅包衣法、空气悬浮包衣法、离心挤压法、纤维纺丝法、纤维挤压法、喷嘴振动法、离子凝胶法、凝聚相分离法、界面交联法、原位聚合法和模板聚合法。封装聚合物优选是生物相容的。这类聚合物包括乙基纤维素、天然聚合物(例如玉米蛋白)(在某些草类物种中发现的醇溶谷蛋白种子存储蛋白,包括玉蜀黍和玉米)、壳聚糖、透明质酸和海藻酸或生物可降解的聚酯、聚酐、聚(原酸酯)、聚磷腈或多糖(参见Park等人, *Molecules* 10 (2005), 第141-161页)。众所周知一种化学物质如上所指示进行微囊封装的组合物用于递送药物和其它剂。参见Shalaby和Jamiołkowski, 美国专利No. 4130639; Buchholz和Meduski, 美国专利No. 6491748。然而,实际上在所有这类组合物中,治疗剂被微囊封装,并且治疗剂不是通过微囊封装试剂的反应产生的。然而,对现有技术的教导内容的适当修改在本领域一般技术人员的技能范围内。已经针对涉及NO加合物/供体的医学物品描述了释放一氧化氮的聚合物。参见例如Arnold, 美国专利No. 7829553 (与疏水性聚合物连接的基于碳的二醇二氮烯翁); Knapp, 美国专利No. 7135189 (亚硝基硫醇前体和一氧化氮供体)。

[0266] pH控制; 任选的缓冲系统

[0267] 组合物可具有控制的pH值。具体地说,组合物可具有在3.0至8.0的范围内或更尤其在4.0至8.0的范围内的pH值。在更具体的实施方案中,组合物具有在4.0至7.4的范围内的pH值。在更具体的实施方案中,组合物可具有在4.0至6.0的范围内的pH值。在这些实施方案中,组合物可具有在4.5至6.0的范围内的pH值。

[0268] 可以通过任何已知的方式来控制组合物的pH值。在具体的实施方案中,在与亚硝酸盐组分之前控制有机羧酸组分或有机还原酸组分的pH值。在一些实施方案中,有机羧酸组分或有机还原酸组分包括缓冲液。缓冲液可以是药理学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲液。

[0269] 在一些实施方案中,通过将有机羧酸或有机非羧酸还原酸和其盐对应物混合来形成缓冲液。举例来说,有机羧酸组分可以包含有机羧酸和有机羧酸的盐。有机非羧酸还原酸组分可以包括有机非羧酸还原酸和有机非羧酸还原酸的盐。在具体的实施方案中,有机羧酸组分包括柠檬酸和柠檬酸盐。在其它实施方案中,有机羧酸组分或有机还原酸组分包括抗坏血酸和抗坏血酸盐。在一些实施方案中,有机羧酸组分包括有机羧酸和另一种有机酸的盐。举例来说,有机羧酸组分可包括柠檬酸和抗坏血酸盐。在其它实施方案中,有机羧酸组分可包括有机羧酸、有机羧酸的盐和另一种有机羧酸的盐。举例来说,有机羧酸组分可包括柠檬酸、柠檬酸盐和抗坏血酸盐。

[0270] 在其它实施方案中,通过调整有机羧酸或有机非羧酸还原酸的pH值,以使得酸(质子化形式)与其盐对应物混合共存来形成缓冲液。这适宜通过以当场产生缓冲系统的这类量添加强无机碱和任选地强无机酸到有机羧酸或有机非羧酸还原酸来实现。合适的强无机碱的实例包括氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、氢氧化铷和氢氧化铯。合适的强无机酸的实例包括盐酸、硫酸、氢溴酸和硝酸。

[0271] 缓冲液可以包括一种或多种生理缓冲液,特别是当根据本公开的组合或组合物接触细胞或动物(包括人)的皮肤、粘膜或其它组织时,例如在根据本发明施用于鼻、口腔、呼吸道或肺的情况下。合适的生理学上相容的缓冲液的实例包括古德缓冲液(Good's buffer),其缓冲在约5至约9的pH范围内,例如2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇、N-2-氨基乙磺酸(ACES)、N-(2-乙酰胺基)-亚氨基二乙酸(ADA)、N-(1,1-二甲基-2-羟基乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸(AMPSO)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、2-双(2-羟乙基)氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(BIS-TRIS)、1,3-双[三(羟甲基)甲基氨基]-丙烷(BIS-TRIS丙烷)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-氨基丙磺酸(DIPSO)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸(EPPS)、双甘氨酸、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(4-丁磺酸)(HEPBS)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、3-吗啉基-2-羟基丙磺酸(MOPSO)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)、哌嗪-1,4-双(2-羟基-3-丙磺酸)脱水物(POPSO)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、[三(羟甲基)甲基氨基]丙磺酸(TAPS)、2-羟基-3-[三(羟甲基)甲基氨基]-1-丙磺酸(TAPSO)、2-[(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)氨基]乙磺酸(TES)、N-[三(羟甲基)-甲基]甘氨酸(Tricine)或2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇(TRIZMA)。

[0272] 组合物的克分子渗透压浓度

[0273] 应控制尤其通过与人类或动物受试者的皮肤、粘膜或根据本发明与鼻、口腔、呼吸道或肺接触的途径将递送到生理系统的亚硝酸盐、质子源、有机多元醇或它们的任何组合的任何溶液的溶质强度,以避免受试者器官和组织发生任何不希望的脱水。

[0274] 渗透压度(0sm)定义为溶于一千克溶剂中的溶质摩尔数,可以表示为渗透压摩尔/千克(0smol/kg)。根据本公开向人类或动物受试者施用的任何溶液的渗透压度一般在约100至约5000m0smol/kg,例如约100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000至约2000、2250、2500、2750、3000、3250、3500、3750、4000、4250、4500、4750或5000m0smol/kg范围内。

[0275] 组分的混合以引发NO_x的产生

[0276] 发现为了引发NO_x的产生而混合产生NO_x的系统的组分的次序可能对使用由此产生的NO_x的结果有影响。下文实施例6中提供了这一影响的证据。

[0277] 在该实施例中,我们证实了根据本发明的组合物杀死THP-1细胞中的细菌结核分枝杆菌HN878的功效是不同的,取决于:一方面,首先将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的组合物中所需的浓度以所需比例混合,然后适当地用水稀释该浓缩物,从而提供有待使用的组合物;或另一方面,首先将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以呈有待使用的形式的组合物所需的浓度以所需比例混合。

[0278] 此外,无可预测哪种混合组分的方式在抗微生物作用方面将产生更好的结果。虽然一般看来,稀释相对浓缩的预混合物来提供有待使用的组合物可能产生更好的针对THP-1细胞中的结核分枝杆菌HN878的抗微生物作用,但在一些情况下,产生的结果不如先以用于该用途所需的浓度混合组分的方法。

[0279] 在本发明的一个实施方案中,因此,制备产生NO_x的组合物的方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以高于呈有待使用的形式的组合物中所需的浓度以所需比例混合,以形成浓缩预混合物,随后适当地用水稀释该浓缩预混合物,从而提供有待使用的组合物。

[0280] 在本发明的另一个实施方案中,因此,制备产生NO_x的组合物的方法包括将亚硝酸盐、质子源和有机多元醇组分以呈有待使用的形式的组合物所需的浓度以所需比例混合,从而提供有待使用的组合物。

[0281] 优选的实施方案

[0282] 本公开的第一至第八方面的优选实施方案是其中存在以下中的一者或多者的实施方案:

[0283] -一种或多种亚硝酸盐包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或它们的任何组合;

[0284] -质子源包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合;

[0285] -所述抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合的分子不共价键结于聚合物或大分子;

[0286] -一种或多种有机多元醇包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):每个分子具有4至12个碳原子和4至12个OH基团的直链糖醇或醛醇,例如山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇或其中的两者或更多者的任何组合;

[0287] -一种或多种有机多元醇是包含用一种非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链,例如由该链组成的糖醇化合物,任选地其中1个、2个、3个或每个单糖单元是C₅或C₆单糖单元和/或非环状醇单元是C₅或C₆糖醇单元;例如异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇;

[0288] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于亚硝酸盐组分中或反应溶液中的亚硝酸根离子的总克分子浓度的0.05倍与3倍之间;

[0289] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于质子源组分中或反应溶液中的质子源的总克分子浓度

的0.05倍与3倍之间；

[0290] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在3.0至9.0的范围内；

[0291] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在4.0至8.0的范围内；

[0292] -对于不涉及反应混合物与根据本发明动物(包括人类)受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在5.0至8.0的范围内；

[0293] -靶向的微生物选自下文在标题为“抗微生物用途的目标”的章节中列出的微生物,例如不限于流感病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*),包括它们的耐抗生素株系。

[0294] 本公开的第九方面的优选实施方案是其中存在以下中的一者或多者的实施方案：

[0295] -一种或多种亚硝酸盐包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或它们的任何组合；

[0296] -质子源包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合；

[0297] -所述抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合的分子不共价键结于聚合物或大分子；

[0298] -一种或多种有机多元醇包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):每个分子具有4至12个碳原子和4至12个OH基团的直链糖醇或醛醇,例如山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇或其中的两者或更多者的任何组合；

[0299] -一种或多种有机多元醇是包含用一种非环状醇单元封端的1个、2个或3个单糖单元的链,例如由该链组成的糖醇化合物,任选地其中1个、2个、3个或每个单糖单元是C₅或C₆单糖单元和/或非环状醇单元是C₅或C₆糖醇单元;例如异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇；

[0300] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于亚硝酸盐组分中或反应溶液中的亚硝酸根离子的总克分子浓度的0.05倍与3倍之间；

[0301] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于质子源组分中或反应溶液中的质子源的总克分子浓度的0.05倍与3倍之间；

[0302] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在3.0至9.0的范围内；

[0303] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在4.0至8.0的范围内;

[0304] -对于不涉及反应混合物与根据本发明动物(包括人类)受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在5.0至8.0的范围内;

[0305] -靶向的微生物选自下文在标题为“抗微生物用途的目标”的章节中列出的微生物,例如不限于流感病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、绿脓杆菌,包括它们的耐抗生素株系。

[0306] 组合和组合物

[0307] 产生NO_x的反应可以通过多种方式来引发。一般这些方式的特征是通过使一种或多种亚硝酸盐与质子源在可开始产生NO_x的反应的条件下接触。

[0308] 可以通过将组合的单独组分进行组合来引发反应。可以在体外实现组合,然后所得组合物可施用于受试者或施加到有待根据本公开处理的任何表面。可替代地,放出的气体可施用于受试者或施加到有待根据本公开处理的任何表面。更进一步,所得组合物的两种使用可以在时间上相隔一段时间进行,以使得组合物在放出一定气体之后施用于受试者或施加到有待处理的任何表面。

[0309] 组合可以是逐步进行的,例如最初混合干粉形式的组分,然后与水或另一种液体载体介质混合以引发反应。可替代地,可以最初将干粉形式的组分分别与水或另一种液体载体介质混合,随后混合两种或更多种液体以引发反应。

[0310] 可替代地,根据本公开的产生NO_x的反应的至少一些组分可以混合存在于单一组合物中,并且在组合物上引发产生NO_x的反应。一种可能引发产生NO_x的反应的方式可为例如添加引发反应的关键组分或添加剂,例如,如果组合物的组分呈干燥或封装形式,那么添加水;或如果组合物的组分缺乏质子源,那么添加质子源。

[0311] 在防止发生产生NO_x的反应的情况下,根据本公开的试剂盒典型地包含根据本公开的组合或根据本公开的组合物的一种或多种组分。试剂盒的一部分典型地保存在容器中,它们可以是分开的,或被改造成适于促进引发产生NO_x的反应所需的混合。需要通过试剂盒的使用者引入其它必要组分中的引发产生NO_x的反应的关键引发组分可以例如是亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分中的一种,或者可以是另外的成分,典型地,通常利用的组分,例如水,它可以由使用者供应。

[0312] 本专利中定义和描述的组合和组合物的参数典型地包括物理参数,如pH、浓度和渗透压度。只要可能,在引发产生NO_x的反应前将测量这些参数。除非另有说明,否则pH参数是指在去离子水中在意图引发产生NO_x的反应的浓度下质子源的pH值。除非另有说明,否则溶液的浓度是指在与其它组分混合以引发产生NO_x的反应之前的浓度。典型地,当亚硝酸盐和有机羧酸或有机还原酸一经混合而反应产生一氧化氮气体时,在产生NO_x的反应在进行中时,不太容易测量这类参数。

[0313] 此外,注意到成分在反应混合物中的浓度不一定对应于混合前它们在组合的一部分中的浓度。举例来说,假定用于引发根据本公开的产生NO_x的反应的组合物由近似相等体积的亚硝酸盐组分和质子源组分形成,两者一起呈预制溶液添加。在该实施方案中,混合的

反应组合物的亚硝酸盐浓度是亚硝酸盐组分浓度的一半,质子源浓度是质子源组分浓度的一半。

[0314] 组合和组合物的一部分可以呈任何合适的物理形式,取决于在产生NO_x的反应期间或之后系统的预定用途。举例来说,组合和组合物的一部分各自可以呈液体、凝胶或膜的形式,以使得产生NO_x的反应混合物类似地呈液体、凝胶或膜的形式。液体可以被改造成能够雾化吸入呼吸道或肺中。如果产生NO_x的混合物意图施加到口腔或咽喉,那么组合和组合物的一部分可以呈嗽口水或饮料的形式。可替代地,如果在局部施用中产生NO_x的反应混合物意图施加到皮肤,那么组合和组合物的一部分可以呈软膏、洗剂或乳膏的形式。

[0315] 多组分系统、试剂盒和分配器

[0316] 本文所述的多组分系统可以包括亚硝酸盐组分和质子源组分,任选地具有多元醇组分,如根据本公开所定义和如本文所述。多组分系统中的组分适宜彼此接触以及接触借助于合适的用于在使用前保存组分的容器或贮存器和用于混合组分、分配反应混合物和/或放出的气体和总体控制所述混合和分配的构件分配的反应混合物和/或放出的气体。在一个优选的实施方案中,反应混合物可呈夹带在气流中的液滴的雾或气溶胶的形式分配。

[0317] 本公开的试剂盒和分配器一般包括:至少一些用于在使用前保存组分的容器;至少一个用于混合组分、分配反应混合物和/或放出的气体和总体控制所述混合和分配的装置或其它构件;以及该组分或那些组分,如果有的话,其在使用前含于试剂盒或分配器的容器中。宜存在使用说明书,或可发现使用说明书的指南,例如在线使用说明书。这类试剂盒和分配器构成了本公开的另一方面。

[0318] 本公开的试剂盒可以是容器和用于混合组分、分配反应混合物和/或放出的气体和总体控制所述混合和分配的装置的相对简单的集合。这类试剂盒适合于研究目的,或适合于可预期和容许混合和分配操作发生广泛变化的情况下。

[0319] 本公开的其它试剂盒可以是包含消耗品(使用者引发产生NO_x的反应所需要的组合和/或组合物,任选地,由使用者供应的水或其它通常可利用的成分)的一种或多种容器连同本公开的一种或多种分配器的更复杂的集合。

[0320] 本公开的分配器一般被改造成适合实现分配反应混合物、包含反应混合物的载体和/或放出的气体的重复相似动作。分配器可包含泵或推进剂系统以运载包含产生NO_x的反应混合物的组合物或从分配器放出的气体并将其引导到目标。推进剂系统可以使用加压气体和/或液化气体,对于医学用途来说,适宜为药学上可接受的或生物相容的,例如加压空气或加压/液化丁烷。可替代地,从使用者的肺中抽吸可以用于运载包含产生NO的反应混合物的组合物或从分配器放出的气体并将其引导到目标。用于本公开的分配器适宜包含致动装置,例如手动操作的触发器或按钮,使用者通过该触发器或按钮可以启动分配器。这类分配器可被改造成适合于专业、研究、消费者或患者用途,并相应地改造成有助于处理目标所通过的预定途径。

[0321] 原则上已知多种试剂盒和分配器设备,他们可用于或容易改造成适合在使用前保存组分,混合组分或促进所述混合,分配包含反应混合物的组合物和/或放出的气体和总体控制所述混合和分配或促进所述控制。

[0322] 例如:

[0323] -注射器,例如双筒分配注射器。

[0324] -容器系统,例如泵动式容器、压动式容器或摇动式容器,例如包含两个容器,以混合至少亚硝酸盐组分和质子源组分并分配包含产生NO_x的反应的组合物或放出的气体。这类系统描述于US 2019/0134080,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0325] -用于在水溶液中使用前保存组分、混合组分、雾化液体反应混合物并分配反应混合物以供吸入人的肺中以及总体控制所述混合和分配的设备。实例包括软雾吸入剂、射流雾化器、超声雾化器和振动筛网式雾化器。适用于吸入雾化的通过亚硝酸盐酸化产生NO_x的反应介质的雾化器、液滴尺寸、辅助剂、包装形式等的选择描述于WO 03/032928和WO 2009/086470中,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0326] -以上设备可以被布置成在预混合的液体反应混合物已经装载到雾化器中之后使其雾化并分配反应混合物以供吸入人的肺中以及总体控制所述混合和分配。

[0327] -用于在水溶液中使用前保存组分、混合组分、使液体反应混合物成烟雾状散开并分配反应混合物以供吸入人的肺中以及总体控制所述混合和分配的设备。实例包括定量吸入器。适用于吸入雾化的通过亚硝酸盐酸化产生NO_x的反应介质的液滴尺寸、辅助剂、包装形式等的选择描述于WO 03/032928和WO 2009/086470中,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0328] -用于将释放一氧化氮的溶液喷雾到上呼吸道的技术和设备描述于美国专利No. 9730956,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0329] -用于在使用前保存干粉形式的组分并分配其以供吸入人的肺中的设备。实例包括干粉吸入器(DPI),其可以被配制成单剂量胶囊,或多剂量干粉吸入器,呈贮存粉末或多剂量单独泡罩。适用于吸入干粉组合用于在肺内提供反应介质以通过亚硝酸盐酸化原位产生NO的粉末粒度、辅助剂、包装形式等的选择描述于WO 2009/086470中,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0330] -用于在呈溶液形式使用前保存组分、使其充气并将其呈泡沫分配用于皮肤消毒用途或治疗皮肤病症的分配器描述于美国专利申请No. 2013/0200109、美国专利7066356和美国专利申请No. 2019/0134080,公开内容以引用的方式并入本文中;

[0331] -用于保存组分并将它们分配到受试者的皮肤的经皮贴片组件描述于WO 2014/188175,公开内容以引用的方式并入本文中。

[0332] 本公开的组合和组合物或放出的气体的剂量可在宽泛的界限内变化,取决于要治疗的疾病、病症或疾患(在医学治疗的情况下)或所希望的作用(在非医学治疗的情况下)、所需治疗的严重程度以及要治疗的受试者的状况、年龄和健康,或在非医学治疗的情况下,要处理的目标的性质。在医学治疗的情况下,最终医师将决定使用的适当剂量。在非医学治疗的情况下,技术人员通过回顾相关文献或通过合理试验将能够研究出适当的剂量和处理方法。

[0333] 在一些实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后600秒内,发生产生NO_x的反应的组合物或从中放出的气体可以施用于目标位置,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。以这种方法,目标位置可以暴露于一大阵一氧化氮。

[0334] 在一些实施方案中,发生产生NO_x的反应的组合物可以在目标位置或附近,例如在微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者上、内部或附近(包括无生命的表面和空间)原位形成。在这些实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后0秒有效地施用。在其它

实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后超过0秒与不到600秒的范围内,组合物施用于目标位置或其附近。在更具体的实施方案中,在0与120秒的范围内施用组合物。在其它实施方案中,在0与60秒的范围内施用组合物。

[0335] 在其它实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后超过600秒、例如超过2000秒、例如超过4000秒、例如超过8000秒,发生产生NO_x的反应的组合物或从中放出的气体可以施用于目标位置或其附近,例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者。在那种情况下,目标位置、例如微生物细胞、活组织、器官、结构或受试者不一定暴露于一大阵一氧化氮,但仍然可经历有益的性质,例如抗微生物作用。在这些实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后长达48小时,可以施用发生产生NO_x的反应的组合物或从中放出的气体。在具体的实施方案中,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后长达几个星期或几个月,例如长达约6个月,或长达约2个月,或长达约1个月,长达约3个月,或长达约2周,或长达约1周,或长达约3天,或长达约24小时,可以施用该组合物或从中放出的气体。

[0336] 在适当存储的情况下,在亚硝酸盐组分和质子源组分组合之后超过48小时,可以施用发生产生NO_x的反应的组合物或从中放出的气体。举例来说,组合物可以存储在密闭容器中,例如真空下。密闭容器中的存储典型地在亚硝酸盐和有机羧酸或有机还原酸组合之后至多24小时进行。组合物可以在组合亚硝酸盐组分和质子源组分之后至多600秒存储在密闭容器中。以这种方法,可以保留一定比例的一氧化氮气体。如果产生NO_x的组合物存储在低温,例如约-30℃至约+10℃范围内、例如约1℃至约10℃的温度下,那么可以大大减缓气体的放出速率,使组合物的存储时间非常长。

[0337] 在一个具体的实施方案中,气溶胶分配器可以包括多个贮存器,其中第一贮存器含有液体形式(例如水溶液)的亚硝酸盐组分并且第二贮存器含有液体形式(例如水溶液)的质子源组分。在该实施方案中,每一种组分适合在混合所述亚硝酸盐和质子源组分之前、期间或之后与推进剂混合。

[0338] 在另一个具体的实施方案中,分配器可以是含有本公开的组合物单筒注射器。组合物粘度经过选择,以能够通过注射器的手动行为或通过动力操作从注射器中分配。例如,组合物可以是液体或凝胶。

[0339] 在另一个具体的实施方案中,分配器可以是多筒注射器,其具有含有亚硝酸盐组分的第一圆筒和含有质子源组分的第二圆筒。组分的粘度经过选择,以能够通过注射器的手动行为或通过动力操作从注射器中分配。例如,每一种组分可以独立地是液体或凝胶。

[0340] 组分的其它贮存器:水凝胶

[0341] 在本公开的一些实施方案中,可以使用分子贮存器,例如水凝胶。水凝胶是高度水合的、通常交联的三维聚合物(均聚物或共聚物)或大分子网络,其能够吸收和保留其干重许多倍的水、其它水性液体或其它非水性的亲水性液体。液体的吸收通常伴随有水凝胶的膨胀。通过适当选择与聚合物或大分子共价键结的组分化学基团,可以制备酸性水凝胶或具有其它特别化学特性的水凝胶。

[0342] 已知可以用作本公开中的质子源组分的水凝胶。这类含有酸性-COOH基团的水凝胶的实例描述于例如WO 2007/007115、WO 2008/087411、WO 2008/087408、WO 2014/188174和WO 2014/188175以及其中提及的文献中,所有这些文献的公开内容以引用的方式并入本文中。这类水凝胶在使用NO_x产生护理皮肤的用途,包括结合NO_x产生经皮递送药物,特别描

述于WO 2014/188174和WO 2014/188175。这类水凝胶的特定实例包括丙烯酸、甲基丙烯酸、2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(ATBS,可以从Vinati Organics有限公司获得)和它们的盐的均聚物和共聚物。由包括(甲基)丙烯酸或由(甲基)丙烯酸组成的单体形成的聚合物将包括羧酸侧基,以用作根据本公开的质子源。

[0343] 因此,举例来说,多组分系统可以包括包含质子源组分,任选地还含有有机多元醇的第一酸性水凝胶垫或层组分,另一种组分可以是亚硝酸盐组分。亚硝酸盐组分可以例如是含有溶解的亚硝酸盐的液体介质。以这种方法,水凝胶垫或层的表面可以与亚硝酸盐组分接触,引发产生NO_x的反应。可替代地,亚硝酸盐组分可以是固体载体,例如垫或层,其含有呈能够在固体载体与水凝胶之间接触时溶于水凝胶的吸收液体中的形式的亚硝酸盐。

[0344] 典型地,固体载体垫或层是一氧化氮扩散可渗透的(完全渗透或至少半渗透)。以这种方法,当固体载体垫或层和水凝胶组合以组合亚硝酸盐组分和质子源组分时一氧化氮可以扩散到处理区域。固体载体垫或层可以例如是筛网、无纺布片、薄膜、泡沫、海藻酸盐层或膜。

[0345] 在具体的实施方案中,固体载体层是筛网。筛网可以是许多连接的固体线,典型地是柔性的,形成了使某些物质通过的孔或缺口的网格。筛网可以是织物或无纺布。在一些实施方案中,筛网是无纺布。

[0346] 固体载体层,例如筛网,可以由聚合物材料制成。合适的聚合物材料的实例包括但不限于纤维胶、聚酰胺、聚酯、聚丙烯或它们的掺合物。聚合物材料可以进行处理,以例如增加其亲水性。在具体的实施方案中,固体载体层是聚丙烯网。

[0347] 在具体的实施方案中,固体载体有吸收能力,亚硝酸盐组分至少部分地吸收、吸入或浸渍在固体载体中。吸收、吸入或浸渍的亚硝酸盐组分可以是固体(干燥),或者可以在固体载体内的水溶液中。

[0348] 在具体的实施方案中,固体载体包含超过一层,亚硝酸盐组分吸收、吸入或浸渍在至少一层中或包覆在至少一个外层上。举例来说,固体载体可包括2层、3层、4层、5层、6层、7层、8层、9层、10层或更多层,例如聚丙烯筛网层,吸收、吸入、浸渍或包覆有呈干燥和/或溶液形式的一种或多种亚硝酸盐。

[0349] 酸性水凝胶具有天然的缓冲能力,因为内部大量供应质子化酸性侧基,H⁺离子可以从中经由吸收的水性介质迁移以在水凝胶结构表面上的侧面酸性部分在产生NO_x的反应期间去除质子化时维持表面的相对酸性pH值。

[0350] 还已知非酸性(例如中性或碱性)水凝胶,其中可以吸收并含有亚硝酸盐组分和/或多元醇组分以供本公开中使用。通过质子源提供于与水凝胶接触的液体介质中,和/或通过质子源吸收、吸入、浸渍或包覆到固体载体上,质子源组分可以与这类水凝胶接触。在这类水凝胶中,条件是亚硝酸盐组分、质子源组分或多元醇组分中没有一者与水凝胶的聚合物或大分子网络共价键结;举例来说,考虑到亚硝酸盐组分和质子源组分直到需要引发产生NO_x的反应才能一起反应,本公开所需的所有组分可以吸入水凝胶中并含于水凝胶块内的水性介质中,但不与水凝胶的聚合物或大分子共价键结。

[0351] 水凝胶垫或层的厚度可以在0.5至2mm的范围内。在一些实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1至2mm的范围内。在具体的实施方案中,水凝胶垫或层的厚度在1.0至1.6mm的范围内。

[0352] 以上关于质子源组分所述的特征一般将同等地应用于用作质子源组分的任何酸性水凝胶。因此,举例来说,水凝胶可以含有缓冲液以维持水凝胶的pH值在4.0至9.0或5.0至8.0的范围内。

[0353] 在一些实施方案中,水凝胶可以包括阻挡层。阻挡层典型地是聚合物膜,例如聚氨酯膜,并位于水凝胶的外表面上。使用中,阻挡层典型地位于水凝胶中例如受试者皮肤的相对表面上,以提供所组合的多组分系统与大气之间的屏障。阻挡膜与水凝胶邻接的表面典型地具有比相邻的水凝胶表面大的表面积。以这种方法,阻挡层可超出水凝胶的周边。在这些实施方案中,阻挡层可在其围缘周围具有粘合剂,以在使用中将水凝胶粘合到例如受试者的皮肤。

[0354] 在一个具体的实施方案中,本公开提供了双组分系统,其包含:

[0355] a) 一个或多个筛网,其吸入、浸渍或包覆有一种或多种亚硝酸盐,例如 NaNO_2 ;和

[0356] b) 包含质子源的水凝胶,该质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸,

[0357] 其中组分(a)与组分(b)分开,并且其中组分(a)和(b)中的一种或多种还包含一种或多种有机多元醇;

[0358] 特征在于以下中的一者或多者:

[0359] (a) 一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在;

[0360] (b) 质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0361] (c) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0362] (d) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0363] (e) 当使用一种或多种增塑剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0364] (f) 一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0365] (g) 当使用一种或多种增粘剂时一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0366] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0367] (i) 一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0368] (j) 一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0369] 为了避免疑议,据此确认上文关于本公开的方面描述的特性特征(a)至(h)的实施方案和优选方案同等地应用于该实施方案。

[0370] 可以例如通过组合组分(a)和(b)以引发产生 NO_x 的反应来使用这类系统。然后这

类组合可以例如通过局部施用而用于人类或动物体的疗法或其它治疗中。用途可以如WO 2014/188174和WO 2014/188175中所述,或可以如下所述。系统还可以用于非医学用途,如下所述。当用于系统接触受试者皮肤(包括粘膜)的局部医学应用时,一个或筛网可以是接触皮肤层。

[0371] 疗法或手术中的用途

[0372] 根据本公开进行产生NO_x的反应的组合物和从中放出的气体在疗法和手术中有许多应用,所述疗法和手术包括治愈性疗法和/或预防性疗法、矫正疾病和病症和疾患的手术、整容手术、重建外科,包括人类医学和兽医学以及手术。在对用组合物或从中放出的气体进行的治疗起反应的身体变形或异常引起或加重焦虑、抑郁或另一种精神疾病或病症的情况下,身体疾患的治疗、预防或减轻可相应地治疗、预防或减轻精神疾患,因此本公开的用途还延伸到心理健康领域。

[0373] 已经在文献中报告了一氧化氮和产生一氧化氮的组合物以及基于它们的医学治疗的许多生理作用,因此已经开发出许多治疗性治疗。以下非详尽性清单作为例证来提供。清单用途以及其它未列用途涵盖在本公开和专利内。

[0374] 一氧化氮使血管扩张,提高血液供给和/或降低血压(参见van Faassen等人, Med.Res.Rev.2009年9月;29(5),第683-741页);

[0375] 口服一氧化氮补充剂在高血压患者中降低血压、提高血管顺应性和恢复上皮功能的急性作用描述于Houston等人, J.Clin.Hypertens. (Greenwich), 2014年7月, 16(7), 第524-529页;

[0376] 一氧化氮保护组织免受因血液供给低而引起的损伤(参见van Faassen等人, Med.Res.Rev.2009年9月;29(5),第683-741页);

[0377] 一氧化氮用作一氧化氮能神经元,例如在如胃肠道和勃起组织中的平滑肌上具有活性的一氧化氮能神经元中的神经传递质(参见Toda等人, Pharmacol.Ther., 2005年5月; 106(2),第233-266页);

[0378] 一氧化氮抑制血管平滑肌收缩和生长、血小板凝聚和白细胞附着到内皮,帮助血管达成动态平衡(参见Dessey和Ferron, Current Medical Chemistry-Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry, 2004;3(3),第207-216页);

[0379] 一氧化氮用于减少心脏收缩力和心率(参见Navin等人, J.Cardiovascular Pharmacology, 2002;39(2),第298-309页);

[0380] 新生儿重症护理以促进毛细血管和肺扩张,例如治疗新生儿患者中的原发性肺动脉高压和胎粪吸入后(参见Barrington等人, The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017;1, CD000399 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375630>); 又见 Chotigeat等人, J.Med.Assoc.Thai., 2007;90(2),第266-271页; 又见Hayward等人, Cardiovascular Research, 1999;43(3),第628-638页);

[0381] 在糖尿病患者中预防血管损伤、内皮功能障碍和血管炎症、神经病和非愈合性溃疡,并减少随之而来的需要切断下肢的危险(参见nfb University Studies-“Nitric Oxide Holds Promise for Diabetes”, <http://www.nfb.org/Images/nfb/Publications/vod/vod212/vodspr0613.htm>);

[0382] 改善急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征和重度肺动脉高压中的低血氧症;治疗血

氧不足性呼吸窘迫的可逆性病因(参见Mark等人,N.Eng.J.Med.,12月22日,2005;353(25),第2683-2695页);

[0383] 一氧化氮作为挽救疗法施用于肺栓塞继发性急性右心衰竭患者中(参见Summerfield等人,2011;Respir.Care 57(3),第444-448页);

[0384] 治疗心绞痛、百草枯中毒的影响和其它心血管病症(参见Abrams,The American Journal of Cardiology,1996;77(13),第31C-37C页;

[0385] 治疗膀胱收缩功能障碍(参见Moro等人,Eur.J.Pharmacol.,2012年1月;674(2-3),第445-449页;又见Andersson等人,Br.J.Pharmacol.2008年2月;153(7),第1438-1444页);

[0386] 治疗急性和慢性肺感染和败血症(参见Fang等人,Nature Reviews.Microbiology,2004年10月;2(10),第820-832页;又见Goldfarb等人,Critical Care Medicine,2007年1月;35(1),第290-292页);

[0387] 已经提出包括一氧化氮的毒性活性氮介质(reactive nitrogen intermediate, RNI)作为针对恶性结核分枝杆菌的活化鼠巨噬细胞的抗分枝杆菌作用中的效应分子(参见Chan等人,J.Exp.Med.,1992年4月;175,第1111-1122页);

[0388] 气体一氧化氮可以有效治疗囊肿性纤维化患者中的耐抗生素细菌和真菌肺感染(参见Deppisch等人,2016年2月9日;“Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis:a Phase I clinical study”,Springer,DOI 10.1007/s15010-016-0879-x);

[0389] 已经报告一氧化氮作为皮肤病潜在的局部广谱抗微生物剂,发展耐药性的可能性很小(参见B L Adler和A J Friedman,Future Sci.OA,2015;1(1),FS037);

[0390] 一氧化氮是神经传递质,并且与神经元活性和回避学习到男性与女性中的生殖器勃起范围内的多种功能相关(参见Kim等人,J.Nutrition,2004,134,第28735页);

[0391] 一氧化氮治疗男性阳痿和勃起功能障碍的用途描述于Sullivan等人,Cardiovascular Research,1999年8月,43(3),第658-665页;

[0392] 已经报告了一氧化氮作为手术助剂,帮助伤口愈合、减少局部缺血再灌注损伤、帮助心脏和肺从手术中恢复并帮助从血管手术中恢复以及帮助手术后从整形手术中恢复的潜在用途(参见A Krausz和A J Friedman,Future Sci.OA,2015;1(1),FS056);

[0393] NO的抗微生物和伤口愈合作用描述于WO 95/22335和Hardwick等人,2001,Clin, Sci.100,第395-400页;

[0394] 欧洲专利No.1411908(Aberdeen University)报告了据说显示一氧化氮有效治疗指甲下感染,包括黑曲霉(*Aspergillus niger*)的数据;

[0395] 产生NO_x的组合物局部施用于皮肤用于治疗真菌性皮肤感染,例如脚癣(香港脚(Athlete's Foot))(参见Weller等人J.Am.Acad.Dermatol.,1998年4月,38(4),第559-563页);

[0396] 产生NO_x的组合物局部施用于皮肤用于治疗病毒性皮肤感染(参见W099/44622);

[0397] 产生NO_x的组合物局部施用于皮肤用于治疗血管收缩是根本问题的疾患,例如雷诺氏综合征(Raynaud syndrome)(又名雷诺现象)(参见Tucker等人Lancet,1999年11月13日,354,9191,第1670-1675页);

[0398] WO 2000/053193中描述了使用酸化亚硝酸盐作为在皮肤表面局部产生一氧化氮的剂,用于治疗外周局部缺血和相关疾患,例如雷诺现象和伤口(例如术后伤口)和烧伤;

[0399] 美国专利No.9,730,956 (Stenzler等人) 要求液体一氧化氮释放溶液(NORS) 治疗人的伤口的用途。还宣称NORS具有抗菌性、抗真菌性和/或抗病毒性,并提供了据说证实了对鲍曼醋酸杆菌(*Acetobacter baumannii*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)和溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)的抗菌功效的数据。提供了据说证实了NORS对H1N1流感病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒和牛副流感-3病毒的抗病毒功效的数据。提供了据说证实了NORS针对深红发癣菌(*Trichophyton rubrum*)和须发癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)的抗真菌功效的数据;

[0400] Chou S-H等人,The effects of debanding on the lung expression of ET-1, eNOS, and cGMP in rats with left ventricular pressure overload.*Exp.Biol.Med.*2005,231,第954-959页;

[0401] Gladwin MT等人,Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation.*Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*2006,291,第H2026-H2035页;

[0402] Hunter CJ等人,Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator.*Nat.Med.*2004,10,第1122-1127页;

[0403] Ozaki M,等人,Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium.*Hypertension.*2001,37,第322-327页;

[0404] Rubin LJ,2006.Pulmonary arterial hypertension.*Proc.Am.Thorac.Soc.*3,第111-115页;

[0405] Yellon D.M.等人,2007.Myocardial Reperfusion Injury,*N.Engl.J.Med.*,357,第1121-35页;

[0406] Duranski M.R.等人,Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver.*J.Clin.Invest.*2005,115,第1232-1240页;

[0407] Jung K-H.等人,Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury,*Stroke*,2006,37,第2744-2750页;

[0408] Esme H.等人Beneficial Effects of Supplemental Nitric Oxide Donor Given during Reperfusion Period in Reperfusion-Induced Lung Injury.*Thorac.Cardiovasc.Surg.*2006,54,第477-483页;

[0409] 中国专利申请No.CN 101028229中描述了用于释放NO的酸化亚硝酸盐作为改善人的皮肤质量的剂的用途;

[0410] 中国专利申请No.CN 101062050中描述了用于释放NO的酸化亚硝酸盐作为促进毛发生长和预防或治疗人的脱发的剂的用途。

[0411] 一氧化氮的生理作用的其它综合讨论可见于例如Lancaster等人,*Proc Natl Acad Sci*,1996,91,第8137-8141页;Ignarro等人,*Proc Natl Acad Sci*,1987,84,第9265-

9269页;Brent,J Cell Science,2003,116,第9-15页中综述;Murad,N Engl J Med,2006,355,第2003-2011页中综述。

[0412] 已经公布用于递送NO的药理学形式在Butler和Feelisch,Circulation,2008,117,第2151-2159页中综述。

[0413] 以上引用的每一个出版物的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0414] 本公开适用于一氧化氮和产生一氧化氮的系统的所有治疗和手术用途,包括但不限于以上参考文献中公布的特定疗法和手术用途以及所有其它公布的疗法和手术用途,以及基于对一氧化氮和产生一氧化氮的反应产物的生理作用的基础认识的疗法和手术用途。

[0415] 血管舒张

[0416] 一氧化氮诱发血管舒张的特性表征了使用本公开的组合和组合物以及从中放出的气体的许多治疗。

[0417] 对血管舒张起反应的疾病、病症和疾患的具体实例包括(但不限于)与局部缺血和皮肤损害相关的疾患。

[0418] 与组织局部缺血相关的疾患包括雷诺氏综合征、重度原发性血管痉挛和组织局部缺血,例如由手术、败血性休克、辐射或周围血管疾病(例如糖尿病和其它慢性全身疾病)引起的组织局部缺血。

[0419] 当用于治疗或预防与手术引起的组织局部缺血相关的疾患时,本公开的组合或组合物或使用本公开从产生NO_x的反应放出的一氧化氮可以在手术之前、期间或之后施用于受试者。组合、组合物或放出的气体可以施用于手术部位或手术部位附近。可以使用该组织局部缺血的治疗或预防的外科手术的实例包括移植手术、组织或器官移植手术、冠状动脉手术、颈动脉导管插入术、提供动脉或静脉内插管以施用全身剂(如化疗药物)的手术、包括但不限于带蒂皮瓣或旋转皮瓣的整容外科手术、在与先前外科手术相同的部位切口的重复手术、在不良皮肤和/或不良基础组织灌注区域或预期作为伴发病(例如动脉硬化或糖尿病患者中)的结果发生不良灌注的区域中进行的外科手术、在血管损伤或损害的伤口情况下的手术和去除或矫正皮肤或皮下动静脉畸形的手术。

[0420] 举例来说,通过向器官施用根据本公开的组合、组合物或放出的气体,组合、组合物或放出的气体可以用于治疗或预防器官的缺血性再灌注损伤。器官可以是选自以下的一者或多者:心脏(例如预防或治疗心肌缺血)、脑(例如治疗或预防脑缺血和或梗塞(中风))、肺(例如治疗或预防肺的缺血再灌注损伤)、肾脏(例如治疗或预防肾的缺血再灌注损伤)和肝脏(例如治疗或预防肝脏的缺血再灌注损伤)。手术可以是器官移植。组合、组合物或放出的气体的施用可以在缺血事件之后或可以是预防性的。

[0421] 经皮药物递送用途

[0422] 一氧化氮诱发药物经皮递送的特性代表了本公开的组合和组合物以及从中放出的气体的另一个重要效用。

[0423] 公开内容以引用的方式并入本文中的WO 02/17881和WO 2014/188175描述了用于产生一氧化氮的组合和组合物以及从中放出的气体的经皮药物递送的用途,并且在那些公布中针对这类用途描述的优选方案和实施例也适用于本公开的组合和组合物以及从中放出的气体。

[0424] 典型地,本公开的组合和组合物将包含一种或多种被经皮递送到受试者的药物活

性剂,并呈局部组合或组合物形式提供用于施加到受试者的皮肤。关于可以使用的药物活性剂的实例,请参见上文标题为“任选的另外的组分”的章节。

[0425] 合适的局部组合可以包含含亚硝酸盐的筛网和分开的含质子源的水凝胶,两者适合于一同用于受试者的皮肤,如上文在标题为“组合物或组合物系统的其它贮存器;水凝胶”的章节中所述。多元醇和药物活性剂可以提供于组合的一种或多种单独组分中或掺入水凝胶中,或者多元醇和药物活性剂可以分别采用这些选项的任何组合。

[0426] 伤口、皮肤损害和烧伤的治疗

[0427] 一氧化氮诱发血管舒张和药物经皮递送并杀死微生物或预防微生物增殖的特性产生了本公开的组合和组合物以及从中放出的气体在治疗伤口、皮肤损害和烧伤中的另一个重要效用。

[0428] 可使用本公开治疗的疾患包括溃疡、皮肤供体部位、外科伤口(手术后)烧伤(例如烫伤、浅度烧伤、部分皮层烧伤和全层皮肤烧伤)、裂口和擦伤。伤口可以是慢性的或急性的。溃疡可以是多种来源的,例如动脉或静脉来源的。溃疡的实例包括腿溃疡,例如慢性腿溃疡或急性腿溃疡;压疮,例如慢性压疮或急性压疮;静脉曲张性溃疡和与糖尿病相关的溃疡,例如糖尿病足溃疡。

[0429] 公开内容以引用的方式并入本文中的WO 2014/188174描述了用于产生一氧化氮的组合和组合物以及从中放出的气体治疗伤口、皮肤损害和烧伤的用途,并且在该公布中描述的相同疾患也适用于本公开的组合和组合物以及从中放出的气体。

[0430] 典型地,本公开的组合和组合物将包含一种或多种药物活性剂,并呈局部组合或组合物形式提供用于施加到受试者的皮肤。关于可以使用的药物活性剂的实例,请参见上文标题为“任选的另外的组分”的章节。对于治疗伤口、皮肤损害和烧伤,一种或多种药物活性剂适宜选自止痛剂和/或麻醉剂(例如局部麻醉剂)(例如减少慢性疼痛、急性疼痛或神经性疼痛的止痛剂和/或麻醉剂)、抗微生物剂、消毒剂、消炎剂和抗瘢痕形成剂。

[0431] 合适的局部组合可以包含含亚硝酸盐的筛网和分开的含质子源的水凝胶,两者适合于一同用于受试者的皮肤,如上文在标题为“组合物或组合物系统的其它贮存器;水凝胶”的章节中所述。多元醇和药物活性剂可以提供于组合的一种或多种单独组分中或掺入水凝胶中,或者多元醇和药物活性剂可以分别采用这些选项的任何组合。

[0432] 局部抗微生物用途

[0433] 在抗微生物应用中,治疗有效NO剂量可以很小,例如低到几百百万分率(ppm),例如100至600ppm(参见例如Ghaffari等人,Nitric Oxide Biology and Chemistry,2009,14,第21-29页,公开内容以引用的方式并入本文中),但一氧化氮的有效性基本上取决于维持皮肤接触的时间有多长(Ormerod等人,BMC Research Notes,2011,4,第458-465页,公开内容以引用的方式并入本文中)。

[0434] 已经公布了一氧化氮缓慢局部释放的提议(参见例如美国专利No.6103275)。然而,所得到的局部NO剂量持续不到一小时,这提供了不良的局部抗微生物作用。如上在标题为“多组分系统、试剂盒和分配器”的章节中以及别处所论述,且如以下实施例所示,本公开能够在局部和非局部施用系统中使NO给药期长得多,引起显著的临床优点。

[0435] 具体地说,已经发现本公开的组合和组合物能够在产生NO_x的反应开始之后起始大约200-500秒强烈输出一氧化氮(“初始突释”),任选地,接着是一氧化氮长长的较缓慢释

放期,延续许多小时(“尾”),然后停止放出气体或低于有效水平。由本公开的组合和组合物放出的NO剂量超过公布的最小有效抗微生物剂量,引起本公开的组合和组合物以及从中放出的气体潜在有效的局部抗微生物用途。

[0436] 现有技术中充分描述了用于局部抗微生物应用的产生NO_x的组合和组合物的制剂,例如美国专利申请No.2014/0056957,公开内容以引用的方式并入本文中,并且这类制剂也适用于本公开的组合和组合物。另一个合适的局部组合可以包含含亚硝酸盐的筛网和分开的含质子源的水凝胶,两者适合于一起用于受试者的皮肤,如上文在标题为“组合物或组合物系统的其它贮存器;水凝胶”的章节中所述。多元醇和任何药物活性剂可以提供于组合的一种或多种单独组分中或掺入水凝胶中,或者多元醇和药物活性剂可以分别采用这些选项的任何组合。

[0437] 其它皮肤或局部治疗

[0438] 一氧化氮和产生一氧化氮的组合物的其它局部施用包括刺激毛发生长和治疗阳痿和勃起功能障碍。

[0439] 本公开的组合和组合物可以被配制用于局部施用这类治疗。

[0440] 局部敷药和敷药系统,例如伤口敷药

[0441] 在局部治疗中,常常希望在施加治疗的同时覆盖或保护治疗的皮肤区域。这可以帮助防止伤口遭到污染,帮助从愈合过程中去除脓或碎片,防止或限制治疗组合物在沐浴或淋浴时或通过衣服接触或因受试者的正常活动而损失,并保护治疗过的区域以缓冲敲击或摩擦。

[0442] 为此,通常将治疗合并到局部敷药或敷药系统,例如伤口敷药或敷药系统。敷药或敷药系统的至少一个组成部分典型地包括底板,它可以是不透水的或透水的,任选地具备皮肤粘附部分和任选地其它层,例如纱布或垫层。

[0443] 在另一方面,本公开提供了一种局部敷药,例如伤口或皮肤敷药,或敷药系统,其包含根据本公开的第五方面的组合或组合物,该敷药或该敷药系统的至少一种组分包含底板和任选地一种或多种其它层,例如选自纱布和垫层的层。根据本公开的第五方面的组合或组合物适宜布置在底板的皮肤定向侧上,并布置成当敷药施加到皮肤并引发产生NO_x的反应时期望的表皮区域得到产生NO_x的反应混合物或从中放出的气体治疗。

[0444] 在使用前敷药或敷药系统适宜提供于密封的无菌包装中。

[0445] 鼻、口腔、呼吸道和肺用途

[0446] 一氧化氮诱发血管舒张和药物经皮递送并杀死微生物或预防微生物增殖的特性产生了本公开的组合和组合物以及从中放出的气体在治疗鼻、口腔、呼吸道和肺的粘膜和组织中的另一个重要效用,和/或鼻、口腔、呼吸道和肺作为将本发明的组合和组合物递送到人类或动物受试者的施用途的用途。

[0447] 可使用本发明治疗的疾患包括肺部疾病,例如病毒感染(例如流感、SARS-CoV或SARS-CoV-2)、肺动脉高压、心脏、脑和涉及移植的器官的缺血再灌注损伤、慢性阻塞性肺病(COPD)(尤其、肺气肿、慢性支气管炎)、哮喘(包括重度哮喘,和病毒和细菌诱发的哮喘恶化,和难治性(不可逆)哮喘)、鼻内或肺细菌感染,例如肺炎、结核、非结核分枝杆菌感染和其它细菌性和病毒性肺感染,例如呼吸道病毒感染后的继发性细菌感染。

[0448] 公开内容以引用的方式并入本文中的WO 2009/086470描述了用于产生一氧化氮

的雾化液体组合和组合物和从中放出的气体治疗鼻、口腔、呼吸道和肺的疾病的用途,和/或鼻、口腔、呼吸道和肺作为将这类组合和组合物递送到人类或动物受试者的施用途的用途,并且在该公布中针对这类用途描述的优选方案和实施例也适用于本公开的组合和组合物以及从中放出的气体。

[0449] 典型地,递送到鼻、口腔、呼吸道和肺的本发明的组合和组合物将包含一种或多种药物活性剂。关于可以使用的药物活性剂的实例,请参见上文标题为“任选的另外的组分”的章节。

[0450] 经由鼻、口腔、呼吸道或肺的递送途径,两种主要递送方法可能用于进行本发明。第一种是本发明的组合或组合物直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺。第二种是使用本发明从产生NO_x的反应放出的气体递送到鼻、口腔、呼吸道或肺,没有本发明的组合或组合物进入患者的身体。

[0451] 1. 组合或组合物直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺

[0452] 组合或组合物或者它们的组分可以呈干燥固体形式直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺,其中粘膜流体溶解固体组分材料并引发产生NO_x的反应。

[0453] 组合的组分可以分开或一起施用。在一个优选的实施方案中,质子源或它的至少一种组分可在剩余的组分之前施用,以便在粘膜中建立一个相对酸性的环境,这有助于在亚硝酸盐组分原位接触质子源组分时快速引发产生NO_x的反应。

[0454] 适宜通过使用干粉吸入器吸入干粉,向受试者递送治疗有效剂量的一种或多种干粉组分(例如亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一者或多者)或干粉组合物,将组合的任何干燥组分或干燥组合物直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺,其中干粉吸入器向受试者递送含有体积平均直径小于6微米的颗粒的气溶胶。干粉吸入器可适合于单次或多次加载干粉的给药,以便干粉吸入器每次吸入呼吸向受试者递送约0.1mg与约100mg之间的呈体积平均直径小于6微米的颗粒的一种或多种干粉组分或干粉组合物。

[0455] 另外或可替代地,组合或组合物或者它们的组分可以呈亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一者或多者的溶液液滴的雾或喷雾直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺。

[0456] 本文所述的本发明的实施方案一般适用于直接递送到受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺。不受限制,举例来说,组合或组合物或者它们的组分可以与一种或多种生理学上相容的稀释剂、载体和/或赋形剂结合直接施用到受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺,和/或与一种或多种另外的组分、意图提供一种或多种特定益处的具体功能组分结合提供。合适的生理学上相容的稀释剂、载体和/或赋形剂的实例包括不限于乳糖、淀粉、磷酸二钙、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、纤维素衍生物、交联羧甲基纤维素钠、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁、氯化镁、硫酸镁、氯化钙等。必要时,还可存在少量的无毒辅助物质,例如湿润剂、乳化剂、润滑剂、粘合剂和增溶剂,例如磷酸钠、磷酸钾、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、环糊精衍生物、单月桂酸山梨醇酐酯、三乙醇胺乙酸酯、三乙醇胺油酸酯等。一般来说,取决于预定施用模式,药物制剂将含有约0.005重量%至约95重量%、优选地约0.5重量%至约50重量%的本发明的组合或组合物或它们的组分。制备这类剂型的实际方法是已知的,或者是本领域的技术人员显而易见的。参见例如Martindale,第39版(2017),the Merck Index,第15版(2013); Goodman&Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics",第13版(2017); the British National Formulary在线(<https://bnf.nice.org.uk/>); Remington: "The

Science&Practice of Pharmacy”,第22版(2012);或the Physician's Desk Reference,第71版(2017)。

[0457] 在一个优选的实施方案中,用于递送到受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺的组合或组合物将采取单位剂型的形式,例如含有液体、有待悬浮的固体、干粉、冻干物或其它组合物的小瓶,该组合或组合物适宜含有以下与产生NO_x的反应的组分一起:稀释剂,例如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等;润滑剂,例如硬脂酸镁等;粘合剂,例如淀粉、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素、纤维素衍生物等。

[0458] 适宜通过使用雾化器吸入,向受试者递送治疗有效剂量的一种或多种液体组分(例如亚硝酸盐组分、质子源组分和多元醇组分中的一者或多者)或液体形式的组合物,将包含组合组分的任何液滴或液滴形式的组合物直接递送到鼻、口腔、呼吸道或肺,其中雾化器向受试者递送含有体积平均直径小于5微米的颗粒的气溶胶。雾化器可适合于单次或多次加载组合的液体组分或液体组合物的给药,以便雾化器每次吸入呼吸向受试者递送约0.1mg与约100mg之间的呈体积平均直径小于5微米的液滴、优选地呈尺寸在约2至约5μm的范围内的液滴的一种或多种液体组分或液体形式的组合物。

[0459] 在一个实施方案中,根据允许形成质量中值空气动力学直径(MMAD)主要在约2至约5微米之间的包含组合组分的液滴或液滴形式的组合物的气溶胶来选择雾化器。

[0460] 在一个实施方案中,递送的量的包含组合组分的液滴或液滴形式的组合物提供了针对肺部病变、呼吸道感染的治疗作用,和/或肺外、全身性分布,从而还治疗肺外和全身性疾病。

[0461] 之前,射流和超声两种类型雾化器已经显示能够产生和递送尺寸在2与4μm之间的的气溶胶颗粒。已经显示这些粒度最适于中间气道沉积,由此最适于治疗由革兰氏阴性细菌引起的肺的细菌感染,所述革兰氏阴性细菌例如绿脓杆菌、大肠埃希氏菌、肠杆菌属物种、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、绿脓杆菌、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、木糖氧化产碱菌(*Alcaligenes xylosoxidans*)、金黄色葡萄球菌和多重耐药绿脓杆菌。然而,除非使用特别配制的溶液,否则这些雾化器要施用足以获得治疗作用的量的药物则典型地需要更大的体积。射流雾化器利用气压将水溶液分成气溶胶液滴。超声雾化器利用压电晶体剪切水溶液。然而,典型地,射流雾化器在临床疾患下仅约10%有效,而超声雾化器仅约5%有效。因此,沉积和吸收在肺中的药物的量是10%的一小部分,尽管大量的药物被放入雾化器中。较小的粒度或缓慢的吸入速率允许深度的肺沉积。本发明可能希望中肺和肺泡沉积,取决于适应症,例如对于抗微生物活性,希望中间气道沉积,或对于肺动脉高压和全身递送,希望中间和/或肺泡沉积使用雾化器递送制剂的组合物和方法的示例性公开可见于例如US 2006/0276483,包括对使用振动筛网式雾化器递送气溶胶状雾的技术、方案和表征的描述。US 2006/0276483的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0462] 因此,在一个实施方案中,在优选的实施方案中振动筛网式雾化器用于递送包含组合组分的液滴或液滴形式的组合物的气溶胶。振动筛网式雾化器包含与膜片和吸气和呼气阀呈流体接触的液体贮藏容器。在一个实施方案中,约1ml至约5ml的有待递送的液体制

剂处于贮藏容器中,并且接合气溶胶产生器,产生粒度选择性地介于约1 μ m与约5 μ m体积平均直径之间的雾化气溶胶。

[0463] 因此,举例来说,在优选实施方案中,亚硝酸盐组分制剂或质子源组分、根据本发明任选地包括一种或多种有机多元醇的这些组分中的一者或两者放在液体雾化吸入器中,并按剂量制备以从约1ml至约5ml的给药溶液递送约7mg至约700mg,优选地约1ml至约5ml中约17.5mg至约700mg,更优选地约1ml至约5ml中约17.5mg至约350mg,优选地约1ml至约5ml中约0.1mg至约300mg,更优选地约1ml至约5ml中约0.25mg至约90mg,产生在约1 μ m至约5 μ m之间的体积平均直径粒度。

[0464] 通过非限制的性实例,包含组合组分的雾化液体或液滴形式的组合物可以在不到约20分钟、优选地不到约10分钟、更优选地不到约7分钟、更优选地不到约5分钟、更优选地不到约3分钟且在一些情况下最优选地不到约2分钟内以所述的可吸入递送剂量施用。

[0465] 通过非限制性实例,在其它情况下,包含组合组分的雾化液体或液滴形式的组合物在经更长时间段施用时可以实现改善的耐受性和/或表现出曲线下面积(AUC)形状增强特征。在这些条件下,所述的可吸入递送剂量在超过约2分钟、优选地超过约3分钟、更优选地超过约5分钟、更优选地超过约7分钟、更优选地超过约10分钟并且在一些情况下最优选地约10分钟至约20分钟内。

[0466] 分开组分制剂的一个实例可以包含(i) pH值超过约6、例如在约6至约8的范围内、例如约7的水溶液中的亚硝酸盐;和(ii)水溶液中的质子源组分,至少两种分开液体溶液组分(i)和(ii)能够混合形成产生NO_x的组合物,该组合物可以用于加载雾化器以递送到人类患者或兽医学受试者。

[0467] 对于水性和其它不加压的液体系统,多种雾化器(包括小体积雾化器)可以用来使组合的组分或组合物成烟雾状散开。压缩驱动式雾化器合并射流技术并使用压缩空气产生液体气溶胶。这类装置可从例如以下购得:Healthdyne Technologies公司;Invacare公司;Mountain Medical Equipment公司;Pari Respiratory公司(Midlothian,VA);Mada Medical公司;Puritan-Bennet;Schuco公司;DeVilbiss Health Care公司;以及Hospitak公司。超声雾化器依赖于呈压电晶体振动形式的机械能来产生可吸入液滴,并可以从例如Omron Healthcare公司和DeVilbiss Health Care公司购得。振动筛网式雾化器依赖于压电或机械脉冲来产生可吸入液滴。用于本文所述的亚硝酸盐(nitrite)、亚硝酸盐(nitrite salt)或提供亚硝酸盐或一氧化氮的化合物的雾化器的其它实例描述于美国专利No.4,268,460;4,253,468;4,046,146;3,826,255;4,649,911;4,510,929;4,624,251;5,164,740;5,586,550;5,758,637;6,644,304;6,338,443;5,906,202;5,934,272;5,960,792;5,971,951;6,070,575;6,192,876;6,230,706;6,349,719;6,367,470;6,543,442;6,584,971;6,601,581;4,263,907;5,709,202;5,823,179;6,192,876;6,644,304;5,549,102;6,083,922;6,161,536;6,264,922;6,557,549;以及6,612,303,均以引用的方式整体并入本文中。

[0468] 可以用于本文所述的包含组合组分的液滴或液滴形式的组合物的雾化器的商业实例包括Aerogen (Aerogen公司,Galway,Ireland)生产的Respirgard II®、Aeroneb®、Aeroneb®Pro、AeroEclipse XL®和Aeroneb®Go;Aradigm生产的AERx®和AERx Essence™;Respironics公司(Murrysville,Pennsylvania,USA)生产的Porta-Neb®、

Freeway FreedomTM、SideStream、SideStream Plus、Ventstream和I-neb;以及PARI有限公司(PARI Respiratory Equipment公司, Midlothian, Virginia, USA; PARI有限公司, Starnberg, Germany)生产的PARI LC-Plus[®]、PARI LC-Star[®]、PARI LC-Sprint[®]和e-FlowTM。根据制造商说明书,这些雾化器中的任一者可以与面罩或吸口一起使用。通过其它非限制性实例,美国专利No.6,196,219以引用的方式整体并入本文中。

[0469] 在一个实施方案中,提供了含有可溶性或纳米颗粒物药物颗粒的水性制剂。对于水性气溶胶制剂来说,药物可以0.67mg/mL至最多700mg/mL的浓度存在;在某些优选的实施方案中,亚硝酸盐以每毫升约0.667mg亚硝酸根阴离子至每毫升约100mg亚硝酸根阴离子的浓度存在。这类制剂有效递送到肺部适当区域,更浓缩的气溶胶制剂具有能够在极短时间内将大量原料药递送到肺的额外优点。在一个实施方案中,优化制剂以提供耐受性良好的制剂。因此,某些优选的实施方案包含亚硝酸盐(例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或亚硝酸镁)并被配制成味道良好,pH值为约4.7至约6.5,克分子渗透压浓度为约100至约3600mOsmol/kg,任选地在某些其它实施方案中,渗透离子(例如氯离子、溴离子)浓度为约30至约300mM。

[0470] 在一个实施方案中,用于制备气溶胶制剂的溶液或稀释剂具有在约4.5至约9.0,优选地约4.7至约6.5(例如呈酸性混合物),或作为单个小瓶配置,约7.0至约9.0的范围内的pH值。这一pH值范围改善耐受性,与如本文中其它地方所述,根据某些实施方案包括遮味剂一样。当气溶胶是酸性或碱性时,其可能引起支气管痉挛和咳嗽。虽然pH值的安全范围是相对的,并且一些患者可耐受轻微酸性的气溶胶,但其它患者将经历支气管痉挛。pH值小于约4.5的任何气溶胶典型地诱发支气管痉挛。pH值为约4.5至约5.5的气溶胶有时会引起支气管痉挛。pH值超过约8的任何气溶胶可具有低的耐受性,因为身体组织一般不能缓冲碱性气溶胶。控制pH值低于约4.5和超过约8.0的气溶胶典型地引起肺刺激,伴有严重的支气管痉挛咳嗽和炎症反应。出于这些原因,并且为了避免患者中的支气管痉挛、咳嗽或炎症,确定气溶胶制剂的最佳pH值介于约pH 5.5至约pH 8.0之间。

[0471] 因此,在一个实施方案中,如本文所述使用的气溶胶制剂调至约4.5与约7.5之间的pH值,其中酸性混合物的最优选pH范围为约4.7至约6.5,单一小瓶配置的最优选pH范围为约7.0至约8.0。通过非限制性实例,根据本文公开的某些实施方案,组合物还可包括pH缓冲液或pH调整剂,典型地为由有机酸或有机碱制备的盐,并且在优选的实施方案中,如本文所述的酸性赋形剂(例如非还原酸,例如柠檬酸或柠檬酸盐,例如柠檬酸钠)或缓冲液,例如柠檬酸盐或上述其它缓冲液,且参考表1。因此,这些和其它代表性缓冲液可包括柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的有机酸盐、Tris、缓血酸胺、盐酸盐或磷酸盐缓冲液。

[0472] 许多患者对多种化学味道,包括苦、咸、甜、金属感的敏感性增加。为了创建耐受性良好的药品,可以通过添加遮味剂和赋形剂、调整渗透压度和甜味剂实现遮味。

[0473] 许多患者对多种化学剂的敏感性增加,并且支气管痉挛、哮喘或其它咳嗽事件的发生率高。它们的气道尤其对低渗性或高张力和酸性或碱性条件敏感,且对任何渗透离子如氯离子的存在敏感这些条件中的任何不平衡或超过某一浓度值的氯离子的存在将引起支气管痉挛或炎症事件和/或咳嗽,这大大地减弱了可吸入制剂的治疗。这两个条件可阻止气溶胶化药物有效递送到支气管内空间,缺少根据本文公开的某些实施方案的调节pH值、渗透压度和遮味剂的有利使用。

[0474] 在一些实施方案中,通过提供赋形剂调整本文公开的亚硝酸盐化合物(或在亚硝酸盐或提供一氧化氮的化合物的独特实施方案中)的水溶液的渗透压度。在一些情况下,一定量的渗透离子,如氯离子、溴离子或另一种阴离子,可促进气溶胶化亚硝酸盐的成功和有效递送。然而,已经发现对于本文公开的亚硝酸盐组分来说,这类渗透离子的量可低于典型地用于其它药物化合物的气溶胶化施用的量。

[0475] 对于具有给定渗透压度的气溶胶化来说,可能无法通过使用稀释剂来改善所有情况下的支气管痉挛或咳嗽反射。然而,当稀释剂的渗透压度在一定范围内时,常常可以充分控制和/或抑制这些反射。安全且耐受的用于治疗性化合物气溶胶化的优选溶液具有约100至约3600mOsmol/kg总渗透压度,氯离子浓度在约30mM至约300mM,且优选地约50mM至约150mM的范围内。该渗透压度支气管痉挛,作为渗透阴离子的氯离子浓度控制咳嗽。因为溴离子或碘离子阴离子均为渗透离子,所以其可以取代氯离子。另外,碳酸氢根可以取代氯离子。

[0476] 纳米颗粒物药物分散液还可以冷冻干燥以获得适合于经鼻或经肺递送的粉末。这类粉末可含有具有表面调节剂的聚集纳米颗粒物药物颗粒。这类聚集体可具有在可吸入范围内的尺寸,例如约2至约5微米MMAD。

[0477] 2. 从产生NO的反应放出的气体递送到鼻、口腔、呼吸道或肺

[0478] 用于递送计量的一氧化氮到患者肺的吸入器是众所周知的。一般地说,一氧化氮在部位外产生,并在与专门递送装置连接的增压瓶中递送到医院或诊所以供使用。可以提及IN0max Therapy系统作为实例(BOC Healthcare, UK, <https://www.bochealthcare.co.uk/en/products-and-services/products-and-services-by-category/medical-gases/inomax/inomax.html>)。缩写IN0max(吸入一氧化氮)一般用于IN0max Therapy系统的气瓶,IN0vent用于递送装置。已经公布IN0max Therapy系统的评估,例如Kirmse等人Chest, 1998年6月, 113(6), 第1650-1657页。该公布的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0479] 根据本发明的第一方面的方法适宜在专门NO制造设施中进行,根据本发明的第二方面的气体产物在增压瓶中以正常的方式提供给使用者。然后加压气瓶结合分布、监测、给药、混合和递送设备以已知的方式使用。

[0480] 抗微生物用途的目标

[0481] 如先前描述,本公开的产生NO_x的反应和从中放出的气体对可能广泛的微生物具有杀生物或生物稳定作用,引起许多抗微生物应用。

[0482] 微生物可以例如是选自细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微寄生物的任一者或多者,并且可以是个别的细胞、生物体或集落。细菌细胞、病毒颗粒和/或真菌细胞或微寄生物可以存在于宿主生物体上或体内,例如作为人类或其它动物的肠微生物组,或在人类或其它动物的细菌感染中。细菌和/或真菌细胞和/或病毒颗粒和/或微寄生物可以在体外、体内或离体。

[0483] 本公开尤其可用于治疗或预防受试者中皮肤损害部位的微生物感染。本公开尤其可用于治疗或预防免疫抑制受试者中的微生物感染。

[0484] 当微生物存在于人或其它动物的细菌感染、真菌感染、病毒或微寄生物感染时,感染可例如在例如感冒、流感、结核、SARS、COVID-19、肺炎或麻疹的疾病的背景下。

[0485] 1. 细菌细胞

[0486] 细菌可以是病原细菌物种。微生物感染可以由病原细菌物种引起的感染,病原细菌物种包括革兰氏阳性和革兰氏阴性、需氧和厌氧、抗生素敏感性和耐抗生素细菌。

[0487] 可以使用本发明靶向的细菌物种的实例包括以下细菌的物种:放线菌属(*Actinomyces*)、杆菌属(*Bacillus*)、巴尔通氏体属(*Bartonella*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁氏杆菌属(*Brucella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、衣原体属(*Chlamydia*)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*)、梭状芽胞杆菌属(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌属(*Francisella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、军团菌属(*Legionella*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、李斯特菌属(*Listeria*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、霉浆菌属(*Mycoplasma*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、立克次氏体属(*Rickettsia*)、沙门菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、密螺旋体属(*Treponema*)、脲原体属(*Ureaplasma*)、弧菌属(*Vibrio*)或耶尔森氏菌属(*Yersinia*)。本发明还可以靶向它们的任何组合。

[0488] 在具体的实施方案中,微生物可以是以下病原物种:棒状杆菌属、分枝杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)或它们的任何组合。

[0489] 在更具体的实施方案中,靶向的微生物可以选自伊氏放线菌(*Actinomyces israelii*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、伽氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)、阿氏疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、回归热螺旋体(*Borrelia recurrentis*)、流产布鲁氏杆菌(*Brucella abortus*)、狗布鲁氏杆菌(*Brucella canis*)、马尔他布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏杆菌(*Brucella suis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、鸚鵡热嗜衣原体(*Chlamydophila psittaci*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)、犬埃里希氏体(*Ehrlichia canis*)、查菲埃里希氏体(*Ehrlichia chaffeensis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ,例如肠产毒性大肠杆菌(*Enterotoxigenic E.coli*, ETEC)、肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic E.coli*)、肠侵袭性大肠杆菌(*Enteroinvasive E.coli*, EIEC) 和肠出血性大肠杆菌(EHEC),包括大肠杆菌0157.H7;土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯菌、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、钩端螺旋体属物种(*Leptospira species*)、单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、绿脓杆菌、星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*)、立克次氏立克次氏体属

(*Rickettsia rickettsia*); 伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*); 鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*); 宋内氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*); 痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*); 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*); 腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*); 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*); 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*); 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*); 草绿色链球菌 (*Streptococcus viridans*); 苍白密螺旋体亚种苍白球 (*Treponema pallidum subspecies pallidum*); 霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*); 鼠疫耶尔森氏菌属 (*Yersinia pestis*); 以及它们的任何组合。

[0490] 具体地说, 微生物可以选自肺炎衣原体、炭疽杆菌、白喉棒状杆菌、流感嗜血杆菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌或它们的任何组合。

[0491] 微生物可以是耐抗生素或抗生素敏感性病原细菌物种, 或细菌物种的耐抗生素或抗生素敏感性菌株。一氧化氮治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 和甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA) 的用途描述于例如 W002/20026, 公开内容以引用的方式并入本文中。因此, 可以使用本发明杀死或治疗的耐抗生素或抗生素敏感性病原细菌物种的实例是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌 (MSSA)。

[0492] 2. 真菌细胞

[0493] 微生物可以是病原真菌物种。微生物感染可以由包括病原酵母在内的病原真菌物种引起的感染。

[0494] 可以使用本发明靶向的真菌物种的实例包括以下真菌的物种: 曲霉属 (*Aspergillus*)、芽生菌属 (*Blastomyces*)、念珠菌属 (*Candida*) (例如耳念珠菌 (*Candida auris*))、球孢子菌属 (*Coccidioides*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*) (具体地说, 新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 或格特隐球酵母 (*Cryptococcus gattii*))、组织胞浆菌属 (*Histoplasma*)、毛霉菌属 (*Mucoromycetes*)、肺孢子虫属 (*Pneumocystis*) (例如耶氏肺孢子菌 (*Pneumocystis jirovecii*))、孢子丝菌属 (*Sporothrix*)、篮状菌属 (*Talaromyces*) 或它们的任何组合。

[0495] 真菌感染的实例包括曲霉病 (例如变态反应性支气管肺曲霉病)、脚癣 (香港脚)、由念珠菌属病原物种引起的感染, 例如阴道酵母感染、真菌脚趾甲感染和尿布疹、股圆癣 (股癣) 和体癣 (环癣)。

[0496] 3. 病毒颗粒

[0497] 微生物可以是病毒颗粒。感染可由病原病毒引起。

[0498] 可使用本发明靶向的病毒的实例包括流感病毒、副流感病毒、腺病毒、诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、星状病毒和肝炎病毒。具体地说, 本发明的组合物可以用于治疗或预防由选自以下的组中的一者引起的感染: H1N1 流感病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛呼吸道合胞病毒、牛副流感-3 病毒、SARS-CoV、SARS-CoV-2 以及它们的任何组合。

[0499] 具体地说, 本发明可以应用于治疗由病毒感染引起的疾病或病症。本发明可以靶向的这类疾病的实例包括呼吸道病毒性疾病、胃肠道病毒性疾病、发疹病毒性疾病、肝病毒性疾病、皮肤病毒性疾病、出血性病毒性疾病和神经病毒性疾病。

[0500] 呼吸道病毒感染包括流感、鼻病毒(即感冒病毒)、呼吸道合胞病毒、腺病毒、冠状病毒感染(例如COVID-19)和严重急性呼吸综合征(SARS)。胃肠道病毒性疾病包括诺如病毒感染、轮状病毒感染、腺病毒感染和星状病毒感染。发疹病毒性疾病包括麻疹、风疹、水痘、带状疱疹、玫瑰疹、天花、第五病和切昆贡亚热病毒疾病。肝病毒疾病包括甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎。皮肤病毒性疾病包括疣,例如生殖器疣、口腔疱疹、生殖器疱疹和传染性软疣(molluscum contagiosum)。出血性病毒性疾病包括埃博拉(Ebola)、拉沙热(Lassa fever)、登革热(dengue fever)、黄热病、马尔堡出血热(Marburg hemorrhagic fever)和克里米亚-刚果出血热(Crimean-Congo hemorrhagic fever)。可以使用本发明靶向的神经病毒性疾病包括脊髓灰质炎、病毒性脑膜炎、病毒性脑炎和狂犬病。

[0501] 4. 寄生虫微生物

[0502] 微生物可以是寄生虫微生物(微生物)。感染可由病原寄生虫微生物引起。

[0503] 可以使用本发明靶向的寄生虫微生物的实例包括原生动物。

[0504] 具体地说,本发明可以靶向以下原生动物组:肉足纲(Sarcodina)(例如阿米巴,例如内阿米巴属(Entamoeba),例如痢疾内阿米巴(Entamoeba histolytica)或迪斯帕内阿米巴(Entamoeba dispar))、鞭毛纲(Mastigophora)(例如鞭毛虫,例如贾第鞭毛虫属(Giardia)和利什曼虫(Leishmania))、纤毛亚门(Ciliophora)(例如纤毛原虫,例如肠袋虫属(Balantidium))、孢子虫纲(Sporozoa)(例如疟原虫和隐孢子虫)以及它们的任何组合。

[0505] 可以使用本发明治疗的寄生虫感染包括疟疾、阿米巴痢疾以及利什曼病(例如皮肤利什曼病、皮肤粘膜利什曼病或内脏利什曼病)。

[0506] 人类/动物宿主或受试者

[0507] 受试者可以是动物或人类受试者。本文中的术语“动物”一般可包括人;然而,在术语“动物”出现在短语“动物或人类受试者”等中的情况下,从上下文应理解尤其是指非人类动物,或提及“人”仅仅是列举动物可以是人的选项以避免疑义。

[0508] 在具体的实施方案中,受试者是人类受试者。人类受试者可以是婴儿或成人受试者。

[0509] 在具体的实施方案中,受试者是脊椎动物受试者。脊椎动物可以属于无颌纲(无颌鱼)、软骨鱼纲(软骨鱼)、硬骨鱼纲(多骨鱼)、两栖纲(两栖动物)、爬行纲(爬行动物)、鸟纲(鸟类)或哺乳纲(哺乳动物)。在具体的实施方案中,受试者是属于哺乳纲或鸟纲的动物受试者。

[0510] 在具体的实施方案中,受试者是家畜物种。家畜物种可以是以下中的一者:

[0511] -共生动物,适应人类小生境(例如犬、猫、豚鼠)

[0512] -为了食物而寻找或饲养的被捕食的动物或农畜(例如牛、绵羊、猪、山羊);以及

[0513] -主要出于拖拉目的的动物(例如马、骆驼、驴)

[0514] 家畜的实例包括(但不限于):羊驼、曲角羚羊、野牛、骆驼、金丝雀、水豚、猫、牛(包括巴厘牛(Bali cattle))、鸡、领西貘、鹿(包括扁角鹿、梅花鹿、白唇鹿以及白尾鹿)、犬、驴、野鸽、鸭、大羚羊、麋鹿、鹧鸪、雪貂、大额牛、山羊、鹅、珍珠鸡、豚鼠、大旋角羚、马、美洲驼、水貂、驼鹿、小鼠、骡、麝牛、鸵鸟、鸚鵡、猪、鸽子、鹌鹑、兔、大鼠(包括大蔗鼠)、驯鹿、大蔗鼠、绵羊、火鸡、水牛、牦牛以及瘤牛。

[0515] 动物/人类宿主或受试者的器官、结构和内部空间

[0516] 本公开的组合物或多组分系统施用的器官不受限制。器官的实例包括皮肤,和呼吸系统、生殖泌尿系统、心血管系统、消化系统、内分泌系统、排泄系统、淋巴系统、免疫系统、体被系统、肌肉系统、神经系统、生殖系统和骨骼系统的器官。

[0517] 心血管系统的器官的实例包括心脏、肺、血液和血管。消化系统的器官的实例唾液腺、食道、胃、肝脏、胆囊、胰腺、肠、结肠、直肠和肛门。内分泌系统的器官的实例包括下丘脑、脑下垂体、松果体或松果腺、甲状腺、甲状旁腺和肾上腺,即肾上腺。排泄系统的器官的实例包括肾、输尿管、膀胱和尿道。淋巴系统的器官的实例包括淋巴和淋巴结和血管。免疫系统的器官的实例包括扁桃体、腺样体、胸腺和脾。

[0518] 体被系统的器官的实例包括哺乳动物的皮肤、毛发和指甲,以及鱼、爬行动物和鸟类的鳞片,和鸟类的羽毛。神经系统的器官的实例包括脑、脊髓和神经。生殖系统的器官的实例包括性器官,例如卵巢、输卵管、子宫、外阴、阴道、精巢、输精管、精囊、前列腺和阴茎。骨骼系统的器官的实例包括骨骼、软骨、韧带和腱。

[0519] 人类受试者的腔包括但不限于口腔、鼻、耳、咽喉、呼吸道、肺、胃肠道、背侧体腔(例如颅腔或椎腔)或腹侧体腔(例如胸腔、腹腔或盆腔)。鼻、口腔、呼吸道和肺的施用途径是本发明的特性特征。

[0520] 表面的体外抗微生物处理

[0521] 本公开的组分和组合物以及从根据本公开产生NO_x的反应放出的气体可以用于在体外施加抗微生物处理。“体外”意指所处理的表面不是活的生物体,即使可能最终打算用于医学应用。

[0522] 这类效用的实例包括用于在使用前对手术器械、皮下注射器针头和其它医疗装置进行消毒以及无论在医院或诊所还是其它任何地方清洁或处理表面以减少或防止病原体传播的方法。

[0523] 其它实例包括用于在装置位于受试者体内之前对以下进行消毒的方法:假体和可植入装置,例如支架(例如冠状动脉支架)、外科螺钉、杆、平板和夹板、整形外科植入物、心脏起搏器、胰岛素输注装置、导管、造口术器具、人工晶状体、耳蜗植入物、电镇痛植入物、可植入避孕工具、神经刺激器、人工心脏瓣膜、电极、静脉滴注和药物递送装置等。

[0524] 必要时,本公开的组分或组合物可以包覆到假体或可植入装置的表面上,借此在产生NO_x的反应中放出的NO可以灌注至其它组织或器官或者在假体或植入的装置附近发挥其它生理作用。

[0525] 用于使假体或可植入装置的表面生物相容的技术是本领域的技术人员众所周知的,包括掺入功能性涂层,例如包含本公开的组分或组合物的涂层。参见例如Gultepe等人, Advanced Drug Delivery Reviews, 2010年3月8日, 62 (3), 第305-315页;以及美国专利 No. 5702754和6270788,以及其中提及的出版物,所有各者的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0526] 对无生命的表面更通用的抗微生物处理的组合物和方法是本领域中众所周知的,不需要在这里作广泛描述。抗细菌组合物用于例如医疗行业、食品行业、肉类加工行业 and 个体用户的私营部门。抗细菌清洁组合物典型地在水性和/或含醇载体中含有一种或多种活性抗菌剂或其组分、表面活性剂和一种或多种其它成分,例如染料、香料、pH调节剂、增稠剂、皮肤调理剂等。广谱杀菌剂或抗微生物组合物旨在降低表面上一系列病原体的病原体

负荷。典型地,组合物是液体(或在使用前从固体预混合物制成液体),该液体在适当地通过添加水对浓度进行所需调整之后,常常借助于布或其它擦拭装置涂抹或喷雾到有待处理的表面上,然后晾干或擦去。处理表面的常规组合物和方法原则上适用于本发明,借此活性抗微生物剂是或包含根据本发明的产生NO_x的组合物或其组分。

[0527] 关于已知的可以结合本发明使用的抗微生物组合物和使用方法的进一步论述和实例,参考例如美国专利No.6,110,908;5,776,430;5,635,462;6,107,261;6,034,133;6,136,771;8,034,844;欧洲专利申请No.EP 0505935;以及PCT专利申请No.WO 98/01110;WO 95/32705;WO 95/09605;和WO 98/55096;内容以引用的方式整体并入本文中。

[0528] 提升人和/或动物幸福的用途

[0529] 除了上文论述的医学用途之外,本公开可用于人类或动物受试者中的非治疗应用。非治疗应用与治疗应用的不同之处在于受试者是健康的,或本申请的目标不是治疗受试者患有的任何确诊的疾病、病症或疾患。

[0530] 非治疗应用可包括旨在提升受试者的幸福或幸福感,或提高受试者的代谢效率或免疫系统活性,使得受试者能够更好地正常活动或抗击未来感染的处理。非治疗应用还包括有助于受试者的认知功能或引起自信和控制的感受的处理。

[0531] 为用于这类非治疗应用,本公开的组合物和组合物可以类似于药物制剂或以非药物方式进行配制。关于类似于药物制剂的制剂的进一步细节,请参见上文标题为“任选的另外的组分”的章节。非药物制剂宜包括食品添加剂、营养药物制剂、食品、饮料和饮料添加剂。适合添加到食品和饮料的制剂宜呈液体或粉末的形式。营养药物制剂宜呈片剂、胶囊或口服可食液体的形式。

[0532] 如上文在标题为“疗法或手术中的用途”的章节中所提及,本公开的医学和/或外科用途可以为患者提供增强幸福或信心方面的间接益处。

[0533] 植物用途

[0534] 已知一氧化氮对活的或死亡的植物的有益作用。本公开包括方法、设备、组合、试剂盒、组合物、用途和从中放出的气体为活的或死亡的植物提供有益的作用的应用。

[0535] 已知的一氧化氮和产生一氧化氮的系统在植物上的用途的实例包括以下:

[0536] 一氧化氮防止或延迟切花和植物枯萎(参见Siegel-Itzkovich,BMJ,1999;319(7205),第274页;又见Mur等人,2013;“Nitric oxide in plants:an assessment of the current state of knowledge”,AoB PLANTS doi:10.1093/aobpla/pls052 (<https://doi.org/10.1093%2Faobpla%2Fpls052>));

[0537] 一氧化氮调节植物-病原体相互作用、促进植物过敏反应、在固氮根瘤中与生物体共栖、侧根和不定根以及根毛的发育以及气孔开放的控制(参见Mur等人,2013;以上引用);

[0538] 一氧化氮在植物中的抗氧化和活性氧反应中的作用(参见Verma等人,2013;“Nitric oxide(NO) counteracts cadmium-induced cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species(ROS) in Brassica juncea:cross-talk between ROS,NO and antioxidant responses”;BioMetals);

[0539] 一氧化氮在植物生长素、细胞分裂素和其它植物激素的信号传导通路中的作用(参见Liu等人,Proceedings of the National Academy of Sciences,2013;110(4),第1548-1553页)。

[0540] 以上引用的每一个出版物的公开内容以引用的方式并入本文中。

[0541] 此外,上文在标题为“疗法或手术中的用途”、“局部抗微生物用途”、“鼻、口腔、呼吸道和肺用途”和“抗微生物用途的目标”的章节中具体描述但不仅仅描述的本公开的产生一氧化氮的系统 and 从中放出的气体的抗微生物作用同等地应用于靶向植物的微生物感染,并且本公开还延伸到这类用途。

[0542] 一氧化氮和产生一氧化氮的系统在植物上的以上已知的用途和所有其它用途在连同使用本公开产生一氧化氮的反应和/或由此产生的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体一起使用时构成了本公开的其它方面。

[0543] 具体地说,所处理的植物可以是农作物或家庭植物,即人培养的植物物种。

[0544] 农作物包括(但不限于)粮食作物(例如谷物、蔬菜和水果)、药物活性成分农作物(例如奎宁)、纤维作物(例如棉花或亚麻)、其它材料作物(例如橡胶和木材)以及花卉作物(例如玫瑰和郁金香)。

[0545] 供人类食品消耗的农作物的其它实例包括(但不限于)产生以下多者的农作物:稻谷、小麦、甘蔗和其它糖料作物、玉蜀黍(玉米)、大豆油、马铃薯、棕榈油、木薯、豆科植物种子、葵花油、菜籽油、芥子油、高粱、粟、落花生、豆、甘薯、香蕉、大豆、棉籽油、花生、花生油、山药、番茄、葡萄、洋葱、苹果、咖啡、芒果、山竹果、番石榴、红辣椒、胡椒、茶叶、黄瓜、橙子、胡桃、杏仁、胡萝卜、萝卜、椰子、柑橘、柠檬、酸橙、草莓和榛子。

附图说明

[0546] 图1示出了在实施例1的不同反应条件中放出的一氧化氮(nmol NO/mg亚硝酸盐)随着时间推移的累积曲线图。

[0547] 图2至16示出了实施例2中所述的多个测试的结果。

[0548] 图17示出了用于测量SIFT-MS的设备的示意图。

[0549] 图18至21示出了实施例3中所述的关于已知的抗生素、羧酸溶液、羧酸-亚硝酸盐溶液和羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液的组合针对脓肿分枝杆菌的抗微生物活性的多个测试的结果。

[0550] 图22示出了实施例4中所述的关于含有柠檬酸、亚硝酸钠和甘露糖醇的溶液针对许多临床分离培养物的最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)的测试的结果。

[0551] 图23示出了实施例5中所述的关于有和没有多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液针对绿脓杆菌的抗微生物活性的测试的结果。

[0552] 图24至27示出了实施例6中所述的关于针对THP-1细胞中结核分枝杆菌HN 878的抗微生物活性的测试的结果。

[0553] 图28示出了实施例7中所述的关于针对MDCK细胞中的H1N1甲型流感病毒的细胞毒性(LDH细胞毒性测定)和抗微生物活性的测试的结果:(a)在MOI=0.002(●)和MOI=0.02(■)下,在一系列稀释度下(横轴是亚硝酸盐摩尔浓度),其中细胞毒性以灰色示出,细胞毒性标度在右侧(在至多且包括0.015M的测量的亚硝酸盐浓度下的细胞毒性≤LDH对照物的1%);和(b)在MOI=0.002和亚硝酸盐浓度0.15M、0.015M和0.0015M下的平板照片,与奥司他韦(oseltamivir) (1μM) 进行比较。前一个句子中叙述的平板的次序与图中平板从左到右

的次序相同(有两个实验,每个相应实验的平板以一个在另一个之上的方式示出)。最右侧的平板对,即紧靠奥司他韦平板对右侧者,是病毒对照物。在每对测试板的下方示出了细胞毒性,为LDH对照物%(在感染后24小时3个LDH测定的平均值)。

[0554] 图29示出了与类似条件下的阿米卡星(amikacin)和阴性对照物(实施例3中所述)相比,亚硝酸钠、使用氢氧化钠缓冲到pH 5.8的柠檬酸和甘露糖醇的酸化溶液杀死脓肿分枝杆菌的有效性的测试结果。

[0555] 图30和31以示意图形式(图30)示出了实施例10中所述的用于治疗人类受试者中的肺感染的本发明的实施方案,和(图31)与吸入气体一氧化氮(图31的左侧)相比,根据本发明产生NO的液体制剂与肺组织之间的接触点(图31的右侧)的视图。

[0556] 图32示出了实施例8的LDH细胞毒性测定的结果(操作1和2)。数据可以表示为两个实验的平均值+标准差(SD)。SD示为灰色误差条。最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设定为100%,所有实例结果均相对于该值。LDH阳性对照物是来自试剂盒的阳性对照物。黑色条柱(孵育2小时)是每种情况下每对条柱的左侧条柱,红色条柱(孵育24小时)是每种情况下每对条柱的右侧条柱。

[0557] 图33示出了在MOI 3.0下实施例8的针对SARS-CoV-2的抗病毒测试(操作1)的结果。在操作1中,使用SARS-CoV-2,在四种感染复数(MOI)下进行一个病毒产率减少测定,感染复数使用接种病毒的反向滴定确认。对于以MOI 3接种的细胞,在滴定之后在病毒对照孔中发现 $2.1 \log_{10}$ TCID₅₀/ml。针对所测试的一些条件,可观察到SARS-CoV-2产率减少。在孵育24小时之后,在最低的三个MOI(即0.3、0.03和0.003)中几乎没有检测到病毒。可能Vero E6细胞上复制24小时不足以获得高水平的子代病毒。数据表示为两次滴定的平均值+标准差(SD)。SD示为误差条。与氯喹(chloroquine)和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0558] 图34示出了(a)在MOI 3.0下和(b)在MOI 0.3下实施例8的针对SARS-CoV-2(操作2)的抗病毒测试的结果。该方法对应于那些MOI下操作1的一部分,例外是制剂是操作2制剂,孵育48小时而不是24小时,以增加子代病毒的水平。数据表示为两次滴定的平均值+标准差(SD)。SD示为误差条。与氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0559] 图35示出了在MOI 3.0下针对实施例9的SARS-CoV的抗病毒测试的结果。在用结晶紫进行细胞单层染色前,用显微镜检查2个平板并针对细胞病变效应(CPE)进行评分。发现这些平板中存在CPE,呈基础单层顶上的细胞碎片形式。示出了用显微镜检查的两个平板的结果。数据是每个条件的单次滴定。对于剩余平板,在结晶紫染色之后,由于细胞单层过密,未能对CPE评分。与细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0560] 实施例

[0561] 提供以下非限制性实施例以进一步例示本发明。

[0562] 用于实施例1和2的材料、设备和方法

[0563] 溶液

[0564] 通过使适当质量溶解于去离子水中来制备0.1M和1M柠檬酸(Health Supplies Limited, Thornton Heath, UK)、0.1M柠檬酸钠(Fisher Scientific, Loughborough, UK)、1M亚硝酸钠(Sigma Aldrich, Dorset, UK)、0.5M和1M山梨糖醇(Special Ingredients,

Chesterfield,UK)、0.5M和1M D-甘露糖醇(Sigma Aldrich,Dorset,UK)、3M氢氧化钠(Fisher Scientific,Loughborough,UK)以及0.1M和1M L-抗坏血酸(ICN Biomedicals公司,Ohio,US)的储备溶液。从Arium Mini实验室水系统(Sartorius,Germany)获得去离子水(18.2M Ω)。

[0565] 通过两种方法制备柠檬酸/柠檬酸盐缓冲溶液:

[0566] 1.使用Sigma Aldrich 2018描述的体积滴定0.1M柠檬酸和0.1M柠檬酸钠的储备溶液(<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>);

[0567] 2.使针对0.1M或1M制剂已知质量的柠檬酸溶解于小体积的去离子水中,然后滴定3M氢氧化钠和去离子水的储备溶液,以实现所需缓冲溶液pH值(pH 3至pH 6.2)。

[0568] 对于方法1,使用抗坏血酸和抗坏血酸钠代替方法1的柠檬酸和柠檬酸钠,类似地制备抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲溶液。

[0569] 通过用多元醇(例如山梨糖醇或甘露糖醇)的储备溶液溶解已知质量的亚硝酸钠来包括多元醇。

[0570] 缓冲溶液和储备液的成分的添加次序不是关键,可以使用任何混合次序。

[0571] 所有标准溶液均在制备48小时内使用。使用溶于去离子水中的邻苯二甲酸盐(pH 4)和磷酸盐(pH 7)片(Fisher Scientific UK有限公司,Leicestershire,UK)制备校准缓冲溶液。

[0572] 选择离子流动管质谱法(Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry,SIFT-MS)启动和验证

[0573] 本报告中描述的所有气体分析都使用Voice200选择离子流动管质谱仪(SIFT-MS)(Syft Technologies有限公司,New Zealand)。该仪器使用氦(BOC,Surrey,UK)作为载气。

[0574] 在分析前,使用简单的启动程序将SIFT-MS准备好以供使用。将仪器退出备用模式,并且进行一系列气压检查以确保毛细管流动在操作的可接受范围内。接着使用含有苯、甲苯、乙苯和二甲苯的制造商的校准气体标准(Syft Technologies有限公司,New Zealand)进行自动验证程序。最终,使用10ppm二氧化氮标准物(Air Products PLC,Surrey,UK)进行内部性能检查。

[0575] NO产生程序

[0576] SIFT-MS设备、反应室和气体通路如图17中所示来设立。

[0577] 不断地用HT1智能温度传感器(SensorPush,New York,US)监测反应室中的温度。反应室是670mL塑料(不含双酚A(不含BPA))夹锁桶,具有硅酮密封(Tesco,Welwyn Garden City,UK),它连接到泵,该泵使湿空气不断地循环通过反应室,经过SIFT-MS入口毛细管。以类似于以下描述的方法,通过将空气泵送通过两个含有去离子水的Dreschel瓶来加湿:Vernon,W.和Whitby,L.(1931)The quantitative humidification of air in laboratory experiments,Trans.Faraday Soc.27,248-255。在使用前使该系统平衡30分钟。开始连续的SIFT-MS扫描,实时检测和定量NO、NO₂和HONO。一旦对这些化合物观察到稳定的基线读数(一致的浓度>2分钟),则将样品放置于反应室中并监测三小时。

[0578] 在SIFT-MS验证之后,被加热到120℃的毛细管入口加长部分经由T形接头连接到反应室的出口,允许SIFT-MS对从反应室流出的气体进行实时取样。

[0579] 通过称取来自RKW-Group (Frankenthal, Germany) 的大约0.3cm×0.3cm梳理非织造的20克/平方米 (20gsm) 聚丙烯筛网在称重舟 (约3mg) 中来制备样品。在添加10μL测试或对照溶液液滴到筛网中心上 (确保液滴浸透筛网) 之后再次称量。最终, 将称重舟中加载的筛网放置于反应室中并将最终10μL缓冲溶液液滴吸移到筛网中心上。迅速密封反应室并在SIFT-MS界面上瞬间观察到含氮物种的产生。

[0580] 对产生的气体的分析

[0581] 使用SIFT-MS的选择离子模式分析所产生的气体, 并且各批次依次进行扫描, 每次持续1000秒。重复扫描以下产物质量: 亚硝酸30m/z, 亚硝酸48m/z, 二氧化氮46m/z, 以及一氧化氮30m/z。使用所有三种阳性前体离子实现这些测量: 水合氢离子 (H_3O^+)、亚硝离子 (NO^+) 和二氧化基离子 (O_2^+)。空气以660ml/min流过反应室, 在2.7ml/min的流速下SIFT-MS入口对该气流进行取样。

[0582] 所有实施例的pH值测量

[0583] 所有pH值测量均使用Five Easy pH计 (Mettler Toledo, Switzerland), 其具有玻璃电极LE438探头。用第二pH计确保该电极的准确性: 手提式205探头 (Testo, Alton, US)。新鲜校准缓冲溶液用于每天校准pH计。

[0584] 实施例1

[0585] 使用1M/c.pH3柠檬酸, 在有和没有1M多元醇下接触含有吸入的1M亚硝酸钠的筛网产生一氧化氮

[0586] SIFT-MS设备、反应室和气体通路如上所述和图17中所示来设立。

[0587] 分别含有1M甘露糖醇和1M山梨糖醇的1M亚硝酸钠的两个测试溶液如上所述吸入筛网中以制造两个测试筛网。

[0588] 无多元醇的1M亚硝酸钠的对照溶液如上所述吸入筛网中以制造对照筛网。

[0589] 在每个测试中将通过上述两种方法1和2中的任一者制备并且pH值为约3的1M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的缓冲溶液添加到测试和对照筛网每一者以如上所述引发气体产生。

[0590] 图1中示出了结果。

[0591] 数据表明, 与不存在多元醇相比, 当筛网还含有1M甘露糖醇或1M山梨糖醇 (甘露糖醇作用比山梨糖醇大) 时, 与1M/c.pH 3柠檬酸接触的吸入1M亚硝酸钠的筛网产生显著更大量的一氧化氮。

[0592] 实施例2

[0593] 研究不同的羧酸、酸浓度、pH值和多元醇对一氧化氮产生的影响

[0594] 如上制备样品, 有机酸、pH值和多元醇变化如下:

[0595]

实验	每次测试操作中吸入筛网的测试溶液	对照操作中吸入筛网的对照溶液	添加到筛网的缓冲液(在指示替代缓冲液的情况下, 它们用于单独操作中, 如相关图中所报告)
A (图 2)	1 M 亚硝酸钠	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3)
			1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH 约 3)
B (图 3)	含有 1 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3)
C (图 4)	含有 1 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH 约 3)
D (图 5)	含有 0.5 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3)
E (图 6)	含有 0.5 M 山梨糖醇的	-	1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH

[0596]

	1 M 亚硝酸钠		约 3)
	含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠		
F (图 7)	含有 1 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3) 0.5 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 约 3)
G (图 8)	含有 1 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3) 0.5 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐 (pH 约 3)
H (图 9)	含有 1 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3) 1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH 约 3)
I (图 10)	含有 0.5 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 木糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 0.5 M 阿糖醇的 1 M 亚硝酸钠	-	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3) 1 M 抗坏血酸/抗坏血酸盐(pH 约 3)
J (图 11)	含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 3)
K (图 12)	含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 4.8)
L (图 13)	含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	0.5 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 6.2)
M (图 14)	含有 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 2 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 2)
N (图 15)	含有 1 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠 含有 1 M 山梨糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝 酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 约 2)

[0597]	含有 1 M 甘露糖醇和 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠		
	含有 1 M 山梨糖醇和 1 M 丙三醇的 1 M 亚硝酸钠		
O (图 16)	含有 0.5 M 甘露糖醇的 1 M 亚硝酸钠	1 M 亚硝酸钠	1 M 柠檬酸/柠檬酸盐(pH 5.8)

[0598] SIFT-MS设备、反应室和气体通路如上所述和图17中所示来设立。

[0599] 如上所述的测试溶液如上所述吸入筛网中以制造测试筛网。

[0600] 在使用的情况下,无多元醇的1M亚硝酸钠的对照溶液如上所述吸入筛网中以制造对照筛网。

[0601] 在每个测试中将通过上述两种方法1和2中的任一者制备并且具有上述pH值的如上所述的缓冲溶液或每种缓冲溶液添加到测试和对照筛网(如果使用)以如上所述引发气体产生。

[0602] 图2至13中示出了结果。图中的“正常”是指不存在多元醇。

[0603] 图2比较在多元醇不存在的情况下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液(pH值为大约3)产生的NO放出速率。图清楚地表明,与抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液相比,柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液初始的突释更高,并且气体放出持续时间更长,水平更高。柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液迹线在约55000ppb下达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液迹线在约28000ppb下达到峰值。

[0604] 图3涉及有和没有多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和亚硝酸盐系统。多元醇浓度是1M。与无多元醇相比,在多元醇存在下,气体放出速率、初始突释和后释随时间而改变。木糖醇和甘露糖醇产生最高峰值,接着是山梨糖醇,然后是无多元醇,然后是阿糖醇。在500-1000s区域,木糖醇和阿糖醇具有最高输出,接着是甘露糖醇、山梨糖醇,然后是无多元醇。峰值突释甘露糖醇=木糖醇(约64000ppb)>山梨糖醇(约53000ppb)>无多元醇(约50000ppb)>阿糖醇(约40000ppb)。

[0605] 图4涉及有和没有多元醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液和亚硝酸盐系统。多元醇浓度是1M。峰值突释甘露糖醇(约40000ppb)>阿糖醇(约35000ppb)>木糖醇=无多元醇(约30000ppb)>山梨糖醇(约23000ppb),即,与图3的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲系统不同的顺序。

[0606] 图5涉及有和没有多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和亚硝酸盐系统(“无多元醇”线,峰值突释近乎与甘露糖醇线相同,为了清楚已经省去)。多元醇浓度是0.5M。峰值突释阿糖醇(约76000ppb)>>无多元醇=甘露糖醇(约48000ppb)>木糖醇=山梨糖醇(约40000ppb)。将看到,这是与类似的1M多元醇柠檬酸/柠檬酸盐缓冲系统(图3)不同的顺序,表明了多元醇的影响取决于多元醇的浓度。

[0607] 图6涉及有和没有多元醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液和亚硝酸盐系统(“无多元醇”线,峰值突释近乎与山梨糖醇线相同,为了清楚已经省去)。多元醇浓度是0.5M。峰值突释木糖醇(约50000ppb)>甘露糖醇(约38000ppb)>山梨糖醇=无多元醇(约30000ppb)>阿糖醇(约23000ppb)。再次,观察到与类似的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(0.5M多元醇)和抗坏血酸/抗坏血酸盐(1M多元醇)系统(分别是图5和4)相比顺序不同。因此,证实多元醇的影响取

决于多元醇的化学/立体化学和多元醇的摩尔浓度。

[0608] 图7和8比较在柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液和存在多元醇(0.5M)下的NO放出速率。这些图突出了在图2至6中观察到的一些差异。图7中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液迹线在约76000ppb下达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液迹线在约22000ppb下达到峰值。图8中的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液迹线在约48000ppb下达到峰值,而抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液迹线在约38000ppb下达到峰值。

[0609] 图9比较1M多元醇浓度的累积输出。抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液在比如3000s处的差异很小,次序是甘露糖醇>山梨糖醇=阿糖醇>木糖醇。对于柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,在3000s处,次序是木糖醇>阿糖醇>甘露糖醇>山梨糖醇>无多元醇。数据显示,例如在无多元醇(曲线E,在3000s之后,获得每毫克亚硝酸盐约10000nmol的累积一氧化氮放出,在此时,甚至仍然在上升)与木糖醇(曲线A,获得每毫克亚硝酸盐约20000nmol的累积一氧化氮放出,仍然还在上升)之间,一氧化氮的输出可以增加高达约100%,甚至超过。

[0610] 图10比较0.5M多元醇浓度的累积输出。对于柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液,在3000s处,次序是阿糖醇>甘露糖醇=木糖醇>山梨糖醇>无多元醇(柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液的“无多元醇”线,位于山梨糖醇线下方,为了清楚已经省去)。对于抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液,在3000s处,次序是木糖醇>甘露糖醇>山梨糖醇>阿糖醇。再次,与1M多元醇相比,该次序是不同的(图9)。

[0611] 图11至13比较有和无甘露糖醇(0.5M)下以及在不同pH值下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液1M和亚硝酸钠(1M)的累积曲线图。随着pH值增加,差异变得更小,在pH 6.2下,差异消失。因此,从这些实验中看到,多元醇的影响还取决于pH值。

[0612] 图14示出了1M亚硝酸钠溶液中有和没有丙三醇(1M和2M)存在下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH值大约为2)的累积NO(nmol/cm²筛网面积)输出。在开始2000s内,1M和2M丙三醇的NO输出略微低于无多元醇存在时。在更长的时间,含有丙三醇的制剂具有更大的输出,2M丙三醇具有更大的输出。

[0613] 图15示出亚硝酸钠溶液中有或没有多元醇时柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH值大约为2)和1M亚硝酸钠溶液的累积NO(nmol/cm²筛网面积)输出。曲线图表明与不存在丙三醇相比,甘露糖醇/亚硝酸盐溶液中包括丙三醇会减少输出。然而,意外地,不同于甘露糖醇的情况,与不存在丙三醇时的输出相比,山梨糖醇/亚硝酸盐溶液中包括丙三醇增强NO输出。

[0614] 当使用丙三醇时,首先制造1M丙三醇溶液并用于制造1M山梨糖醇或1M甘露糖醇溶液,又用于制造1M亚硝酸盐溶液。

[0615] 图16示出亚硝酸钠(1M)溶液中有和没有甘露糖醇(0.5M)存在下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液(1M,pH 5.8)的累积NO输出(mol/mg亚硝酸盐)。曲线图表明在大约2000s反应时间之后包括多元醇会产生更大的NO输出。

[0616] 图16显示,在超过约5、尤其超过约5.5的生理上重要的pH水平下,与没有甘露糖醇的相同系统相比,甘露糖醇增强一氧化氮的产生,在10000s(167分钟)之后提供每毫克亚硝酸盐1400nmol NO的累积水平。

[0617] 实施例3

[0618] 在多种有机酸和亚硝酸盐溶液下有和没有多元醇时针对脓肿分枝杆菌培养物的活性

[0619] 材料

[0620] 将4.7g Middlebrook 7H9肉汤基础(Sigma-Aldrich)用900ml蒸馏水复原,并在121℃下高压釜处理15分钟。将Middlebrook ADC生长补充剂(Sigma-Aldrich)添加到经过高压釜处理的7H9溶液(每450ml为50ml,总共添加100ml)。

[0621] 1M亚硝酸钠(Emsure):在干净的螺旋盖玻璃瓶中使6.9g亚硝酸钠粉末溶解于100ml蒸馏水中。将混合物在121℃下高压釜处理15分钟。

[0622] 1M柠檬酸(Sigma-Aldrich):在干净的螺旋盖玻璃瓶中使19.2g柠檬酸粉末溶解于100ml蒸馏水中。将混合物在121℃下高压釜处理15分钟。

[0623] 1M抗坏血酸(Sigma-Aldrich):将17.6g抗坏血酸粉末添加到无菌玻璃瓶中。彻底溶解于100ml无菌蒸馏水中。由于半衰期短,所以使用严格的无菌技术每天制备。由于其固有的不稳定性,其不进行高压釜处理,但在使用前经0.2μ过滤器过滤。

[0624] 1M二水合柠檬酸三钠(Sigma-Aldrich):在干净的螺旋盖玻璃瓶中使29.4g柠檬酸钠粉末溶解于100ml蒸馏水中。将混合物在121℃下高压釜处理15分钟。

[0625] 1M L-抗坏血酸钠盐(Acros Organics):在干净的螺旋盖玻璃瓶中使19.8g抗坏血酸钠粉末溶解于100ml蒸馏水中。将混合物在121℃下高压釜处理15分钟。

[0626] 对于利用多元醇的实验,使用D-甘露糖醇(Sigma-Aldrich)。将多元醇添加到上述亚硝酸钠储备溶液中以形成以下储备溶液:

[0627] 储备溶液A-1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇

[0628] 储备溶液B-1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇

[0629] 还制备1.5M柠檬酸的储备溶液。

[0630] 针对稀释因子来调整每种组分的摩尔浓度以确保每一种实验溶液的最终摩尔浓度正确。

[0631] 脓肿分枝杆菌(MAB)

[0632] 实验室参考菌株脓肿分枝杆菌ATCC 19977lux用于本实施例中的所有实验条件。

[0633] 方法

[0634] 将50ml falcon管标记为管T(测试悬浮液)、管A(酸对照物)和管C(对照物)。

[0635] 将8ml 7H9+ADC补充物添加到每个管中。然后添加100μl MAB悬浮液(先前生长至大约3-4倍麦氏标准(McFarland standard))。读取MAB悬浮液的基线相对光单位(RLU)。通过涡动来混合内含物。

[0636] 当不存在多元醇(甘露糖醇)时的管内含物

[0637] 管T:将1ml亚硝酸钠(1M)溶液添加到管中,随即添加1ml柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M),得到10ml中0.1M的最终浓度。通过缓缓倒转将内含物混合并在37℃下孵育24小时。

[0638] 管A:将1ml柠檬酸溶液(1M)或抗坏血酸溶液(1M)添加到管中,并添加1ml无菌蒸馏水,产生10ml最终体积,测试0.1M浓度酸。通过缓缓倒转将内含物混合并在37℃下孵育24小时。

[0639] 管C:将2ml无菌蒸馏水添加到管中,制造10ml总体积。这是评定最佳条件下生长的对照物。通过缓缓倒转将内含物混合并在37℃下孵育24小时。

[0640] 当存在多元醇(甘露糖醇)时的管T内含物

[0641] 当存在甘露糖醇时管T内含物如下：

[0642] 1. 管T: 1ml 亚硝酸钠 (1M) 和甘露糖醇 (0.5M) 和1ml 柠檬酸 (1M)

[0643] 2. 管T: 1ml 亚硝酸钠 (1.5M) 和甘露糖醇 (0.5M) 和1ml 柠檬酸 (1M)

[0644] 3. 管T: 1ml 亚硝酸钠 (1M) 和甘露糖醇 (0.5M) 和1ml 柠檬酸 (1.5M)

[0645] 在孵育30分钟、60分钟和24小时时测量RLU, 以评定T、A和C溶液的活性。

[0646] 在孵育24小时后, 将管C、管A和管T涂铺到Columbia血琼脂 (VWR Chemicals) 上。将平板在37℃下孵育72小时。在孵育第3天、第5天和第7天读取菌落形成单位 (CFU)。所有的工作均在CL2实验室设施内的CL2生物安全柜中进行。

[0647] 图18至21中示出了结果。

[0648] 图18显示, 在5和5.5的pH值下7天之后0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液 (管T) 有效消除脓肿分枝杆菌培养物, 并与6.0、6.5、7.0和7.4的pH值下仅0.1M柠檬酸的溶液 (管A) 相比, 减少脓肿分枝杆菌培养物。图18还显示, 在5.0、5.5和6.0的pH值下7天之后0.1M抗坏血酸和0.1M亚硝酸盐的溶液 (管T) 有效消除脓肿分枝杆菌培养物, 并与6.5、7.0和7.4的pH值下仅抗坏血酸的溶液 (管A) 相比, 减少脓肿分枝杆菌培养物。

[0649] 图19a) 显示, 在孵育三天之后0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效减少脓肿分枝杆菌培养物的CFU, 并且在孵育三天之后具有0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效地几乎完全消除脓肿分枝杆菌培养物。图19b) 显示, 在孵育五天之后没有甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效维持减少的脓肿分枝杆菌CFU。该图还显示, 在孵育五天之后具有0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效减少脓肿分枝杆菌培养物的CFU。

[0650] 图20a) 显示, 在孵育三天之后0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效减少脓肿分枝杆菌培养物的CFU, 并且在孵育三天之后具有0.05M甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效消除脓肿分枝杆菌培养物。图20b) 显示, 在孵育五天之后没有甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效维持减少的脓肿分枝杆菌CFU。该图还显示, 在孵育五天之后具有0.05M甘露糖醇的0.15M柠檬酸和0.1M亚硝酸盐的溶液有效消除脓肿分枝杆菌培养物。

[0651] 图21显示, 在孵育三天之后0.1M柠檬酸和0.15M亚硝酸盐的溶液有效减少脓肿分枝杆菌培养物的CFU, 并且在孵育5天之后维持脓肿分枝杆菌培养物的CFU的减少。该图还显示, 在孵育三天和五天之后具有0.05M甘露糖醇的0.1M柠檬酸和0.15M亚硝酸盐的溶液有效消除脓肿分枝杆菌培养物。

[0652] 实施例4

[0653] 在一系列临床分离培养物中羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液针对脓肿分枝杆菌 (Mab) 和结核分枝杆菌 (Mtb) 的最低抑菌浓度 (MIC)

[0654] 健康志愿者

[0655] 从健康志愿者获取外周血样品, 志愿者提供书面知情同意书 (伦理批准参考REC No.12/WA/0148)。

[0656] 分枝杆菌菌株

[0657] 脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977) 和结核分枝杆菌 (H37RV) 菌株均含有细菌荧光素酶 (lux) 基因盒 (luxCDABE), 该盒能够测量相对光单位 (RLU) 以及对细菌存活进行常规菌落形

成单位 (CFU) 测量。

[0658] 通用试剂

	参考	供应商
24 孔细胞培养簇	3526	Costar Corning, USA
CD 14 微珠, 人	130-150-201	Miltenyi Biotec, UK
柠檬酸	791725	Sigma, UK
[0659] Columbia 血琼脂平板	100253ZF	vWR, UK
癸醛	D7384	Sigma, UK
达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco ' s Modified Eagle Medium)-高葡萄糖	D6429	Sigma, UK
FLUOstar Omega		BMG Labtech, UK
胎牛血清	P30-3702	Pan-Biotech, UK
GloMax-96 光度计		Promega, UK
甘露糖醇	M4125	Sigma, UK
Middlebrook 7H11 琼脂平板	PP4080	E&O Labs, UK
Middlebrook 7H9 肉汤	M0178	Sigma, UK
脓肿分枝杆菌	19977	ATCC
[0660] 结核分枝杆菌	H37RV	ATCC
青霉素链霉素	P0781	Sigma, UK
重组人 GM-CSF	300-03	PeproTech EC, UK
重组人 IFN γ	300-02	PeproTech EC, UK
亚硝酸钠	1.06549.0500	Merck, Germany

[0661] 处理条件

[0662] 治疗1: 柠檬酸0.15M、亚硝酸钠0.1M和甘露糖醇0.05M

[0663] 治疗2: 柠檬酸0.1M、亚硝酸钠0.15M和甘露糖醇0.05M

[0664] 肉汤微量稀释最低抑菌浓度 (MIC)

[0665] 根据临床和实验室标准协会 (the Clinical and Laboratory Standards Institute) 关于抗微生物敏感性测试的指南 (M07-A9) 确定每种处理针对脓肿分枝杆菌和结核分枝杆菌的MIC。在平板上对每种处理进行二倍稀释, 并在37℃下孵育平板, 并在第3天和第7天针对Mab读取, 并在第14和第21天针对Mtb读取。一式两份进行测试。

[0666] 所有的工作均在CL2实验室设施内的CL2生物安全柜中进行。

[0667] 发现1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液针对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度是4.7mM。还发现1.5M柠檬酸、1M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液针对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度是2.3mM。

[0668] 发现1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液针对脓肿分枝杆菌的最低抑菌浓度是3.1mM。还发现1M柠檬酸、1.5M亚硝酸钠和0.5M甘露糖醇溶液针对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度是1.6mM。

[0669] 还通过肉汤微量稀释使用来自Floto Laboratory (Cambridge University, UK) (<https://www.flotolab.com/>) 脓肿分枝杆菌临床分离物文库的编号570、571、573、575、578、579、580、581、582、583、584、585、589、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、616、617、619、812、825、829、839、845、848、853、857、858、873、894、898、909、919、928、932、942、944、955、956、959、963、964、965、968、975、980、982、985、993、995、1000、1001、1007、1011、1017、1023、1024、1026、1027、1042、1043、1045、1047、1049、1054、1063、1066、1067、1070、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1082、1086、1094、1096、1101、1103、1104和1106的分离物确定最低抑菌浓度(MIC)。一式两份评定每种单独分离物。

[0670] 图22a)和b)中示出了临床分离物上测试的结果。图显示在孵育分离物三天、四天和五天之后一式两份读取的一氧化氮针对脓肿分枝杆菌的MIC。还在孵育第7天读取平板,但与第5天相比,没有看到差异。实验室菌株ATCC 19977lux用作两个实验中的对照物并显示与临床分离物的比较结果。

[0671] 图22显示柠檬酸-亚硝酸盐-甘露糖醇溶液在广泛临床分离物中具有影响。0.1M柠檬酸、0.15M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇溶液对大多数临床分离物的最低抑菌浓度在0.02M内(图22a),并且0.15M柠檬酸、0.1M亚硝酸盐和0.05M甘露糖醇溶液对大多数临床分离物的最低抑菌浓度在0.04M内(图22b)。

[0672] 在两个图中,在不同的天数,某些样品上的MIC不同。那些样品是在分离物样品的标识码上方显示超过一个点的样品。一般地说,在那种情况下,与较低MIC相比,在更晚的孵育天数,观察到较高MIC。总的说来,与较低柠檬酸(0.1M)和较高亚硝酸钠(0.15M)组合(图22(a))比与较高柠檬酸(0.15M)和较低亚硝酸钠(0.1M)组合(图22(b))更有效。

[0673] 图29中示出了显示羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液体外杀死脓肿分枝杆菌的另外的数据。在该图中,证实了在类似的条件下历经24小时时期,亚硝酸钠、使用氢氧化钠溶液缓冲到pH 5.8的柠檬酸和甘露糖醇的水性制剂与阿米卡星(amikacin)和阴性对照物相比杀死脓肿分枝杆菌的有效性。

[0674] 实施例5

[0675] 有和没有多元醇的羧酸-亚硝酸盐溶液针对绿脓杆菌的抗微生物活性

[0676] 设备和介质

[0677] UKAS校准吸移管(100-1000μL范围) - **Proline®** Plus

[0678] UKAS校准多路吸移管(P300和P20) - **Gilson®**, UK

[0679] Universal管-SLS, UK

[0680] 校准天平-HR-100A

[0681] 微生物培养箱-Heratherm™, ThermoFisher Scientific, UK

- [0682] 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) - Southern Group Laboratories, UK
- [0683] 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) - **Acumedia®**, SLS, UK
- [0684] 麦芽琼脂 - **Acumedia®**, **Acumedia®**, SLS, UK
- [0685] 脑心浸液肉汤 (BHIB) - **Acumedia®**, SLS, UK
- [0686] 沙氏葡萄糖肉汤 (Sabouraud Dextrose Broth, SDB) - **Acumedia®**, SLS, UK Dey-Engley中和剂 (DE-N) - **Acumedia®**, SLS, UK
- [0687] 柠檬酸-Sigma, UK
- [0688] 亚硝酸钠-Sigma, UK 甘露糖醇-Sigma, UK
- [0689] 山梨糖醇-Sigma, UK
- [0690] 测试微生物
- [0691] 绿脓杆菌NCTC 13618-从囊肿性纤维化患者分离
- [0692] 制剂
- | | | | | |
|--------|-------|----|------------|-------------|
| | 制剂 1 | 液体 | 柠檬酸 pH 5.2 | 亚硝酸钠 |
| | 制剂 2 | 液体 | 柠檬酸 pH 6.0 | 亚硝酸钠 |
| | 制剂 3 | 液体 | 柠檬酸 pH 5.2 | 具有甘露糖醇的亚硝酸钠 |
| [0693] | 制剂 4 | 液体 | 柠檬酸 pH 6.0 | 具有甘露糖醇的亚硝酸钠 |
| | 制剂 5 | 液体 | 柠檬酸 pH 5.2 | 具有山梨糖醇的亚硝酸钠 |
| | 制剂 6 | 液体 | 柠檬酸 pH 6.0 | 具有山梨糖醇的亚硝酸钠 |
| | 阳性对照物 | 液体 | N/A | N/A |
| [0694] | 阴性对照物 | 液体 | N/A | N/A |
- [0695] 浓度1-1M柠檬酸加1M亚硝酸钠(有或没有0.5M多元醇)
- [0696] 浓度2-0.5M柠檬酸加1M亚硝酸钠(有或没有0.5M多元醇)
- [0697] 浓度3-0.5M柠檬酸加0.5M亚硝酸钠(有或没有0.5M多元醇)
- [0698] Dey-Engley中和剂验证
- [0699] 从胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 收获绿脓杆菌的二十四小时培养物并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7 \text{ CFU mL}^{-1}$ 悬浮液。其在脑心浸液肉汤 (BHIB) 中进一步稀释, 以制备 $1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 工作悬浮液。
- [0700] 通过连续稀释和涂铺确认起始接种物。使用对照物 (9mL 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 和1mL接种物)、毒性 (9mL Dey-Engley中和剂 (DE-N) 和1mL接种物) 和中和剂功效 (8mL 中和剂、1mL测试的剂和1mL接种物) 样品进行中和剂验证。在处理5分钟后, 从每个管除去200μL悬浮液, 连续稀释并且涂铺100μL到TSA上。将琼脂平板在 $37 \pm 2^\circ \text{C}$ 下孵育18-24小时。
- [0701] 针对浮游生物的抗微生物功效
- [0702] 从TSA收获绿脓杆菌的二十四小时培养物并用于制备 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7 \text{ CFU mL}^{-1}$ 悬浮液。其在BHIB中进一步稀释, 以制备 $1 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 工作悬浮液。通用管填充了8mL

细菌溶液。

[0703] 将一毫升柠檬酸溶液和1mL亚硝酸钠溶液添加到每种测试的剂中,得到如上所述的所需浓度。将溶液在 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下孵育24小时。在孵育期后,从每个管取出1mL并转移到含有9mL中和剂的管中。使用连续稀释和平板计数定量活生物体。

[0704] 图23中示出了结果。

[0705] 数据显示以下针对假单胞菌属的抗微生物有效性:

[0706] -与亚硝酸盐(1M)混合的柠檬酸(1M),有和没有多元醇(0.5M) (“浓度1”);

[0707] -与亚硝酸盐(1M)混合的柠檬酸(0.5M),有和没有多元醇(0.5M) (“浓度2”);以及

[0708] -与亚硝酸盐(0.5M)混合的柠檬酸(1M),有和没有多元醇(0.5M) (“浓度3”)。

[0709] 柠檬酸溶液在pH 5.2(制剂1、3和5)和6.0(制剂2、4和6)下。制剂1和2不含多元醇;制剂3和4包括甘露糖醇;并且制剂5和6含有山梨糖醇。

[0710] 所有制剂在pH 5.2下均显示良好功效。在pH 6下,包含甘露糖醇的制剂略微更有效。

[0711] 实施例6

[0712] 评估包括亚硝酸盐有机酸和多元醇的制剂针对THP-1细胞中的结核分枝杆菌HN 878的功效。

[0713] 制剂

[0714] 如下表所陈述制备制剂。在制备方法陈述为“浓缩”,在样品参考中用后缀FC表示的情况下,这意指制剂最初被制成含有所有三种成分亚硝酸钠(0.75M)、多元醇(0.25M)和酸(0.5M)的浓缩预混合物,然后用蒸馏水稀释,达到如表中所述的每一者所需的浓度。在制备方法陈述为“稀释”,在样品参考中用后缀FD表示的情况下,这意指制剂最初被制成含有最初所需浓度的所有三种成分,即亚硝酸钠(0.15M)、多元醇(0.05M)和酸(0.1M)的预混合物,然后用蒸馏水稀释,达到如表中所述的每一者所需的浓度。

[0715] 在每种制剂内,通过连续稀释制备一系列浓度的亚硝酸钠,即 $16\mu\text{g/ml}$ 、 $8\mu\text{g/ml}$ 、 $4\mu\text{g/ml}$ 、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 、 $0.25\mu\text{g/ml}$ 和 $0.125\mu\text{g/ml}$,用于针对结核分枝杆菌HN878的体外抑菌测定。

[0716]		样品参考	制备方法	测试混合物(稀释后的最终摩尔浓度)		
				亚硝酸钠	多元醇	酸
	制剂 1	30RESP001FC	浓缩	亚硝酸钠 0.15 M	甘露糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M
		30RESP001FD	稀释	亚硝酸钠 0.15 M	甘露糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M
	制剂 2	30RESP002FC	浓缩	亚硝酸钠 0.15 M	乳糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M

[0717]		30RESP002FD	稀释	亚硝酸钠 0.15 M	乳糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M
	制剂 3	30RESP003FC	浓缩	亚硝酸钠 0.1 M	甘露糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M
		30RESP003FD	稀释	亚硝酸钠 0.1 M	甘露糖醇 0.05 M	柠檬酸/柠檬 酸盐 0.1 M
	制剂 4	30RESP004FC	浓缩	亚硝酸钠 0.1 M	甘露糖醇 0.05 M	抗坏血酸/抗 坏血酸盐 0.1 M
		30RESP004FD	稀释	亚硝酸钠 0.1 M	甘露糖醇 0.05 M	抗坏血酸/抗 坏血酸盐 0.1 M

[0718] 使用THP-1巨噬细胞(1)化合物筛查测定进行MIC巨噬细胞测试。

[0719] 巨噬细胞制备和培养:将THP-1细胞扩增2周。此后,使THP-1细胞悬浮在巨噬细胞的完全DMEM培养基中,浓度为 5×10^5 个细胞/毫升。将细胞接种到24孔组织培养板中,每孔2mL(每孔 1×10^6)。一个24孔细胞板允许一式三份测试一系列7种药物浓度加未处理的对照物。除了药物测定板之外,接种一个额外的平板(或至少3个另外的孔),用于测定感染当天的细菌吸收。将细胞在湿润室中在37℃下在5% CO₂下孵育。在3天测定期间DMEM无抗生素/抗真菌剂完全培养基未变化。

[0720] 巨噬细胞的完全DMEM培养基:

[0721] 达尔伯克改良伊格尔培养基(Cellgro 15-017-cv),补充:热失活胎牛血清(Atlas Biologicals,Fort Collins,CO,F-0500-A)(10%)

[0722] L929条件培养基(10%)

[0723] L-谷氨酰胺(Sigma G-7513)(2mM)

[0724] HEPES缓冲液(Sigma H-0887)(10mM) 抗生素/抗真菌剂(Sigma A-9909)(1X)

[0725] MEM非必需氨基酸(Sigma M-7145)(1X)

[0726] 2-巯基乙醇(Sigma M-6250)(50nM)

[0727] L-929条件性培养基:

[0728] 将来自ATCC的L-929(CCL-1)细胞于55mL DMEM+10%胎牛血清中以 4.7×10^5 个细胞接种于75cm²烧瓶。对于THP-1细胞,使细胞生长3天。第3天,收集上清液并通过0.45μm过滤器过滤,等分,并冷冻在-20℃下。无细胞滤液用于DMEM培养基中进行THP-1感染。

[0729] THP-1细胞感染:

[0730] 第0天,从细胞去除培养基并替换为0.2ml含有结核分枝杆菌HN878的无抗生素/抗真菌剂DMEM,MOI为1个巨噬细胞对10个细菌的比率。将组织培养板放置于密闭的Ziploc袋内,以运输回到孵育箱。一旦在孵育箱内,则将袋拉开拉链。将细胞与细菌一起孵育2小时。在感染之后,去除附着在细胞外的细菌,将每个孔用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤一次,并添加2mL具有多种药物浓度的无抗生素/抗真菌剂完全DMEM培养基。为了制备药物浓度,在其次管中通过将10ml先前悬浮液添加到10ml完全培养基加血清进行2倍连续稀释。使组织培养板回到孵育箱中,处于37℃+5% CO₂下(药物保持在孔中3天)。在孔中一式三份测试每种药物浓度。

[0731] 在感染之后2小时、1天、2天和5天涂铺细胞裂解产物和评估THP-1细胞的细胞活力。从所有孔中去除组织培养基,并用1ml PBS洗涤细胞两次。然后,将1ml无菌重蒸馏水+0.05% Tween-80添加到每个孔中;细胞置于室温下5-10分钟。在24孔组织培养板中将细胞裂解产物在无菌盐水中1:10连续稀释。通过1/1,000稀释步骤将稀释的细胞裂解产物涂铺到7H11/OADC琼脂上。(细胞的每个24孔TC板需要四个24孔TC板来进行连续稀释,和24个琼脂‘四边形’板)。将平板在32℃下孵育30天并计数菌落,确定CFU/ml。

[0732] 结果:

[0733] 体外THP-1HN878光密度结果

[0734] 最低抑菌浓度(MIC),其报告为抑制细菌的最稀组合物(即,在表示为16μg/ml、8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml的规模上具体制剂的最大稀释水平)

[0735]	化合物	MIC (μg/ml)	MIC	MIC	MIC
		第 0 天	(μg/ml) 第 1 天	(μg/ml) 第 2 天	(μg/ml) 第 5 天
	制剂 1 (30RESP001FC) 浓缩	16	16	16	16
	制剂 1 (30RESP001FD) 稀释	16	16	16	16
	制剂 2 (30RESP002FC) 浓缩	8	8	8	16
[0736]	制剂 2 (30RESP002FD) 稀释	16	8	16	16
	制剂 3 (30RESP003FC) 浓缩	8	8	8	8
	制剂 3 (30RESP003FD) 稀释	8	16	16	16
	制剂 4 (30RESP004FC) 浓缩	4	4	4	0.125
	制剂 4 (30RESP004FD) 稀释	16	16	0.25	0.25

[0737] 图24至27中示出了结果。

[0738] 图24:在THP-1细胞中评估30RESP001FC和FD(浓缩和稀释)针对结核分枝杆菌HN878的功效。在THP-1巨噬细胞中评估制剂30RESP001FC(浓缩)(A)和30RESP001FD(稀释)(B)在感染和用16μg/ml(▲)、8μg/ml(▼)、4μg/ml(◇)、2μg/ml(○)、1μg/ml(□)、0.5μg/ml(◆)、0.25μg/ml(▲)和0.125μg/ml(▼)处理之后2小时(第0天)、第1天、第2天和第5天后在细胞内杀死结核分枝杆菌HN878(■)的功效。在图24中的每个曲线图中,分别用16μg/ml和8μg/ml处理的▲和▼曲线可不同于分别用0.25μg/ml和0.125μg/ml处理的▲和▼曲线,因为用16μg/ml和8μg/ml处理更有效。换句话说,用16μg/ml和8μg/ml处理的曲线显示比用

0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理显著更低的CFU值,尤其是第5天。类似地,用1 μ g/ml处理的□曲线容易不同于无处理的■曲线,因为1 μ g/ml下的处理更有效。无处理的■曲线的CFU值在上升,在第1天之后保持超过 1×10^4 。

[0739] 在以上MIC表中和图24中提及的描述为“16 μ g/ml”的30RESP001FC和FD组合物包含0.15M亚硝酸钠、0.05M甘露糖醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后最终摩尔浓度),其中8 μ g/ml、4 μ g/ml、2 μ g/ml、1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml组合物每一者分别以所述次序16 μ g/ml至0.125 μ g/ml对前一组合物稀释50%(即,浓度减半)。

[0740] THP-1巨噬细胞以MOI 1:10感染结核分枝杆菌,并在感染之后2小时(第0天)、第1天、第2天和第5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)确定细胞内细菌数目。所示值为来自一个独立实验的平均值 $\pm$ SD。具体地说,在用16 μ g/ml和8 μ g/ml 30RESP001FC和FD(浓缩和稀释)处理中,针对结核分枝杆菌HN878的功效相对于未处理的对照物增加(*, $p < 0.05$)。

[0741] 图25:在THP-1细胞中评估30RESP002FC和FD(浓缩和稀释)针对结核分枝杆菌HN878的功效。在THP-1巨噬细胞中评估制剂30RESP002FC(浓缩)(A)和30RESP002FD(稀释)(B)在感染和用16 μ g/ml(▲)、8 μ g/ml(▼)、4 μ g/ml(◇)、2 μ g/ml(○)、1 μ g/ml(□)、0.5 μ g/ml(◆)、0.25 μ g/ml(▲)和0.125 μ g/ml(▼)处理之后2小时、第1天、第2天和第5天后在细胞内杀死结核分枝杆菌HN878(■)的功效。在图25中的每个曲线图中,分别用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的▲和▼曲线可不同于分别用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理的▲和▼曲线,因为用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理更有效。换句话说,用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的曲线显示比用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理显著更低的CFU值,尤其是第5天。类似地,用1 μ g/ml处理的□曲线容易不同于无处理的■曲线,因为1 μ g/ml下的处理更有效。无处理的■曲线的CFU值在上升,在第1天之后保持超过 1×10^4 。

[0742] 在以上MIC表中和图25中提及的描述为“16 μ g/ml”的30RESP002FC和FD组合物包含0.15M亚硝酸钠、0.05M乳糖醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后最终摩尔浓度),其中8 μ g/ml、4 μ g/ml、2 μ g/ml、1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml组合物每一者分别以所述次序16 μ g/ml至0.125 μ g/ml对前一组合物稀释50%(即,浓度减半)。

[0743] THP-1巨噬细胞以MOI 1:10感染结核分枝杆菌,并在感染之后2小时、第1天、第2天和第5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)确定细胞内细菌数目。所示值为来自一个独立实验的平均值 $\pm$ SD。在用16 μ g/ml 30RESP002FC(浓缩)和16 μ g/ml和8 μ g/ml 30RESP002FD(稀释)处理中,针对结核分枝杆菌HN878的功效相对于未处理的对照物增加(*, $p < 0.05$)。

[0744] 图26:在THP-1细胞中评估30RESP003FC和FD(浓缩和稀释)针对结核分枝杆菌HN878的功效。在THP-1巨噬细胞中评估30RESP003FC(浓缩)(A)和30RESP003FD(稀释)(B)在感染和用16 μ g/ml(▲)、8 μ g/ml(▼)、4 μ g/ml(◇)、2 μ g/ml(○)、1 μ g/ml(□)、0.5 μ g/ml(◆)、0.25 μ g/ml(▲)和0.125 μ g/ml(▼)处理之后2小时(第0天)、第1天、第2天和第5天后在细胞内杀死结核分枝杆菌HN878(■)的功效。在图26中的每个曲线图中,分别用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的▲和▼曲线可不同于分别用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理的▲和▼曲线,因为用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理更有效。换句话说,用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的曲线显示比用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理显著更低的CFU值,尤其是第5天。类似地,用1 μ g/ml处理的□曲线容易

不同于无处理的 ■ 曲线,因为1 μ g/ml下的处理更有效。无处理的 ■ 曲线的CFU值在上升,在第1天之后保持超过 1×10^4 。

[0745] 在以上MIC表中和图26中提及的描述为“16 μ g/ml”的30RESP003FC和FD组合物包含0.1M亚硝酸钠、0.05M甘露糖醇和0.1M柠檬酸/柠檬酸盐(稀释后最终摩尔浓度),其中8 μ g/ml、4 μ g/ml、2 μ g/ml、1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml组合物每一者分别以所述次序16 μ g/ml至0.125 μ g/ml对前一组合物稀释50% (即,浓度减半)。

[0746] THP-1巨噬细胞以MOI 1:10感染结核分枝杆菌,并在感染之后2小时、第1天、第2天和第5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)确定细胞内细菌数目。所示值为来自一个独立实验的平均值 $\pm$ SD。在用16 μ g/ml和8 μ g/ml 30RESP003FC(浓缩)和16 μ g/ml 30RESP003FD(稀释)处理中,针对结核分枝杆菌HN878的功效相对于未处理的对照物增加(*, $p < 0.05$)。

[0747] 图27:在THP-1细胞中评估30RESP004FC和FD(浓缩和稀释)针对结核分枝杆菌HN878的功效。在THP-1巨噬细胞中评估制剂30RESP004FC(浓缩)(A)和30RESP004FD(稀释)(B)在感染和用16 μ g/ml (▲)、8 μ g/ml (▼)、4 μ g/ml (◇)、2 μ g/ml (○)、1 μ g/ml (□)、0.5 μ g/ml (◆)、0.25 μ g/ml (▲)和0.125 μ g/ml (▼)处理之后2小时(第0天)、第1天、第2天和第5天后在细胞内杀死结核分枝杆菌HN878(■)的功效。在图27中的每个曲线图中,分别用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的▲和▼曲线可不同于分别用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理的▲和▼曲线,因为用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理更有效。换句话说,用16 μ g/ml和8 μ g/ml处理的曲线显示比用0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml处理显著更低的CFU值,尤其是第5天。类似地,用1 μ g/ml处理的□曲线容易不同于无处理的 ■ 曲线,因为1 μ g/ml下的处理更有效。无处理的 ■ 曲线的CFU值在上升,在第1天之后保持超过 1×10^4 。

[0748] 在以上MIC表中和图27中提及的描述为“16 μ g/ml”的30RESP004FC和FD组合物包含0.1M亚硝酸钠、0.05M甘露糖醇和0.1M抗坏血酸/抗坏血酸盐(稀释后最终摩尔浓度),其中8 μ g/ml、4 μ g/ml、2 μ g/ml、1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.25 μ g/ml和0.125 μ g/ml组合物每一者分别以所述次序16 μ g/ml至0.125 μ g/ml对前一组合物稀释50% (即,浓度减半)。

[0749] THP-1巨噬细胞以MOI 1:10感染结核分枝杆菌,并在感染之后第1天、第2天和第5天后立即使用细菌菌落计数法(CFU)确定细胞内细菌数目。所示值为来自一个独立实验的平均值 $\pm$ SD。在用16 μ g/ml和8 μ g/ml 30RESP004FC(浓缩)处理中,针对结核分枝杆菌HN878的功效相对于未处理的对照物增加(*, $p < 0.05$)。

[0750] 推断制剂显示在超过MIC的合适剂量下在体外抑制结核分枝杆菌HN878。

[0751] 在实施例6的测试中还注意到,制造制剂的方式对它们针对结核分枝杆菌HN878的体外抗细菌功效有影响。

[0752] 这一点通过在FC与FD型式之间比较8 μ g/ml浓度的制剂1的功效(图24A对比24B)来说明。FC型式的功效在孵育至少5天后强烈增加,而FD型式的功效在相同时间段增加不太强烈。这与16 μ g/ml浓度形成对比,在16 μ g/ml浓度下,FC与FD型式之间显示在相同时间段内非常相似和良好的功效。

[0753] 在制剂2下观察到不同的行为(图25A对比25B)。在孵育之后头2天,16 μ g/ml浓度的FD型式的功效比FC型式更强烈地增加,然后不变化,不过到孵育之后5天,FD型式中的功效良好,FC中的功效很好。在8 μ g/ml浓度的情况下,FD型式的功效在孵育至少5天后强烈增加

至良好的功效,而FC型式的功效在相同时间段增加不太强烈。

[0754] 因此表明,至少在较高的浓度下,加水以实现最终抑制制剂的阶段实质上在初始抗菌作用和5天内杀细菌程度方面会影响制剂的抗菌作用。一般地说,虽然不是普遍的,但将制剂最初制成亚硝酸钠、多元醇和酸成分以其所需相对摩尔比例但浓度高于使用的所需浓度(例如比使用的所需浓度浓缩至少3倍、例如至少5倍,例如比使用的所需浓度浓缩约3倍至约80倍)的浓缩预混合物,然后仅稀释浓缩物来获得使用的制剂,将在孵育之后0至5天的时间段内提供更好的抗菌作用。

[0755] 实施例7

[0756] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液针对H1N1甲型流感病毒的细胞毒性和抗病毒活性

[0757] 称为F1C1、F1C2和F1C3的分别与实施例6中的制剂30RESP001FC、其10倍稀释物和其100倍稀释物对应的测试制剂与奥司他韦溶液(1 μ M)和病毒对照物一起使用,以在MDCK细胞中24小时之后获得比较的细胞毒性和H1N1甲型流感病毒杀死作用。类似于实施例8,通过LDH细胞毒性测定对细胞毒性进行测定。在MOI=0.002(●)和MOI=0.02(■)下在一系列稀释度下(横轴是亚硝酸盐摩尔浓度)测量针对MDCK细胞中的H1N1甲型流感病毒的抗微生物活性,其中细胞毒性以灰色示出,细胞毒性标度在右侧(在至多且包括0.015M的测量的亚硝酸盐浓度下的细胞毒性 $\leq$ LDH对照物的1%)。在MOI=0.002和亚硝酸盐浓度0.15M、0.015M和0.0015M下获得平板照片,与奥司他韦(1 μ M)进行比较。图28中示出了结果。倒数第二个句子中叙述的平板的次序与图中平板从左到右的次序相同(有两个实验,每个相应实验的平板以一个在另一个之上的方式示出)。最右侧的平板对,即紧靠奥司他韦平板对右侧者,是病毒对照物。在每对测试板的下方示出了细胞毒性,为LDH对照物%(在感染后24小时3个LDH测定的平均值)。

[0758] 结果表明,在合适剂量的亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂下,可完全根除病毒,明显胜过奥司他韦。亚硝酸盐/柠檬酸/多元醇制剂已经显示对鼻病毒和呼吸道合胞病毒(RSV)类似的抗病毒活性。

[0759] 这些结果表明,根据本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂提供了对人类和动物受试者中呼吸道病毒感染的治疗性和预防性治疗。

[0760] 实施例8

[0761] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液针对冠状病毒SARS-CoV-2的细胞毒性和抗病毒活性

[0762] 材料

[0763] 测试制剂F1 (pH5.8)

[0764] 通过如下所述的方法,从1.5M亚硝酸钠、pH 5.8的0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和0.5M甘露糖醇溶液的储备溶液制备六种测试浓度的制剂1 (F1) (作为亚硝酸钠、pH 5.8的柠檬酸和甘露糖醇(一种多元醇)的水溶液),得到以下测试组合物:

[0765] 制剂1 (F1)

[0766]	测试的剂	测试制剂中的亚硝酸钠浓度(M)	测试制剂中的柠檬酸浓度(M) pH 5.8	测试制剂中的多元醇浓度(M)
	F1 测试浓度 1 (F1C1)	1.5×10^{-1} M	0.91×10^{-1} M	5.0×10^{-2} M 甘露糖醇
	F1 测试浓度 2 (F1C2)	5.0×10^{-2} M	0.30×10^{-1} M	1.5×10^{-2} M 甘露糖醇
	F1 测试浓度 3 (F1C3)	1.5×10^{-2} M	0.91×10^{-2} M	5.0×10^{-3} M 甘露糖醇
	F1 测试浓度 4 (F1C4)	1.5×10^{-3} M	0.91×10^{-3} M	5.0×10^{-4} M 甘露糖醇
	F1 测试浓度 5 (F1C5)	1.5×10^{-4} M	0.91×10^{-4} M	5.0×10^{-5} M 甘露糖醇
	F1 测试浓度 6 (F1C6)	1.5×10^{-1} M	0.91×10^{-1} M	2.5×10^{-2} M 甘露糖醇

[0767] 与F1一起使用的对照物

[0768] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH 5.8对照制剂。

[0769] 阴性对照物是测定缓冲液+细胞。

[0770] 阳性对照物是氯喹+细胞。

[0771] 测试制剂F2 (pH5.4)

[0772] 通过如下所述的方法,从1.5M亚硝酸钠、pH 5.4的0.91M柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液和0.5M甘露糖醇溶液的储备溶液制备六种测试浓度的制剂2 (F2) (作为亚硝酸钠、pH 5.4的柠檬酸和甘露糖醇(一种多元醇)的水溶液),得到以下测试组合物:

[0773] 制剂2 (F2)

[0774]	测试的剂	测试制剂中的亚硝酸钠浓度(M)	测试制剂中的柠檬酸浓度(M) pH 5.4	测试制剂中的多元醇浓度(M)
	F2 测试浓度 1 (F2C1)	1.5×10^{-1} M	0.91×10^{-1} M	5.0×10^{-2} M 甘露糖醇
	F2 测试浓度 2 (F2C2)	5.0×10^{-2} M	0.30×10^{-1} M	1.5×10^{-2} M 甘露糖醇
	F2 测试浓度 3 (F2C3)	1.5×10^{-2} M	0.91×10^{-2} M	5.0×10^{-3} M 甘露糖醇
	F2 测试浓度 4 (F2C4)	1.5×10^{-3} M	0.91×10^{-3} M	5.0×10^{-4} M 甘露糖醇
	F2 测试浓度 5 (F2C5)	1.5×10^{-4} M	0.91×10^{-4} M	5.0×10^{-5} M 甘露糖醇
	F2 测试浓度 6 (F2C6)	1.5×10^{-1} M	0.91×10^{-1} M	2.5×10^{-2} M 甘露糖醇

[0775] 与F2一起使用的对照物

[0776] 由0.1M柠檬酸+测定缓冲液+细胞制备pH 5.4对照制剂。

[0777] 阴性对照物是测定缓冲液+细胞。

[0778] 阳性对照物是氯喹+细胞。

[0779] 化学试剂

[0780] 亚硝酸钠:

[0781] 等级:亚硝酸钠特纯Ph Eur、USP。亚硝酸钠CAS No.7632-00-0,EC编号231-555-9.,特纯Ph Eur、USP,来自Sigma Aldrich,产品代码1.065441000。

[0782] 柠檬酸:

[0783] 等级:柠檬酸无水粉末**EMPROVE®**ESSENTIAL Ph Eur、BP、JP、USP、E 330、FCC, 来自Sigma Aldrich,产品代码1.002425000。

[0784] D-甘露糖醇:

[0785] 等级:满足EP、FCC、USP试验规范的D-甘露糖醇,来自Sigma Aldrich,产品代码M8429-100G。

[0786] 磷酸氯喹:

[0787] 等级:药物二级标准,来自Sigma Aldrich,产品代码PHR1258-1G。

[0788] 储备溶液的制备

[0789] 为了制备柠檬酸溶液,将90ml蒸馏水添加到19.2g柠檬酸,接着添加10ml 3M氢氧化钠,然后用蒸馏水稀释,以调整pH值(pH 5.4加到160ml,或pH 5.8加到190ml)。在一替代方法中,将20ml蒸馏水添加到19.2g柠檬酸,接着添加1.2g固体氢氧化钠,然后用10M氢氧化钠和蒸馏水调整pH值到100ml。通过使用0.22μm过滤器进行注射器过滤将溶液杀菌。

[0790] 为了制备1.0M亚硝酸钠溶液,将100mL蒸馏水添加到6.9g亚硝酸钠。为了制备1.5M亚硝酸钠溶液,将100mL蒸馏水添加到10.35g亚硝酸钠。

[0791] 当指定时,添加9.1g甘露糖醇,得到0.5M的浓度。通过使用0.22μm过滤器进行注射器过滤将溶液杀菌。

[0792] 制剂的制备

[0793] 在与亚硝酸盐和甘露糖醇溶液混合前,将缓冲柠檬酸溶液的pH值控制到期望值。针对制剂所述的pH值是在与亚硝酸盐和甘露糖醇溶液混合前制成的缓冲柠檬酸溶液的pH值。

[0794] 一种合适的制成制剂的方式如下:将含有0.5M甘露糖醇的亚硝酸钠(1.5M)添加到混合容器,随机以1:1混合物(亚硝酸盐+多元醇:柠檬酸)添加pH控制的柠檬酸溶液。通过缓缓倒转来混合溶液。一旦混合,将混合物保存在密封容器(例如50ml falcon管)中在周围温度下5分钟。然后将含有0.75M亚硝酸盐、0.25M甘露糖醇和柠檬酸的所得溶液在测定缓冲液中稀释5倍(1.2倍浓缩),得到测定中0.15M亚硝酸盐、0.05M甘露糖醇和例如0.1M柠檬酸的最终测试浓度。用蒸馏水和/或测定缓冲介质对1:1混合物(例如:以0.75M亚硝酸盐、0.25M甘露糖醇、0.5M柠檬酸开始的混合物)进行连续稀释。所有制剂浓度可存储在周围温度下。每次操作制备新鲜溶液。

[0795] 另外的对照物

[0796] 使用S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺(SNAP)作为另外的对照物,处于已知适合于达成其目的的一系列浓度下且表示为SNAP50、SNAP100、SNAP200、SNAP300和SNAP400。SNAP是一种已知的NO供体,用作这些测试中提供NO的阳性对照物,以证实NO在体外没有细胞毒性。为了控制SNAP分子的N-乙酰基青霉胺(NAP)部分对测定有任何潜在的影响,使用相应浓度的NAP作为NO空白对照物,并表示为NAP50、NAP100、NAP200、NAP300和NAP400。

[0797] 病毒

[0798] SARS-CoV-2临床分离物。

[0799] 细胞系

[0800] Vero E6。

[0801] 测定

[0802] LDH测定(细胞毒性)：

[0803] CyQUANT™ LDH细胞毒性测定试剂盒, Invitrogen; 目录号C20300和C20301。使用细胞病变效应(CPE)评分作为读出数据, 确定组织培养感染剂量(TCID₅₀)。

[0804] 在亚硝酸盐/对照物添加后2小时和24小时, 测试亚硝酸盐制剂(所有浓度)、pH 5.8或pH 5.4柠檬酸盐对照物、阴性对照物和阳性对照物(氯喹, 如Keyaerts, E, Biochem Biophys Res Commun, 323, 264-268 (2004) 所述, 内容以引用的方式并入本文中)对Vero E6细胞的细胞毒性。在2小时和24时间点测量LDH释放作为读出数据。每次操作测试每种化合物/制剂三次。

[0805] SARS-CoV-2抑制：

[0806] 在时间0小时, 在制剂或对照物存在下Vero E6细胞感染病毒并孵育1小时。孵育期之后, 将接种物去除并洗涤细胞。然后将新鲜制剂或对照物添加到洗涤过的细胞中。在感染后24小时, 收获Vero E6细胞上清液并滴定, 并将病毒滴定液孵育6天, 然后读出数据, 确定任何病毒产率减少。在包括3.0和0.3的四种MOI下进行单独测试, 不过仅滴定这两个MOI。通过结晶紫(细胞单层)染色, 然后CPE评分来读出数据。

[0807] 结果

[0808] 图32至34中示出了结果。

[0809] 图32示出了LDH细胞毒性测定的结果(操作1和2的组合图, 分别使用测试制剂1和2)。数据可以表示为两个实验的平均值+标准差(SD)。SD示为灰色误差条。最大LDH活性(细胞+裂解缓冲液)设定为100%, 所有实例结果均相对于该值。LDH阳性对照物是来自试剂盒的阳性对照物。黑色条柱(孵育2小时)是每种情况下每对条柱的左侧条柱, 红色条柱(孵育24小时)是每种情况下每对条柱的右侧条柱。

[0810] 图33示出了在MOI 3.0下操作1的针对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。在操作1中, 使用SARS-CoV-2, 在四种感染复数(MOI)下进行一个病毒产率减少测定, 感染复数使用接种病毒的反向滴定确认。对于以MOI 3接种的细胞, 在滴定之后在病毒对照孔中发现 $2.11 \log_{10}$ TCID₅₀/ml。针对所测试的一些条件, 可观察到SARS-CoV-2产率减少。在孵育24小时之后, 在最低的三个MOI(即0.3、0.03和0.003)中几乎没有检测到病毒。可能Vero E6细胞上复制24小时不足以获得高水平的子代病毒。数据表示为两次滴定的平均值+标准差(SD)。SD示为误差条。与氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0811] 图34示出了(a)在MOI 3.0下和(b)在MOI 0.3下操作2的针对SARS-CoV-2的抗病毒测试的结果。该方法对应于那些MOI下操作1的一部分, 例外是制剂是操作2制剂(多种浓度下的测试制剂2), 孵育48小时而不是24小时, 以增加子代病毒的水平。数据表示为两次滴定的平均值+标准差(SD)。SD示为误差条。与氯喹和细胞对照 $\log_{10}$ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0812] 讨论

[0813] 产生NO的水性制剂对LDH测定没有细胞毒性(图32)。尤其在较高浓度的亚硝酸盐、酸和多元醇下, 针对SARS-CoV-2的体外抗病毒作用是可观的, 与氯喹相当(图33和34)。

[0814] 在意外高的pH值下产生NO的水性制剂有效。测试pH 5.4和5.8, 但还预计低至5.2

乃至更低的较低pH值具有功效。

[0815] 此外,数据揭露有机羧酸(例如缓冲到pH 5.4或5.8的柠檬酸)在产生NO的制剂不存在的情况下具有意外低的细胞毒性和针对SARS-CoV-2的高体外抗病毒作用(图32至34;“pH 5.8柠檬酸”和“pH 5.4柠檬酸”条柱)。羧酸制剂的相对较高的pH值使得有兴趣将这类制剂作为肺内活性剂,因为预计它们对气道和肺组织表面没有毒性。因为SARS-CoV-2与SARS-CoV属于同一冠状病毒家族,病毒之间具有相似性,故还合理预测,这类有机羧酸将显示相应的针对SARS-CoV病毒的功效,SARS-CoV病毒是引起严重急性呼吸综合征(SARS)的冠状病毒,大量文件证明它在2002年和2003年爆发过

[0816] 实施例9

[0817] 羧酸-亚硝酸盐-多元醇溶液针对冠状病毒SARS-CoV的抗病毒活性

[0818] 为了研究本发明提供的针对SARS-CoV-2的抗病毒活性与本发明提供的针对SARS-CoV的抗病毒活性之间的相似性,进行以下实验。

[0819] 测试制剂F1C1、F1C2、F1C3和F1C4在MOI 3.0下针对SARS-CoV的抗病毒活性。方法类似于实施例8中描述的抗病毒测试。在用结晶紫进行细胞单层染色前,用显微镜检查2个平板并针对细胞病变效应(CPE)进行评分。发现这些平板中存在CPE,呈基础单层顶上的细胞碎片形式。

[0820] 图35中示出了用显微镜检查的两个平板的结果。数据是每个条件的单次滴定。对于剩余平板,在结晶紫染色之后,由于细胞单层过密,未能对CPE评分。与细胞对照log₁₀ TCID₅₀/ml值齐平的水平点线是测定的检测极限(LOD)。

[0821] 如图35所示,至少制剂F1C1和F1C2提供良好的针对SARS-CoV的体外抗病毒活性。

[0822] 实施例10

[0823] 供人使用的吸入器

[0824] 图30和31中示意性示出了采用根据本发明的液体组合物的供人使用的吸入器的一个实施方案。

[0825] 吸入器适合由压缩气体驱动,并被配置成响应于吸入器的一次手动启动,以一般常规方式将一剂亚硝酸盐/酸/多元醇制剂的夹带液滴从吸入器中贮存器中递送。如哮喘患者使用其吸入器时通常所做,受试者典型地与启动吸入器同时进行吸入。如图30所示,每剂约3分钟的治疗时间应该合适,在合适剂量的活性组合物下作用持续时间长达约2小时。

[0826] 空气播散的液滴行进到受试者被感染的肺中,在肺中它们接触肺被感染(例如感染病毒)的膜。图31在右侧示出了本发明在使产生一氧化氮(NO)的水性组合物的多个液滴(“水性NO”)沉积在肺内层上的作用。图31在左侧示出了在代替产生一氧化氮(NO)的水性组合物,受试者吸入气体一氧化氮(“吸入一氧化氮”)下的相应作用。

[0827] 如所示,如果使用吸入一氧化氮,那么功效可能大大降低。不仅在吸入一氧化氮通过肺的膜内层进入血流前受试者会呼出一定比例的吸入一氧化氮,而且另一部分比例的吸入一氧化氮被吸入空气中的氧气氧化成毒性二氧化氮(NO₂)。除了消耗气体一氧化氮治疗受试者的可用性之外,二氧化氮对受试者的肺也具有副作用。

[0828] 因此,通过使用根据本发明的亚硝酸盐/酸/多元醇制剂,可实现一氧化氮更高效和有效递送到患者的肺和经由肺递送到患者的血流。

[0829] 结论

[0830] 上述内容广泛地描述了本发明,不限于此。本领域的技术人员容易显而易见的变化和改变意图包括在随附权利要求书的范围内。在其中或据此将专利授予本发明的任何特定管辖权法律针对与随附权利要求书同等的技术的未经授权的使用强制执行该专利的程度上,专利权人意图该专利涵盖这类同等技术。

[0831] 在适用法律允许的程度,权利要求书还涵盖随附权利要求书的保护范围的同等物。例如,一般地说,本文所述的产生NO_x的反应的组分或组分部分的混合次序不是关键,条件是不过早地引发产生NO_x的反应。意图涵盖本发明的任何组合、试剂盒或组合物的必要和非必要组分的任何混合次序。如果一种或多种组分呈液体形式,例如呈溶液形式使用,那么与一种或多种组分呈固体形式或呈液体形式以不同的体积或浓度使用的情况相比,该组分或那些组分的混合对反应混合物或反应混合物的任何组分部分中的溶质浓度的影响可能不同。在适用法律允许的程度,形成本发明的组合、试剂盒和组合物的组分的所有当量浓度和/或外观(固体、液体、溶液)的使用,以及制备所述组合、试剂盒和组合物的所有同等步骤和步骤次序即使在本文中描述或具体地要求,也在本发明的权利要求书的范围内。

[0832] 以下陈述定义了权利要求书中提到的本公开的方面或实施方案:

[0833] 1. 一种治疗或非治疗方法,其将一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体经由人类或动物受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺递送到所述受试者,所述方法包括:

[0834] (A) 经由所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺向所述受试者施用通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的组合或组合物,所述组合或组合物包含:

[0835] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0836] (ii) 质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸;以及

[0837] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0838] 特征在于以下中之一者或多者:

[0839] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在,其中所述反应输出的增强是与在相同条件下进行但没有所述一种或多种有机多元醇的反应进行比较;

[0840] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0841] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0842] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0843] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0844] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0845] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0846] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0847] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0848] (j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0849] 或

[0850] (B) 经由所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺向所述受试者施用已经通过包括以下的方法制备的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体：使

[0851] (i) 一种或多种亚硝酸盐与

[0852] (ii) 质子源在适于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应条件下反应，所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸，其中所述反应在

[0853] (iii) 一种或多种有机多元醇存在下进行；

[0854] 特征在于以下中的一者或多者：

[0855] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在；

[0856] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶；

[0857] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0858] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0859] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0860] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0861] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0862] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者，其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代；

[0863] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0864] (j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0865] 2. 根据陈述1的方法，其中所述质子源包括包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶，所述组合或试剂盒包含两种或更多种分开的组合物，并且所述一种或多种多元醇不与所述水凝胶直接接触或混合存在于所述分开的组合物中。

[0866] 3. 根据陈述1(A)或陈述2的方法，其中所述组合或组合物基本上由组分(i)、(ii)

和(iii)以及任选的水和/或pH缓冲液组成。

[0867] 4. 根据陈述1(A)或陈述2的方法,其中所述组合或组合物基本上由组分(i)、(ii)和(iii)以及任选的水和/或pH缓冲液和/或一种或多种按重量或体积计少于所述组合或所述组合物的约20%的量的另外的组分组成。

[0868] 5. 根据前述陈述中任一项的方法,所述方法是治疗有需要的受试者、例如人类受试者或其它哺乳动物受试者的微生物感染,例如细菌、病毒、真菌、微寄生物感染或它们的任何组合的方法。

[0869] 6. 根据陈述1至4中任一项的方法,所述方法是在受试者、例如人类受试者或其它哺乳动物受试者上进行的血管舒张方法。

[0870] 7. 根据陈述1至4中任一项的方法,所述方法是抗微生物方法,例如以减少所述受试者所在地的微生物、例如细菌、病毒、真菌细胞和/或微寄生物的数目,预防它们繁殖,或限制它们繁殖的速率。

[0871] 8. 根据陈述5的方法,其中所述微生物感染是在所述受试者的皮肤如粘膜上,或在所述受试者的内部空间中,例如在所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺中,或所述受试者的肺部胸膜的内层。

[0872] 9. 根据陈述7的抗微生物方法的改良,其中在向所述受试者施用的所述组合或组合物中,在产生 NO_x 的反应混合物的将影响pH值的其它组分存在之前包括任何所需缓冲液的所述质子源的水溶液的初始pH值或在与所述一种或多种亚硝酸盐的反应开始时所述反应混合物的pH值在5至8的范围内,并且所述一种或多种多元醇是任选的,并且可以省去。

[0873] 10. 根据陈述1至9中任一项的方法,所述方法结合手术方法或涉及疗法与手术的方法进行。

[0874] 11. 一种物质或组合物,所述物质或组合物是:

[0875] (A) 用于疗法和/或手术的组合或组合物,其通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,所述组合或组合物包含:

[0876] (i) 一种或多种亚硝酸盐;

[0877] (ii) 质子源,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸;以及

[0878] (iii) 一种或多种有机多元醇;

[0879] 特征在于以下中的一者或多者:

[0880] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在,其中所述反应输出的增强是与在相同条件下进行但没有所述一种或多种有机多元醇的反应进行比较;

[0881] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0882] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0883] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0884] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0885] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0886] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0887] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0888] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0889] (j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0890] 其中所述疗法和/或手术包括经由所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺向所述受试者施用所述组合或组合物；

[0891] 或

[0892] (B) 用于疗法和/或手术的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体，其已经通过包括以下的方法制备：使

[0893] (i) 一种或多种亚硝酸盐与

[0894] (ii) 质子源在适于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应条件下反应，所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸，其中所述反应在

[0895] (iii) 一种或多种有机多元醇存在下进行；

[0896] 特征在于以下中的一者或多者：

[0897] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在；

[0898] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶；

[0899] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0900] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0901] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0902] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0903] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0904] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者，其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代；

[0905] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0906] (j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二

醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；

[0907] 其中所述疗法和/或手术包括经由所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺向所述受试者施用所述一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体；

[0908] 或

[0909] (C) 用于施用于所述受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺的组合或组合物，其通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体，所述组合或组合物包含：

[0910] (i) 一种或多种亚硝酸盐；

[0911] (ii) 质子源，所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸；以及

[0912] (iii) 一种或多种有机多元醇；

[0913] 特征在于以下中的一者或多者：

[0914] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在，其中所述反应输出的增强是与在相同条件下进行但没有所述一种或多种有机多元醇的反应进行比较；

[0915] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶；

[0916] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0917] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0918] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇；

[0919] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0920] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇；

[0921] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者，其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代；

[0922] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合；(j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0923] 12. 根据陈述11的物质或组合物，其中所述疗法和/或手术包含根据陈述1至10中任一项的方法。

[0924] 13. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物，其中所述一种或多种亚硝酸

盐选自 LiNO_2 、 NaNO_2 、 KNO_2 、 RbNO_2 、 CsNO_2 、 FrNO_2 、 AgNO_2 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 和它们的任何混合物。

[0925] 14. 根据陈述13的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种亚硝酸盐是 NaNO_2 、 KNO_2 或它们的混合物。

[0926] 15. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的产生 NO_x 的反应系统的任何组分呈干燥形式,例如呈微粒干燥形式存在。

[0927] 16. 根据陈述1至14中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的产生 NO_x 的反应系统的任何组分呈水性载体、例如水性液体或凝胶中的溶液存在。

[0928] 17. 根据陈述16的方法或物质或组合物,其中所述溶液中的亚硝酸根离子的摩尔浓度在约0.001M至约5M的范围内。

[0929] 18. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种亚硝酸盐或含有所述一种或多种亚硝酸盐的产生 NO_x 的反应系统的任何组分的pH值被缓冲,优选地缓冲到约6至约9的pH值。

[0930] 19. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述质子源的所述一种或多种有机羧酸选自:水杨酸、乙酰水杨酸、乙酸、柠檬酸、乙醇酸、扁桃酸、酒石酸、乳酸、马来酸、苹果酸、苯甲酸、甲酸、丙酸、 α -羟基丙酸、 β -羟基丙酸、 β -羟基丁酸、 β -羟基- β -丁酸、萘甲酸、油酸、棕榈酸、帕莫酸(扑酸)、硬脂酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖醛酸、乳糖酸、肉桂酸、丙酮酸、乳清酸、甘油酸、甘草酸、山梨酸、透明质酸、海藻酸、草酸、它们的盐和它们的组合;一种或多种聚合物或聚合羧酸,例如聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、丙烯酸与甲基丙烯酸的共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸或乳酸与乙醇酸的共聚物;一种或多种酸水凝胶,其含有与形成水凝胶的三维聚合物基质的聚合物分子共价连接的 $-\text{COOH}$ 侧基;它们的部分或完全酯和部分或完全盐,条件是那些酯和盐可以用作质子源;以及它们的任何混合物或组合。

[0931] 20. 根据陈述19的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种羧酸选自柠檬酸、其盐以及它们的组合。

[0932] 21. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述质子源的所述一种或多种非羧酸还原酸选自抗坏血酸;抗坏血酸棕榈酸(抗坏血酸棕榈酸酯);抗坏血酸衍生物,例如3-O-乙基抗坏血酸、其它3-烷基抗坏血酸、6-O-辛酰基抗坏血酸、6-O-十二酰基抗坏血酸、6-O-十四酰基抗坏血酸、6-O-十八酰基抗坏血酸和6-O-十二烷二酰基抗坏血酸;酸性还原酮,例如还原酸;异抗坏血酸;草酸;它们的盐;以及它们的组合。

[0933] 22. 根据陈述21的方法或物质或组合物,其中所述有机非羧酸还原是抗坏血酸或其盐。

[0934] 23. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述质子源或其组成部分或者含有所述质子源的产生 NO_x 的反应系统的任何组分呈干燥形式,例如呈微粒干燥形式存在。

[0935] 24. 根据陈述1至22中任一项的方法或物质或组合物,其中所述质子源或其组成部分或者含有所述质子源的产生 NO_x 的反应系统的任何组分呈水性载体、例如水性液体或凝

胶中的溶液存在。

[0936] 25. 根据陈述24的方法或物质或组合物,其中所述溶液中的质子源的摩尔浓度在约0.001M至约5M的范围内。

[0937] 26. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述质子源的pH值被缓冲,优选地缓冲到约3至约9、例如约4至约8、例如约5至约8的pH值。

[0938] 27. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种有机多元醇选自具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的糖醇,例如具有4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个碳原子的醛醇。

[0939] 28. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种有机多元醇选自赤藓醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇、庚七醇、异麦芽糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇、聚多羟糖醇、丙三醇和它们的任何组合。

[0940] 29. 根据陈述27或陈述28的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种有机多元醇选自阿糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇和它们的任何组合。

[0941] 30. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种有机多元醇或者含有所述一种或多种有机多元醇的产生NO_x的反应系统的任何组分呈干燥形式,例如呈微粒干燥形式存在。

[0942] 31. 根据陈述1至29中任一项的方法或物质或组合物,其中所述一种或多种有机多元醇或者含有所述一种或多种有机多元醇的产生NO_x的反应系统的任何组分呈水性载体、例如水性液体或凝胶中的溶液存在。

[0943] 32. 根据陈述31的方法或物质或组合物,其中所述溶液中的总一种或多种有机多元醇的摩尔浓度在约0.001M至约5M的范围内。

[0944] 33. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中:

[0945] (a) 在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的任一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于亚硝酸盐组分中或反应溶液中的亚硝酸根离子的总克分子浓度的约0.05倍与约3倍之间,例如约0.1倍与约2倍之间,例如约0.25倍与约1.5倍之间;或

[0946] (b) 在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的任一种或克分子浓度介于质子源组分中或反应溶液中的质子源的总克分子浓度的约0.05倍与约3倍之间,例如约0.1倍与约2倍之间,例如约0.25倍与约1.5倍之间。

[0947] 34. 根据前述陈述中任一项的方法或物质或组合物,其中所述通过一种或多种亚硝酸盐与质子源的反应用于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的组合或组合物还包含一种或多种选自以下的另外的组分:稀释剂、载体、赋形剂、甜味剂、遮味剂、增稠剂、增粘剂、湿润剂、成膜剂、润滑剂、粘合剂、乳化剂、增溶剂、稳定剂、着色剂、增味剂、盐、包覆剂、抗氧化剂、药物活性剂、防腐剂和它们的任何组合。

[0948] 35. 一种试剂盒,其用于根据前述陈述中的任一项的方法中或用于制备和任选地递送根据前述陈述中的任一项的物质或组合物,其中除了组分类型(i)、(ii)和(iii)(存在时)的化学物质之外,所述试剂盒还包含以下中的至少一者:用于在使用前容纳组分的容器;用于混合组分、分配反应混合物和/或放出的气体并控制所述混合和分配的至少一种装

置或其它构件;使用说明书;以及可以发现使用说明书的指导,例如在线使用说明书。

[0949] 36. 一种用于根据陈述1至10和13至34中任一项的方法中的分配器,其包含:如所述陈述中定义的组分类型(i)、(ii)和(iii)(存在时)的化学物质;至少一个用于在使用前容纳组分的容器;至少一个用于控制组分混合和分配反应混合物、其一种或多种组分和/或从所述分配器放出的气体并将其引导到目标的装置或其它构件。

[0950] 37. 根据陈述36的分配器,其中所述分配器被改造用于实现分配反应混合物、其一种或多种组分、包含反应混合物的载体、包含反应混合物的一种或多种组分的载体和/或放出的气体的重复相似动作。

[0951] 38. 根据陈述36或陈述37的分配器,其中所述分配器包含泵或推进剂系统以运载包含产生NO的反应混合物的组合物、其组分中的一者或多者、或从所述分配器放出的气体并将其引导到目标。

[0952] 39. 根据陈述36至38中任一项的分配器,其中所述分配器被改造用于引导所述反应混合物、其一种或多种组分、包含所述反应混合物的载体、包含所述反应混合物的一种或多种组分的载体和/或放出的气体到人类或动物受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺。

[0953] 40. 一种一氧化氮分配器,其包含一氧化氮气体的增压瓶和递送装置,所述递送装置可连接到所述增压瓶并被改造成将所述一氧化氮气体从所述增压瓶递送到人类或动物受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺,其中所述一氧化氮是通过包括以下的方法产生的一氧化氮:使一种或多种亚硝酸盐与质子源在适于产生一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体的反应条件下反应,所述质子源包含一种或多种选自有机羧酸和有机非羧酸还原酸的酸,其中所述反应在一种或多种有机多元醇存在下进行;

[0954] 特征在于以下中的一者或多者:

[0955] (a) 所述一种或多种有机多元醇以增强反应输出的量存在;

[0956] (b) 所述质子源不仅仅是包含与三维聚合物基质共价键结的羧酸侧基的水凝胶;

[0957] (c) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0958] (d) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0959] (e) 当使用一种或多种增塑剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙三醇;

[0960] (f) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0961] (g) 当使用一种或多种增粘剂时所述一种或多种有机多元醇不仅仅是聚乙烯醇;

[0962] (h) 以上(b)至(g)中的任一者或多者,其中词语“不仅仅是”被“不包含”替代;

[0963] (i) 所述一种或多种有机多元醇不仅仅是丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合;

[0964] (j) 所述一种或多种有机多元醇不包含丙二醇、聚乙二醇、单硬脂酸甘油酯(硬脂酸甘油酯)、三羟基乙胺、D-泛酰醇、泛醇、泛醇联合肌醇、丁二醇、丁烯二醇、丁炔二醇、戊二醇、己二醇、辛二醇、新戊二醇、2-甲基-1,3-丙二醇、乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、四乙二醇、二丙二醇、二丁二醇、丁-1,2,3-三醇、丁-1,2,4-三醇、己-1,2,6-三醇、己二醇、辛甘醇、

除这里列出的二醇以外的二醇、氢醌、丁基化氢醌、1-硫代甘油、异抗坏血酸盐、乙基己基甘油、它们的任何组合或以上任一者与丙三醇和/或聚乙烯醇的任何组合。

[0965] 41. 当使用根据陈述38至40中任一项的分配器分配时的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体。

[0966] 42. 根据前述陈述中任一项的方法、或物质或组合物、或试剂盒、或分配器、或当使用所述分配器分配时的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体,其中:

[0967] -所述一种或多种亚硝酸盐包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):一种或多种碱金属或碱土金属亚硝酸盐,例如亚硝酸钠、亚硝酸钾或它们的任何组合;

[0968] -所述质子源包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合;

[0969] -所述抗坏血酸或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液、柠檬酸或柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或其中的两者或更多者的任何组合的分子不共价键结于聚合物或大分子;

[0970] -所述一种或多种有机多元醇包含以下(例如,包括以下或基本上由以下组成或仅由以下组成):每个分子具有4至12个碳原子和4至12个OH基团的直链糖醇或醛醇,例如山梨糖醇、甘露糖醇、阿糖醇、木糖醇或其中的两者或更多者的任何组合;

[0971] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的任一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于亚硝酸根离子的总克分子浓度的0.05倍与3倍之间;

[0972] -在产生NO_x的反应开始时或在开始之前多元醇组分中或反应溶液中的任一种或多种有机多元醇的总克分子浓度介于质子源组分中或反应溶液中的质子源的总克分子浓度的0.05倍与3倍之间;

[0973] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在产生NO_x的反应引发之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在3.0至9.0的范围内;

[0974] -对于不涉及反应混合物与细胞或动物(包括人)的皮肤(包括粘膜)、器官或其它组织之间的接触的应用,在产生NO_x的反应引发之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在4.0至8.0的范围内;

[0975] -对于不涉及反应混合物与动物(包括人类)受试者的鼻、口腔、呼吸道或肺之间的接触的应用,在引发产生NO的反应之前、尤其即将引发时的质子源的pH值在5.0至8.0的范围内;

[0976] -除了SARS-CoV或SARS-CoV-2之外,靶向的微生物选自以下清单中的细菌物种:放线菌属、杆菌属、巴尔通氏体属、博德特氏菌属、疏螺旋体属、布鲁氏杆菌属、弯曲杆菌属、衣原体属、嗜衣原体属、梭状芽胞杆菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、埃希氏杆菌属、弗朗西斯氏菌属、嗜血杆菌属、螺杆菌属、军团菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、分枝杆菌属、霉浆菌属、奈瑟氏菌属、假单胞菌属、立克次氏体属、沙门菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、链球菌属、密螺旋体属、脲原体属、弧菌属、耶尔森氏菌属或它们的任何组合;以下清单中的真菌物种:曲霉属、芽生菌属、念珠菌属、球孢子菌属、隐球酵母属、组织胞浆菌属、毛霉菌属、肺孢子虫属、孢子丝菌属、篮状菌属或它们的任何组合;以下清单中的病毒:流感病毒、副流感病

毒、腺病毒、诺如病毒、轮状病毒、鼻病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒 (RSV)、星状病毒、肝炎病毒或它们的任何组合；以及以下清单中的原生动物：肉足纲、鞭毛纲、纤毛亚门、孢子虫纲或它们的任何组合；例如，结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌（包括脓肿分枝杆菌）、绿脓杆菌（包括其耐抗生素株系）。

[0977] 43. 根据前述陈述中任一项的方法、或物质或组合物、或试剂盒、或分配器、或当使用分配器分配时的一氧化氮、任选的其它氮氧化物和/或任选的其前体，其中所述一种或多种有机多元醇在存在时不包括（即，排除）还原剂。

在不同的水性环境中每毫克亚硝酸钠由亚硝酸钠与酸的反应(相同浓度、pH)放出的一氧化氮(nmol/mg亚硝酸盐)的累积曲线图。

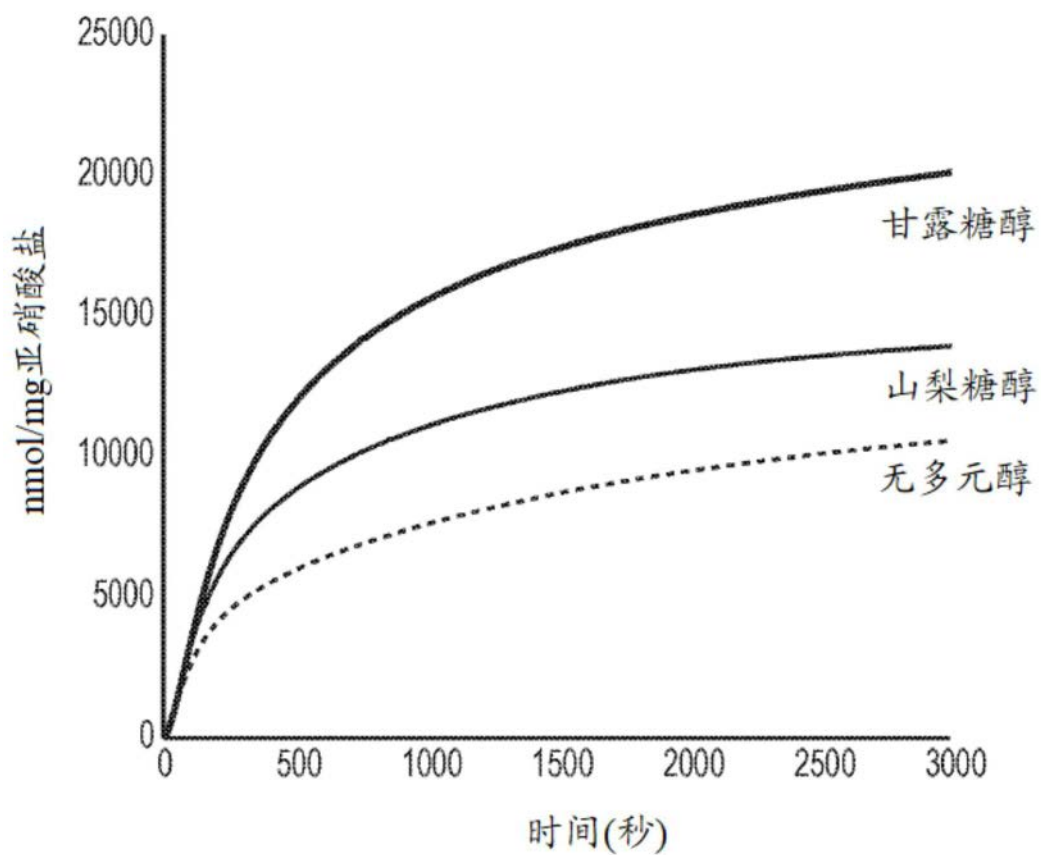


图1

在多元醇不存在的情况下柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液或抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液与亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

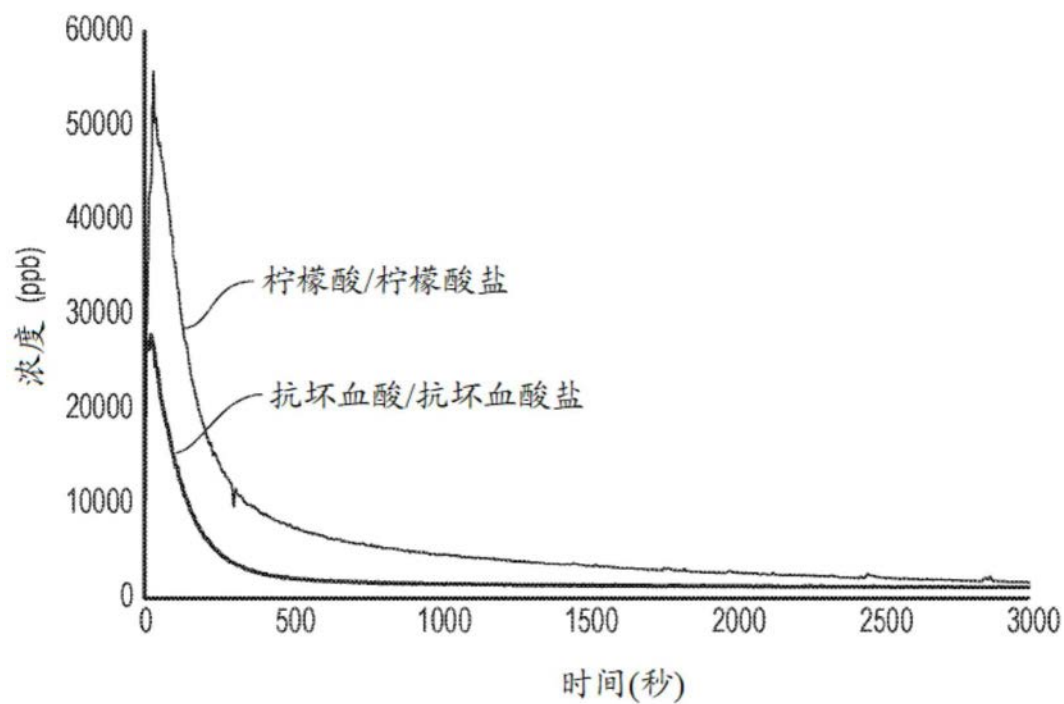


图2

在多元醇存在的情况下柠檬酸与
亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

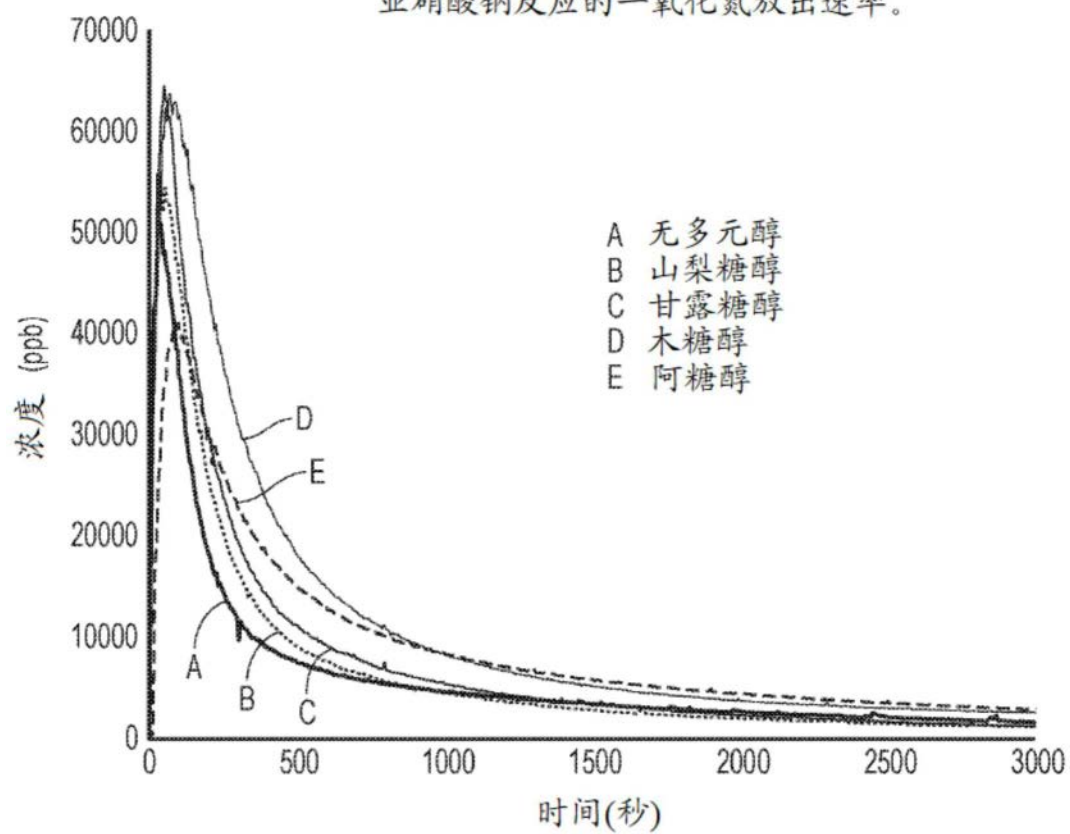


图3

在多元醇(1 M)存在的情况下抗坏血酸与
亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

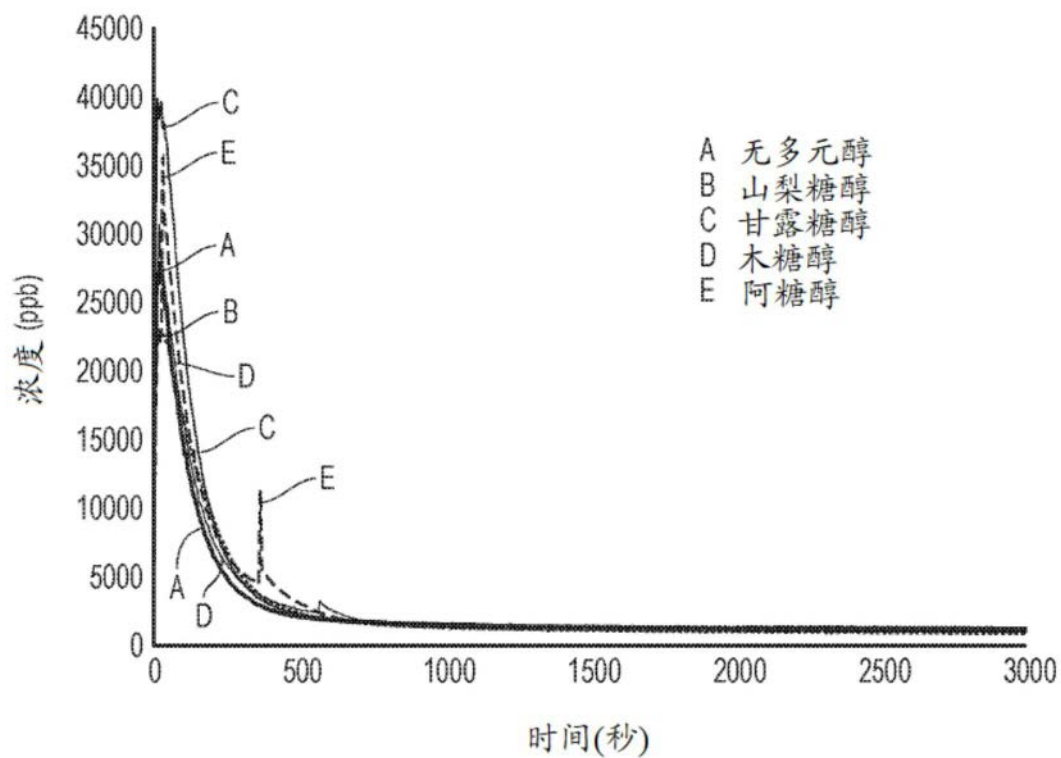


图4

在多元醇(0.5 M)存在的情况下柠檬酸与
亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

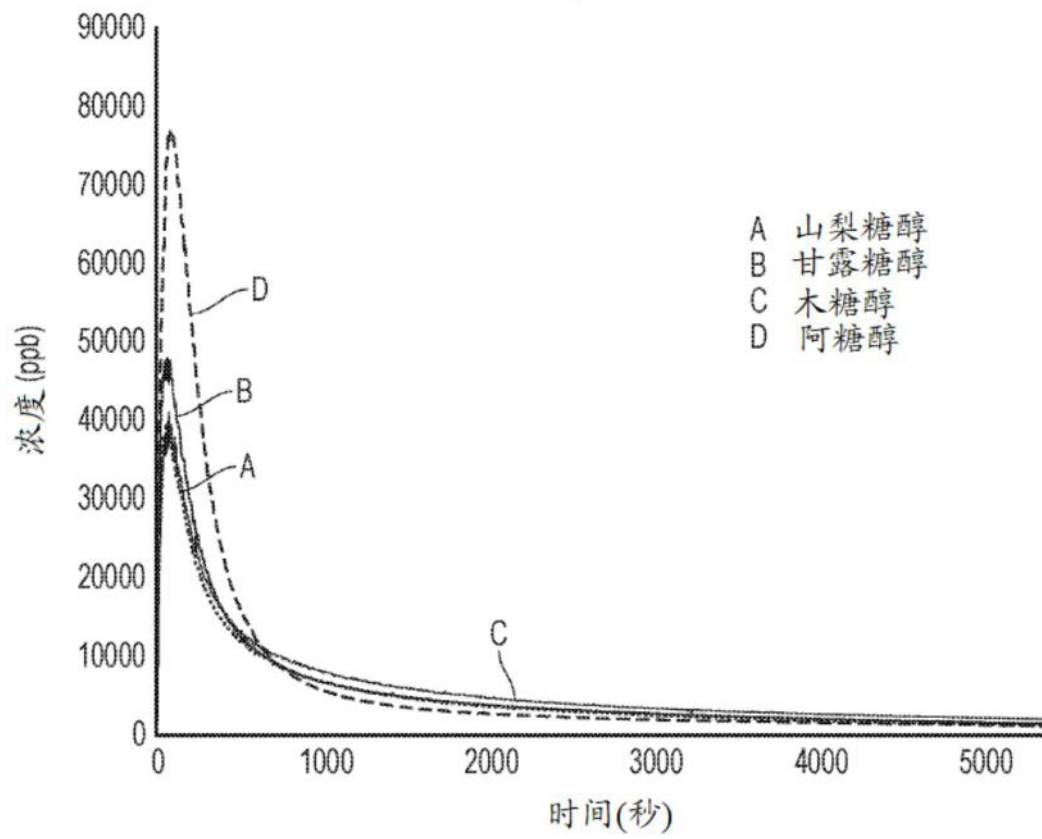


图5

在多元醇(0.5 M)存在的情况下抗坏血酸
与亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

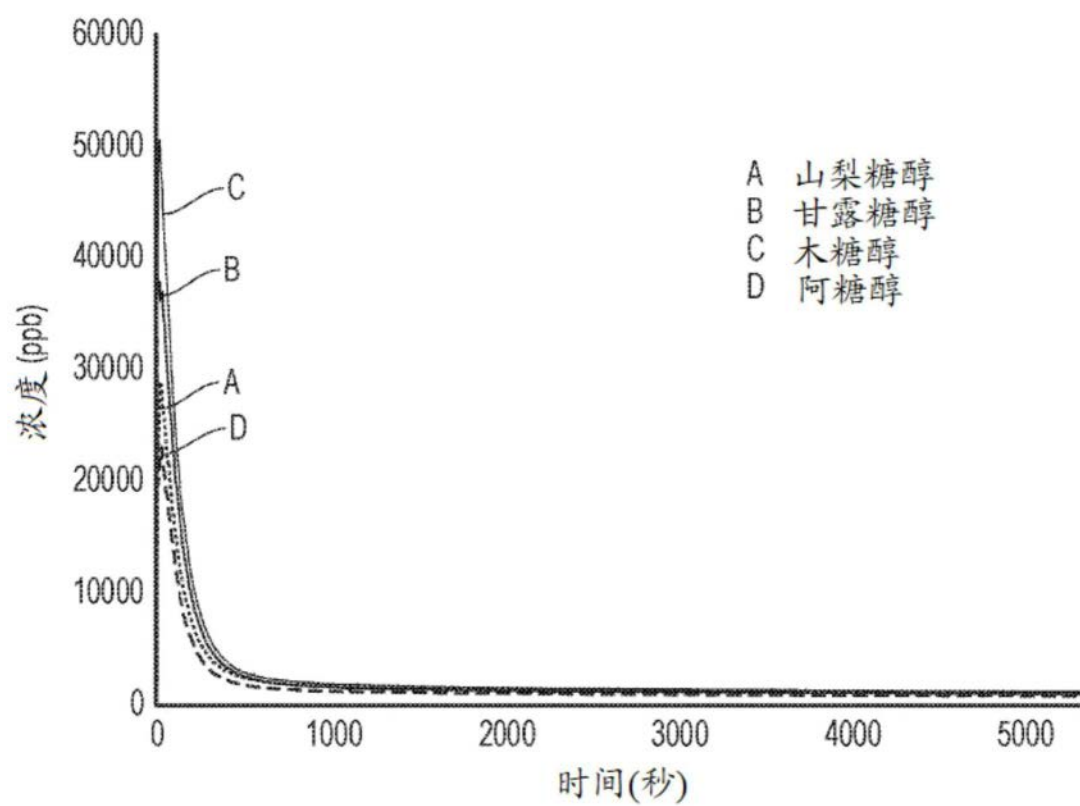


图6

在多元醇存在的情况下柠檬酸或抗坏血酸与亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

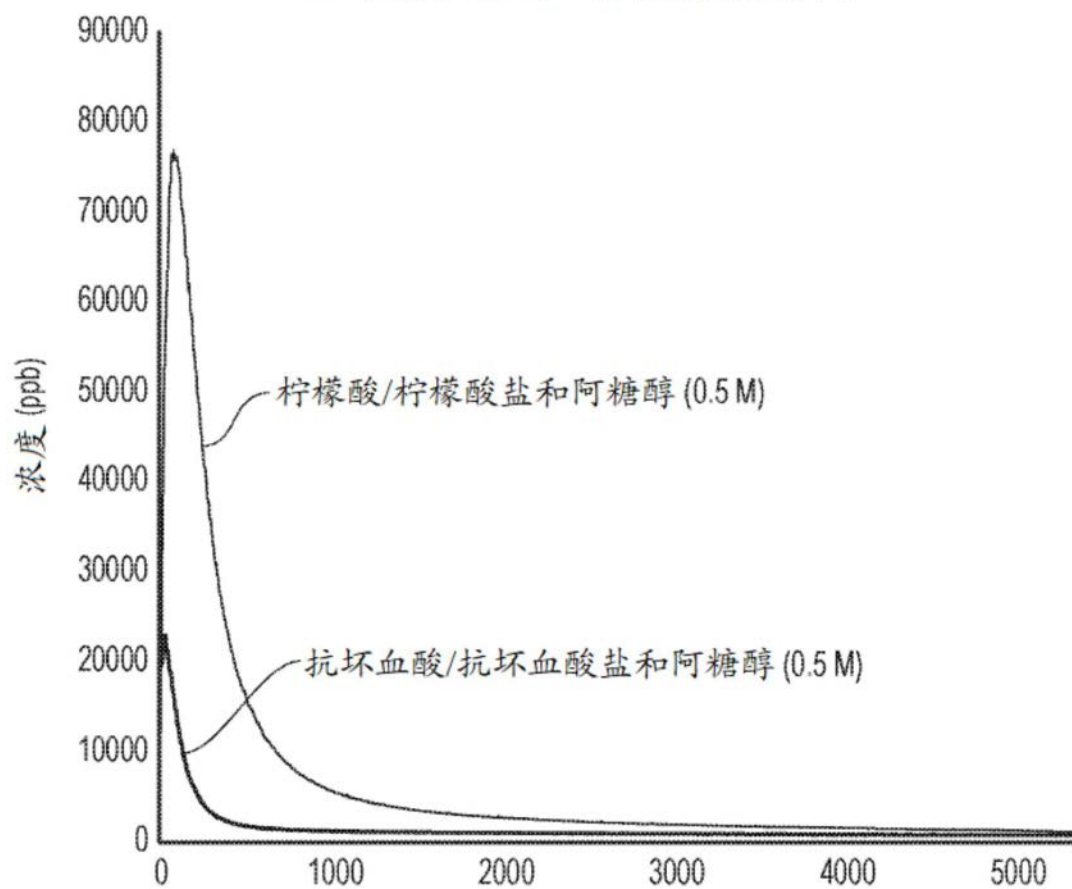


图7

在多元醇存在的情况下柠檬酸或抗坏血酸与亚硝酸钠反应的一氧化氮放出速率。

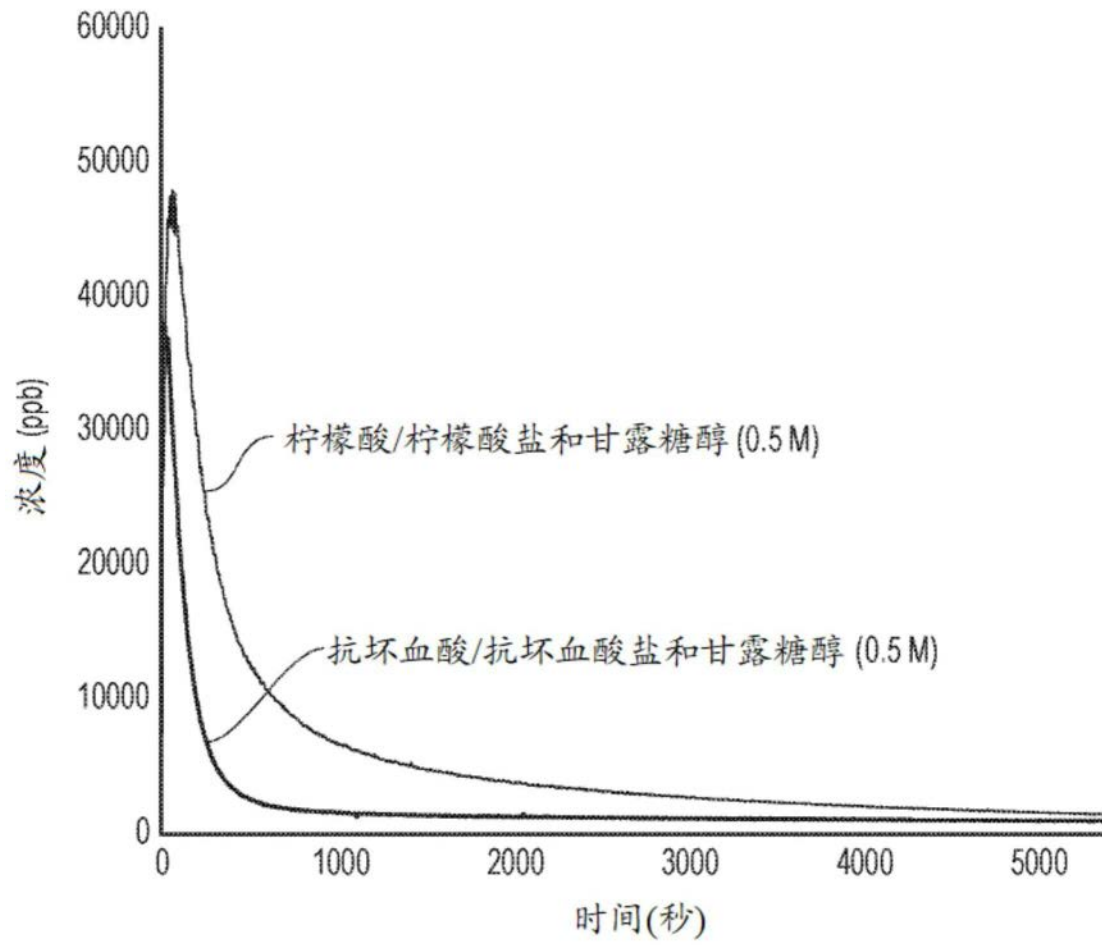
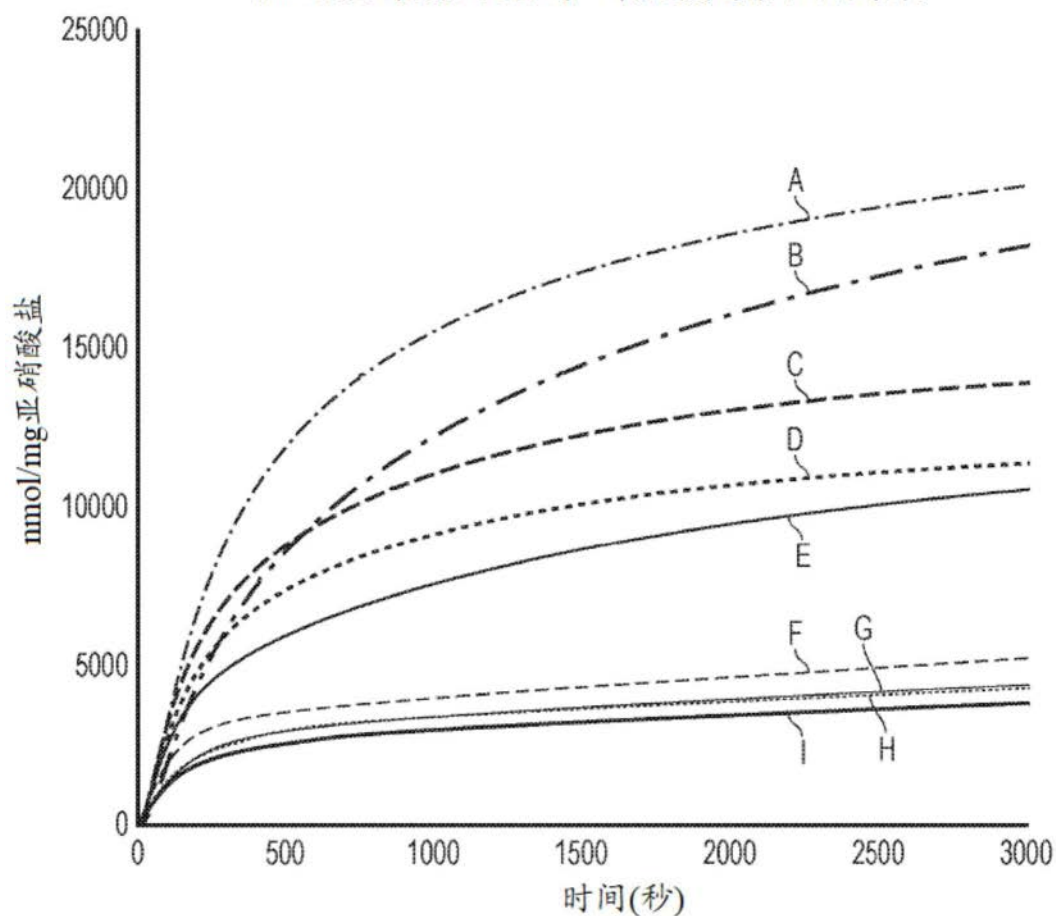


图8

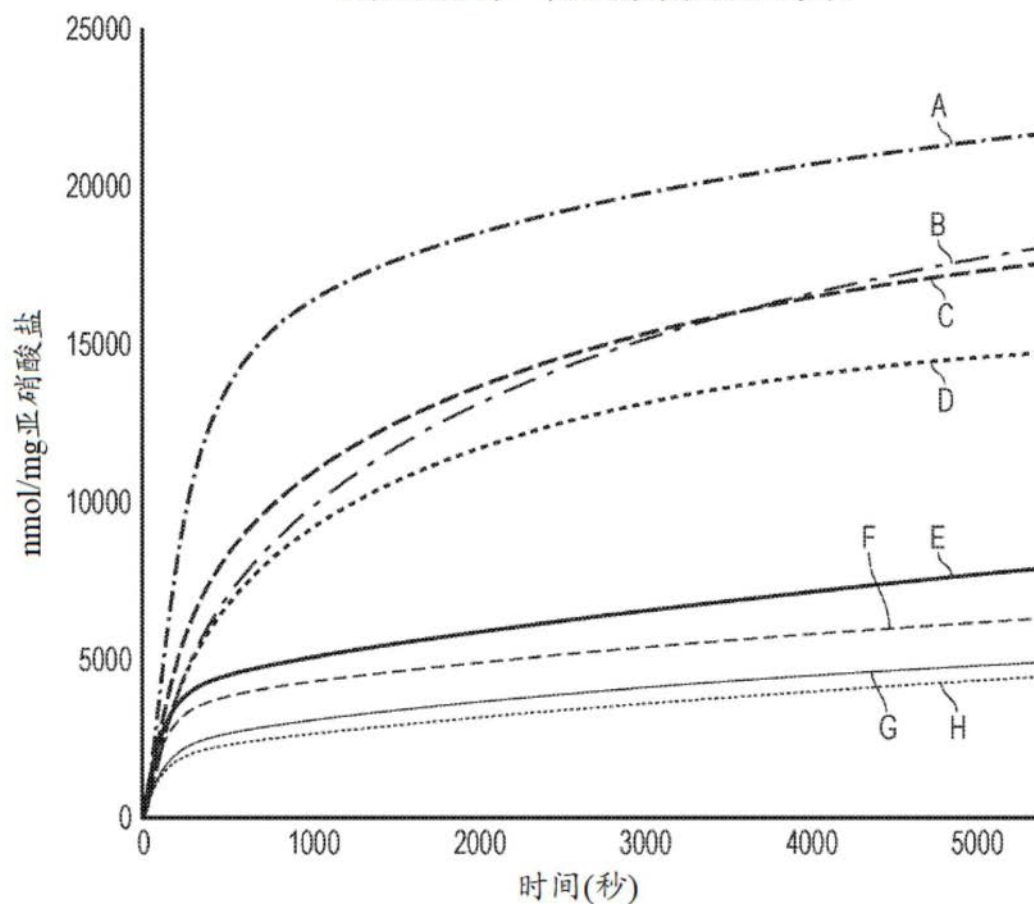
在多元醇(1.0 M)存在的情况下每毫克亚硝酸钠
由亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗
坏血酸盐的反应放出的一氧化氮的累积曲线图。



- A 具有木糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- B 具有阿糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- C 具有甘露糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- D 具有山梨糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- E 无多元醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- F 具有甘露糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- G 具有山梨糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- H 具有阿糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- I 具有木糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液

图9

在多元醇存在的情况下每毫克亚硝酸钠由
亚硝酸钠与柠檬酸/柠檬酸盐或抗坏血酸/抗坏血酸盐的
反应放出的一氧化氮的累积曲线图。



- A 具有0.5 M阿糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- B 具有0.5 M木糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- C 具有0.5 M甘露糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- D 具有0.5 M山梨糖醇的柠檬酸/柠檬酸盐缓冲液
- E 具有0.5 M木糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- F 具有0.5 M甘露糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- G 具有0.5 M山梨糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液
- H 具有0.5 M阿糖醇的抗坏血酸/抗坏血酸盐缓冲液

图10

在甘露糖醇存在和不存在的条件下由
亚硝酸钠与柠檬酸(pH 3)的反应放出的一氧化氮
(nmol NO/mg亚硝酸钠)的累积曲线图。

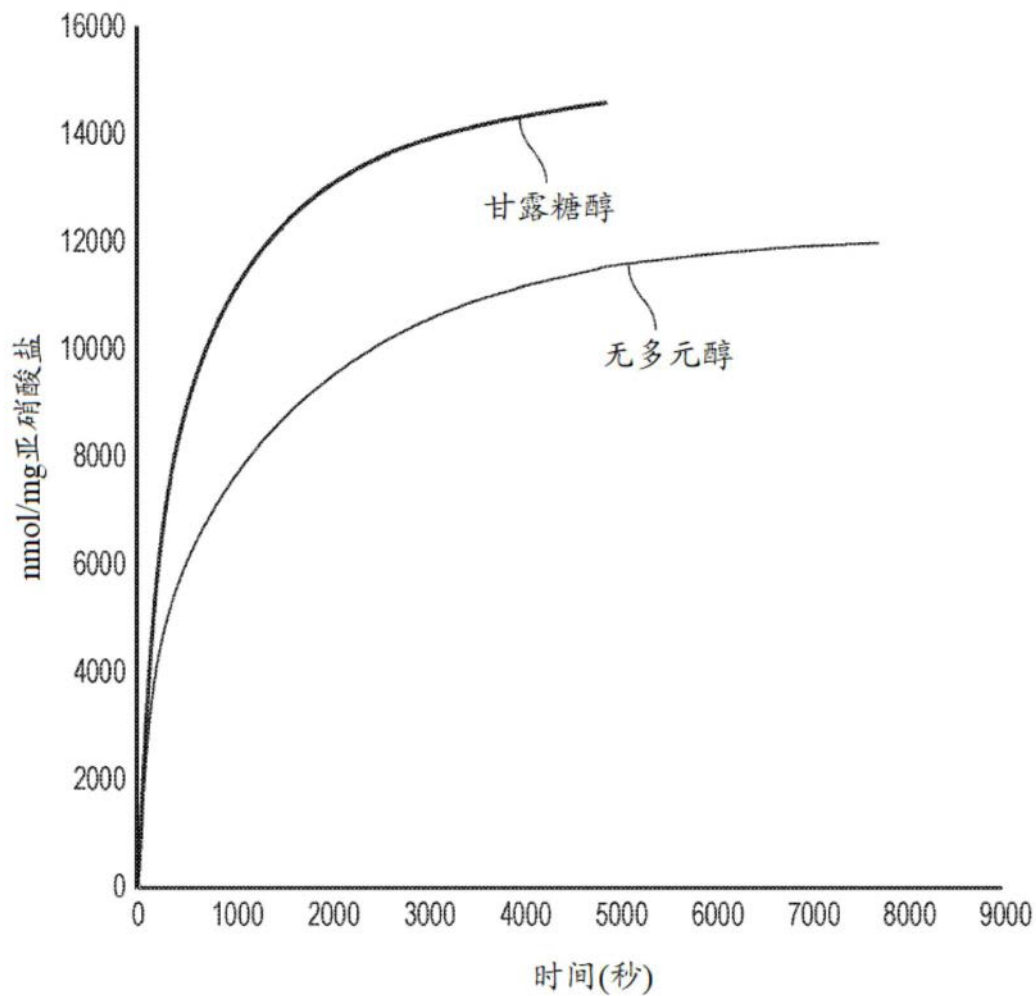


图11

一氧化氮放出的累积曲线图pH 4.8

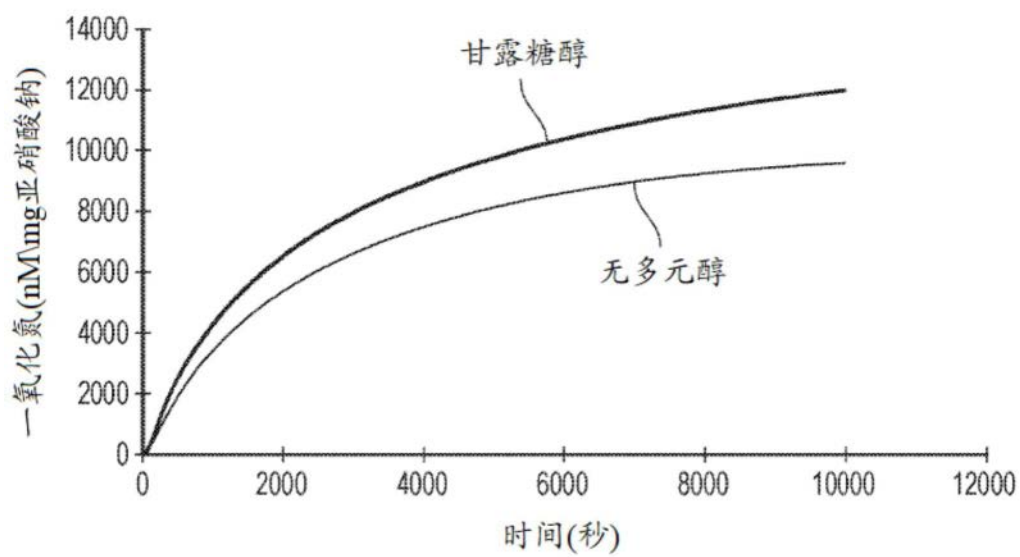


图12

一氧化氮放出的累积曲线图pH 6.2

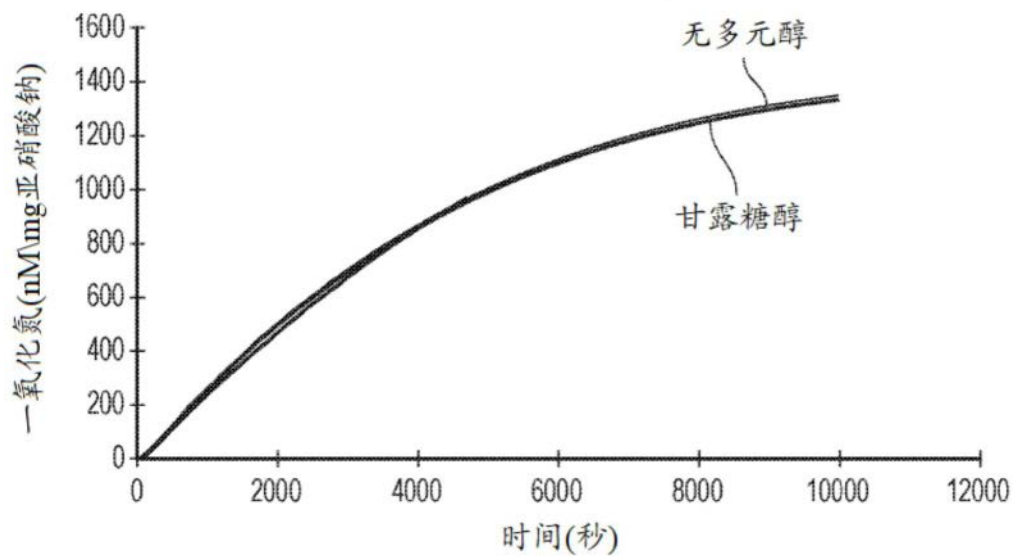


图13

每平方米筛网在多元醇存在的情况下由亚硝酸钠与柠檬酸的反应放出的一氧化氮的累积曲线图。

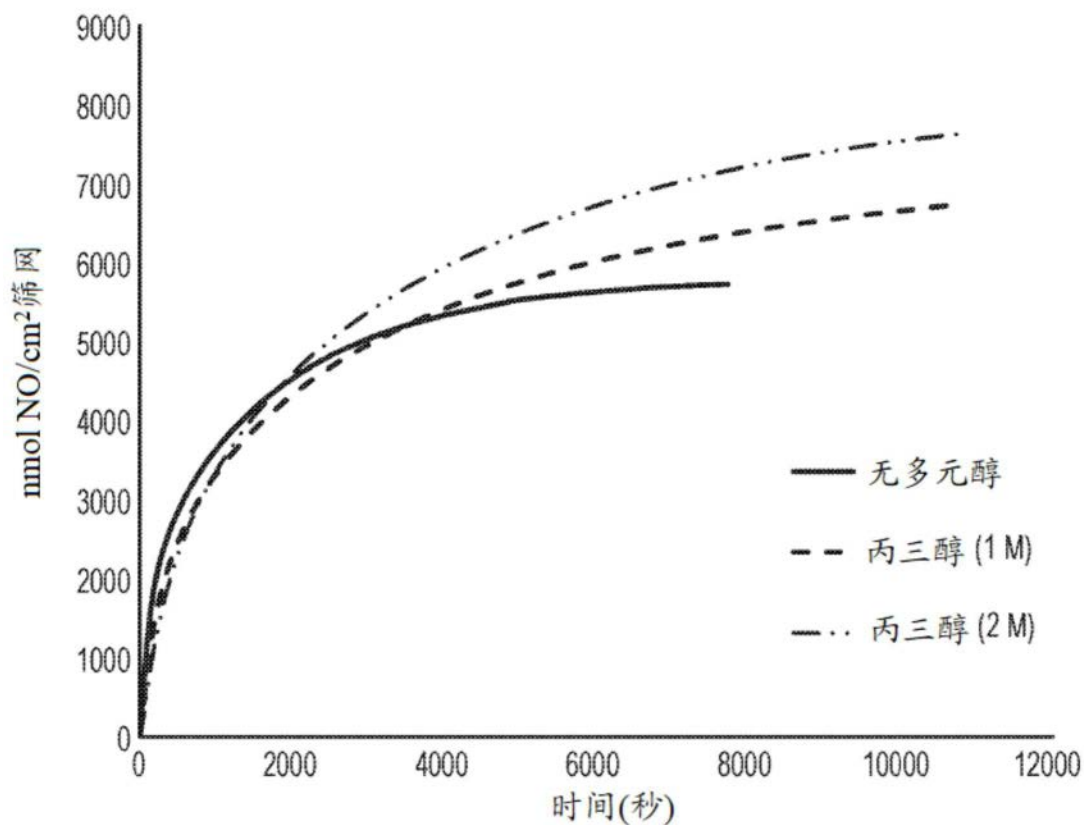


图14

每平方米筛网在多元醇存在的情况下由亚硝酸钠与柠檬酸的反应放出的一氧化氮的累积曲线图。

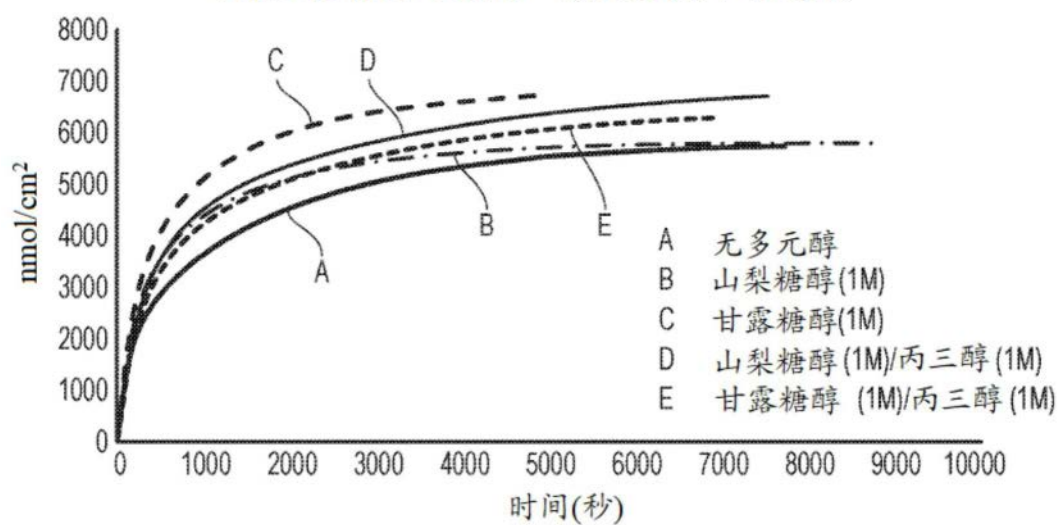


图15

每毫克亚硝酸盐放出的一氧化氮(nmol)的
平均(n=3)累积曲线图, 柠檬酸/柠檬酸盐pH 5.8

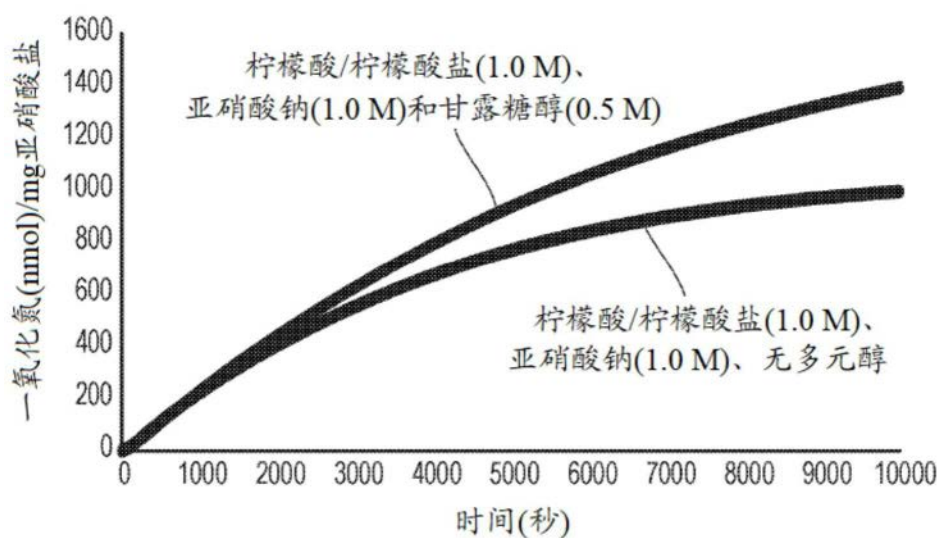


图16

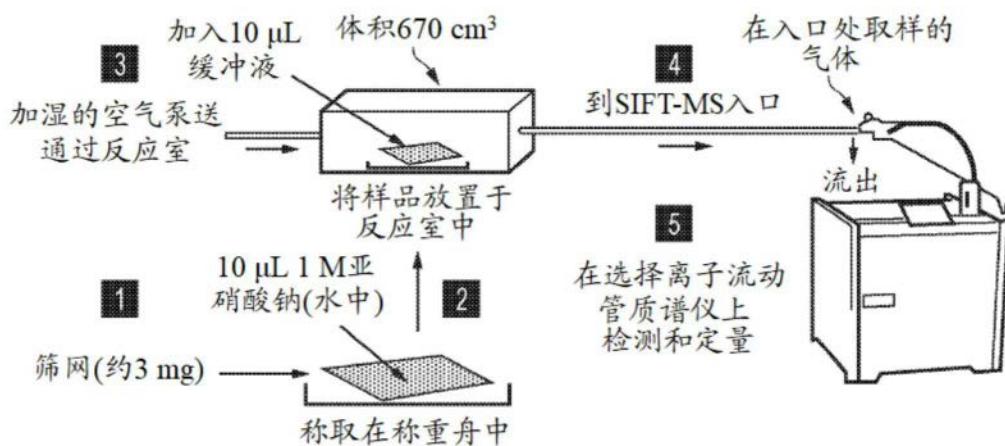


图17

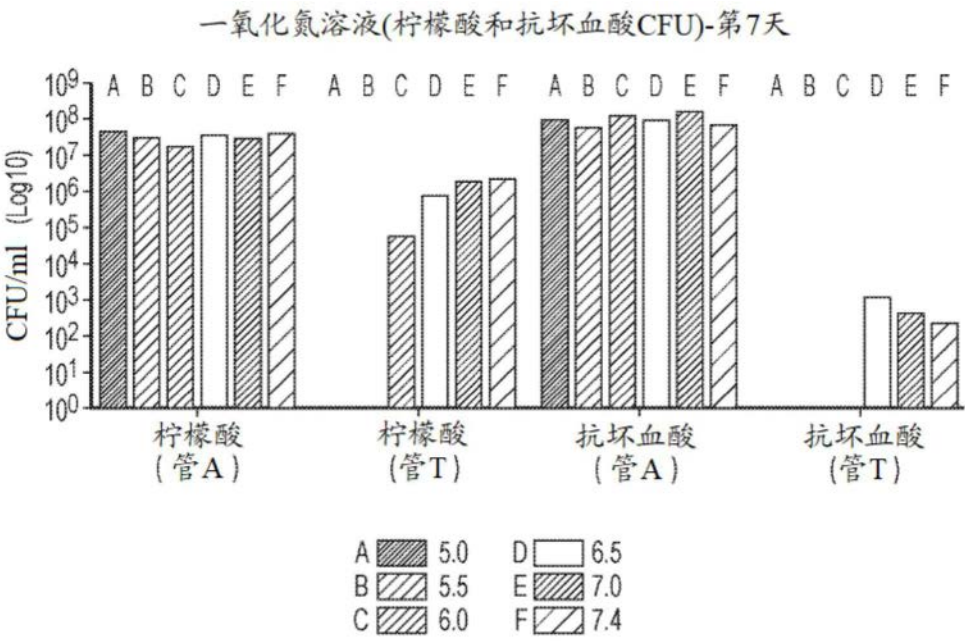


图18

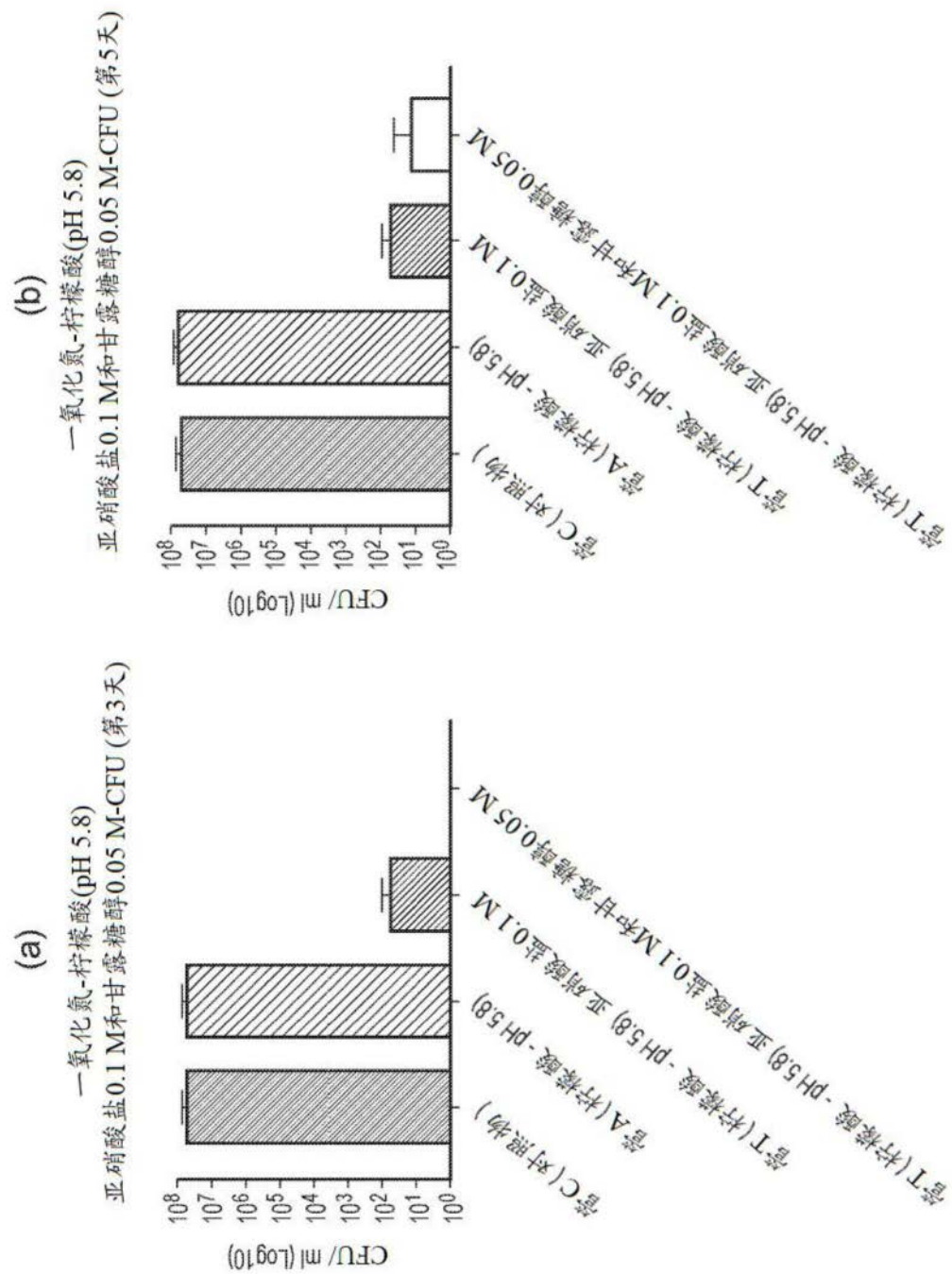


图19

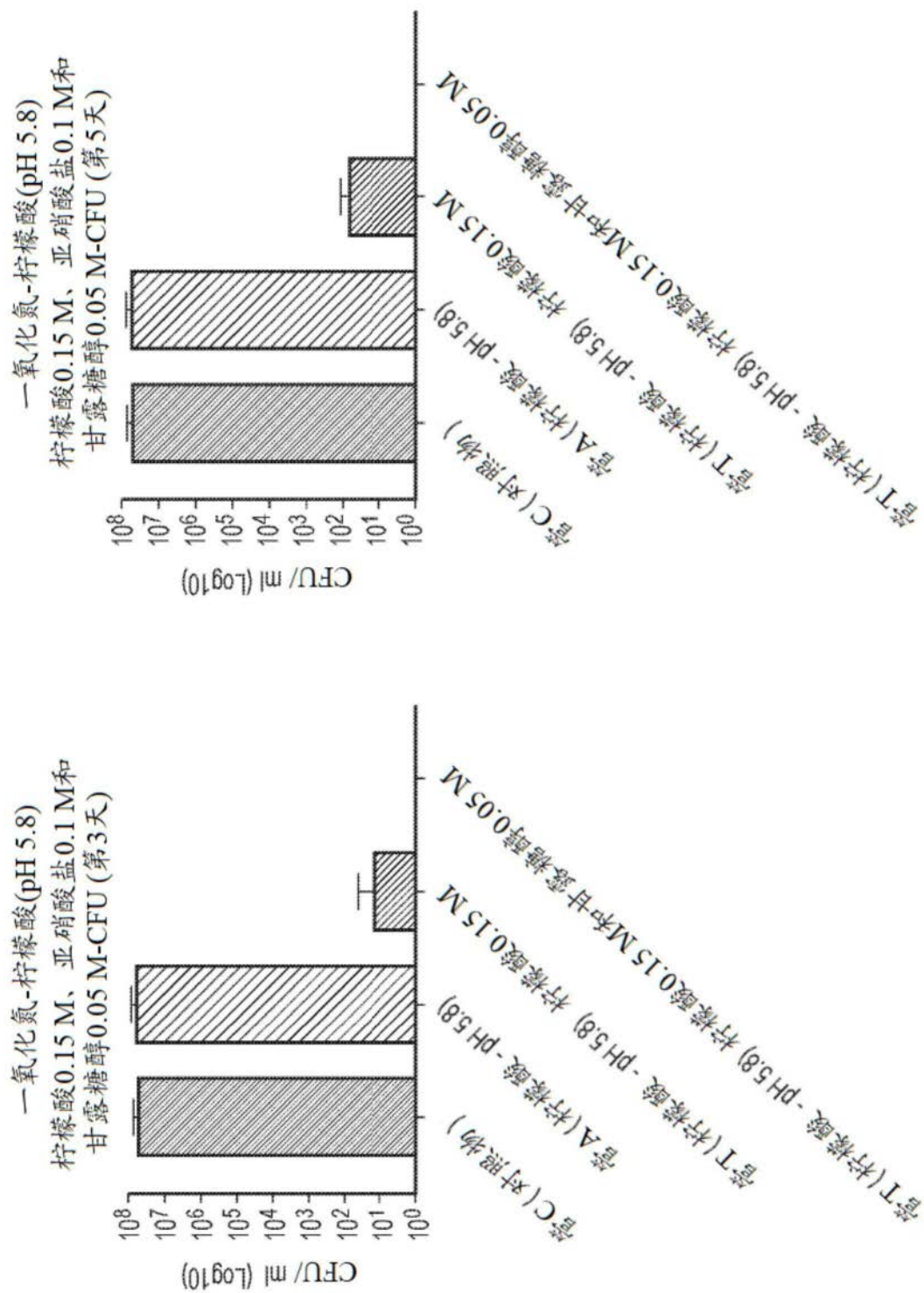


图20

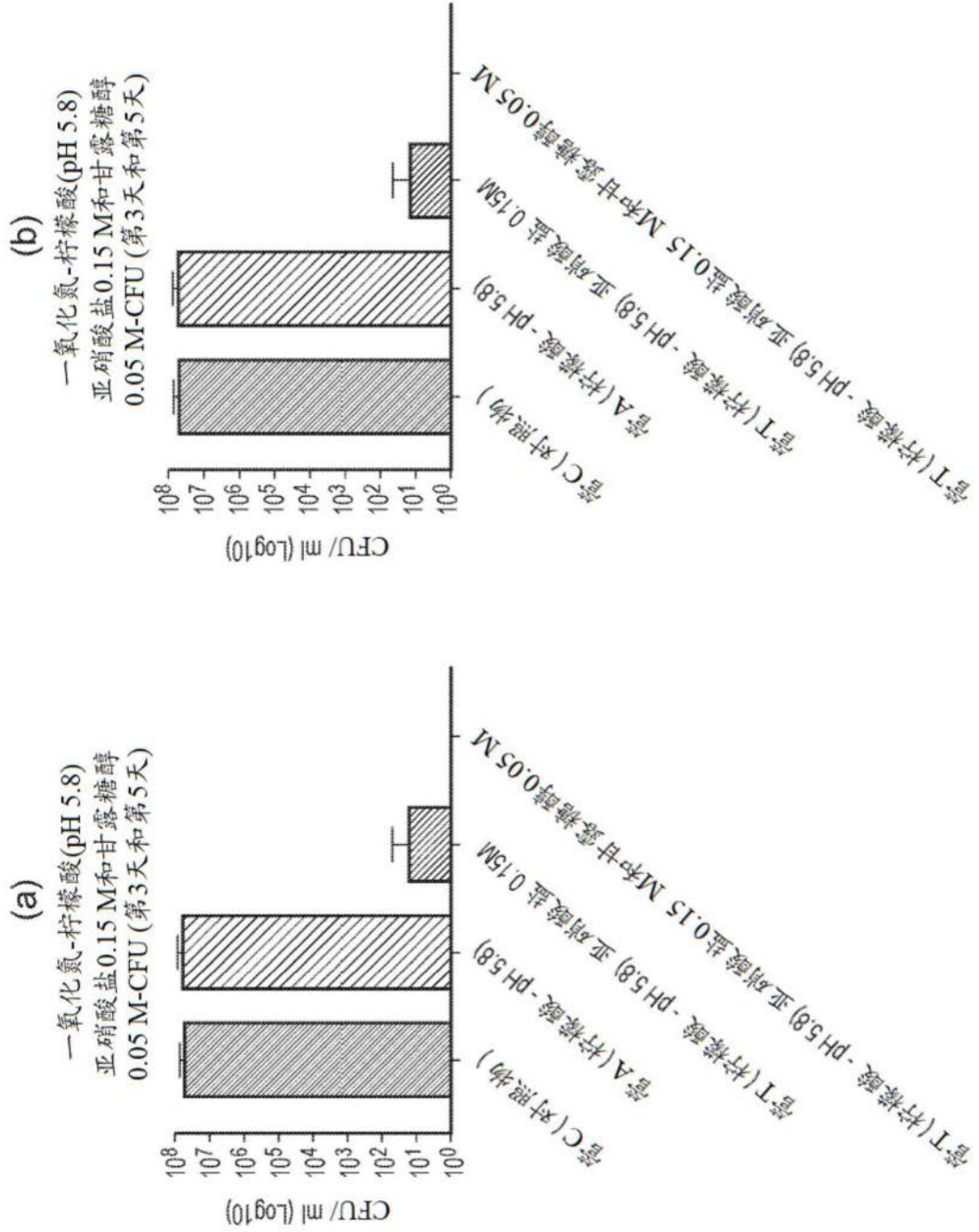


图21

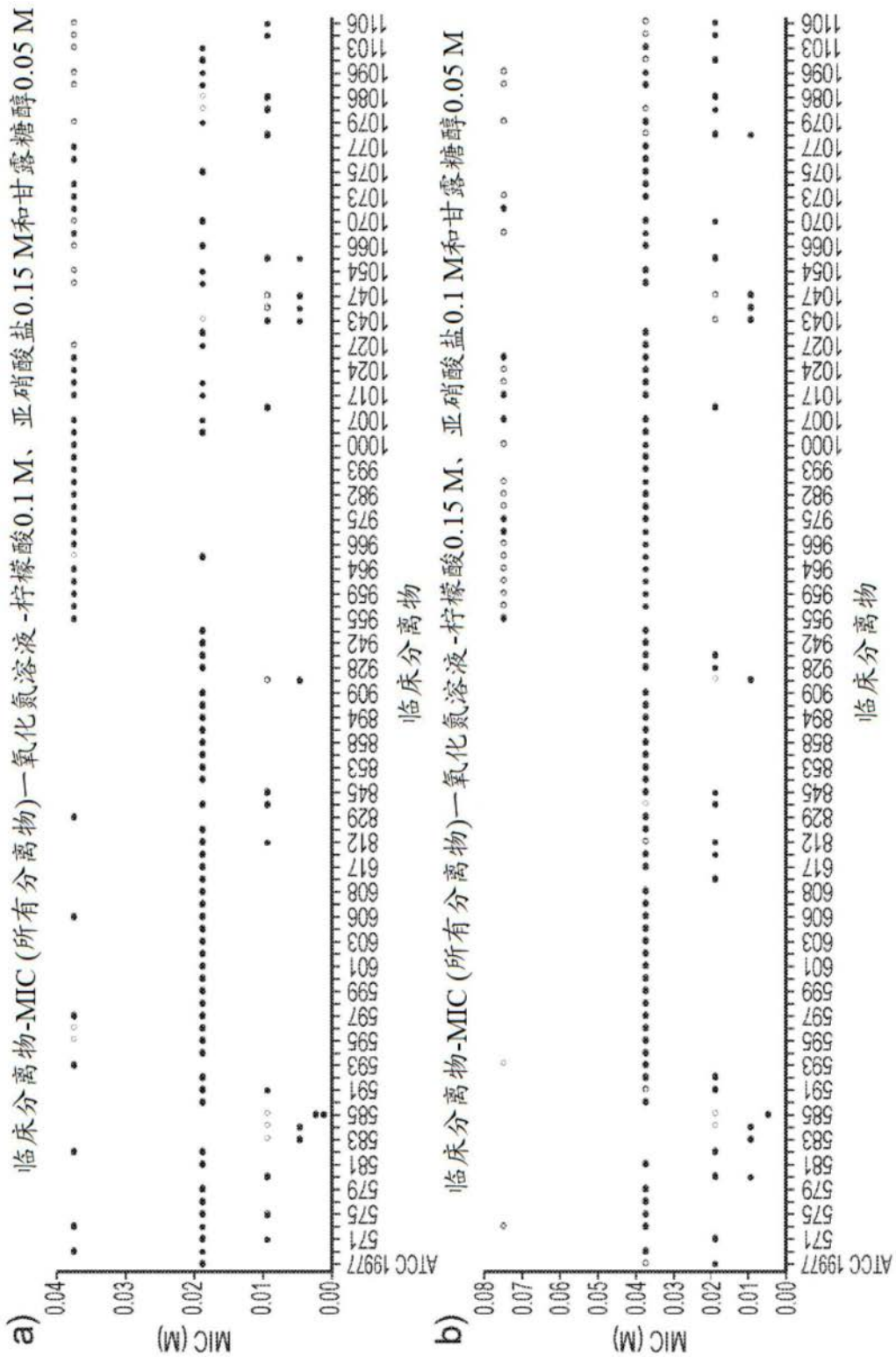


图22

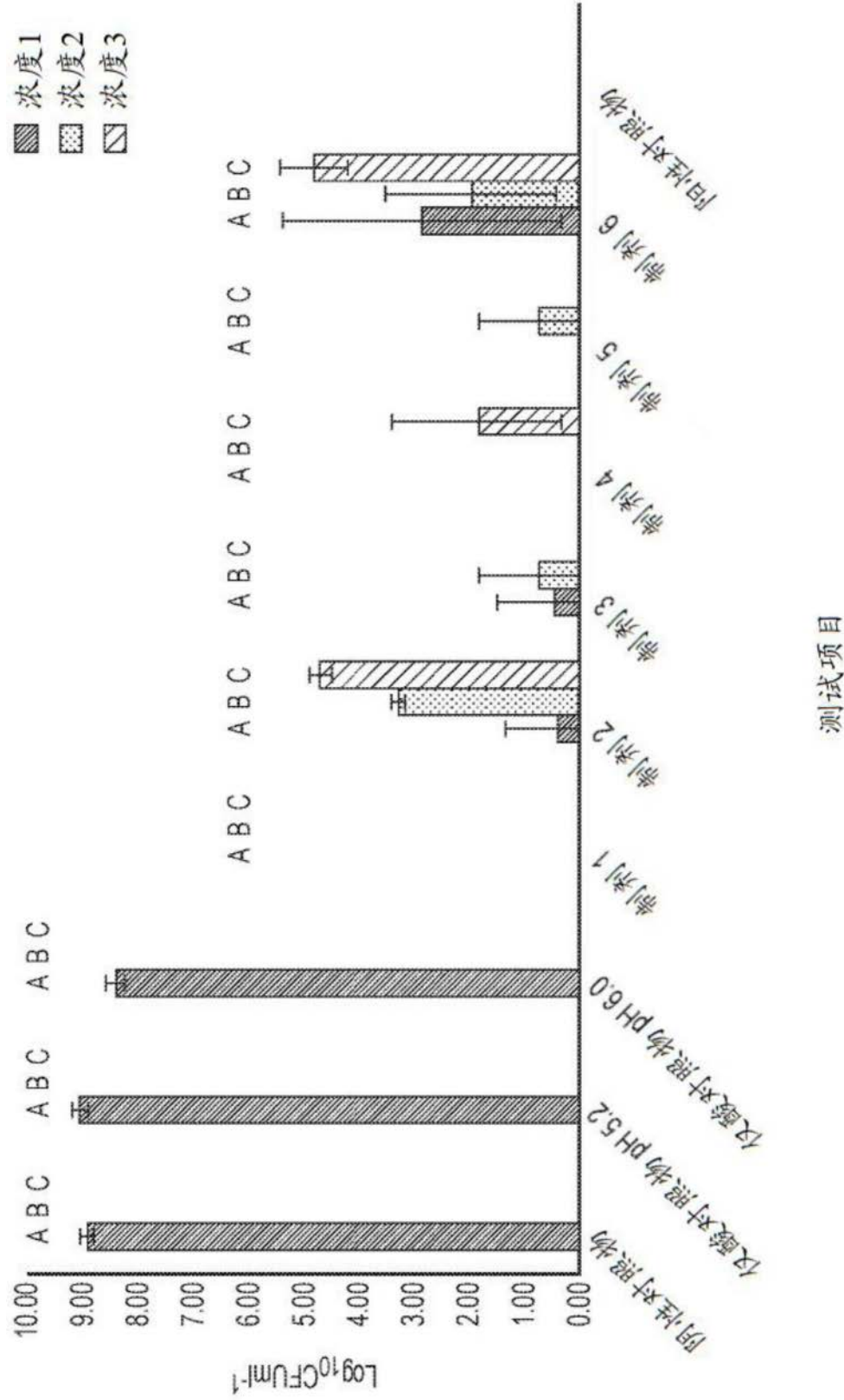


图23

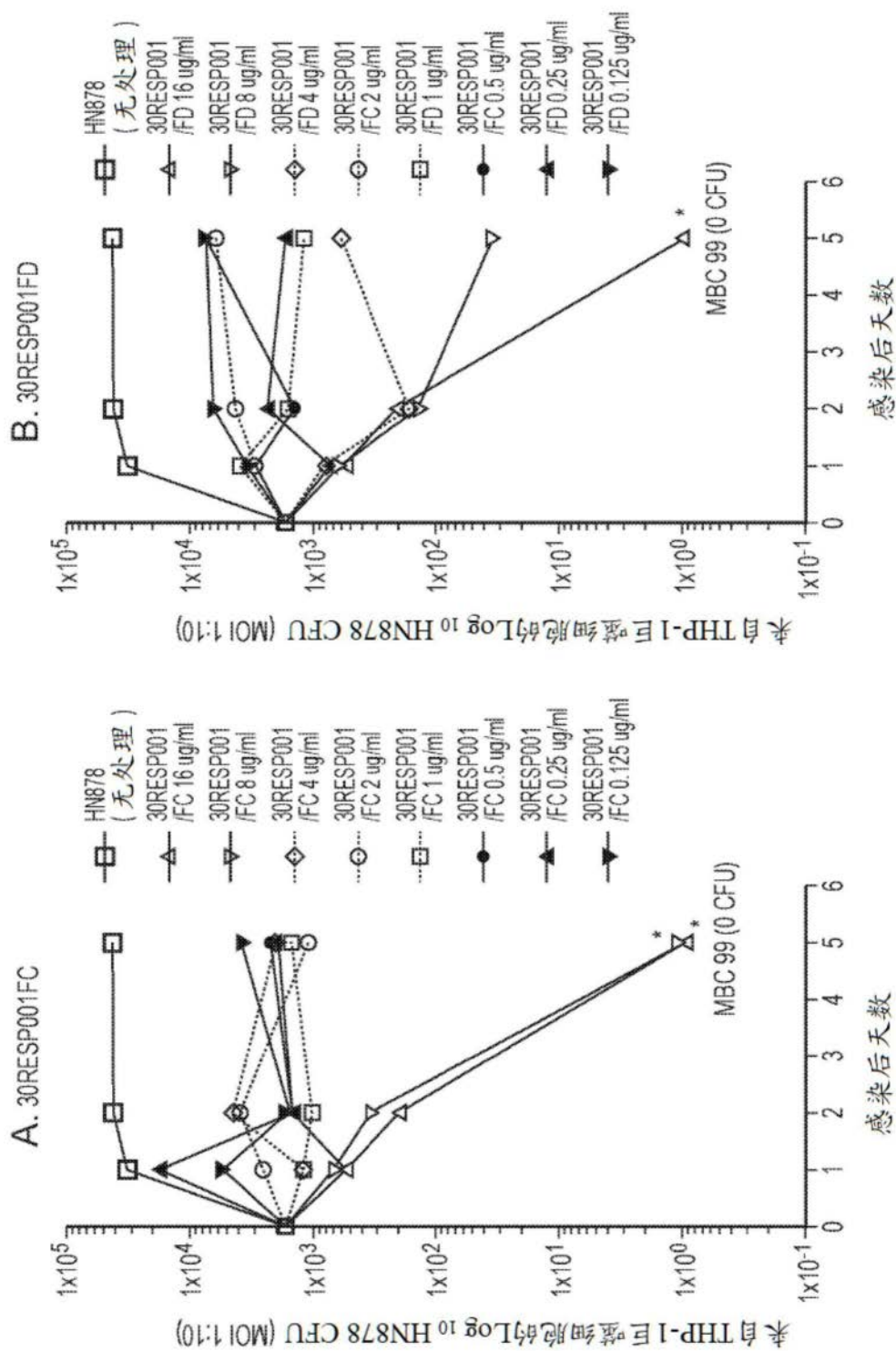


图24

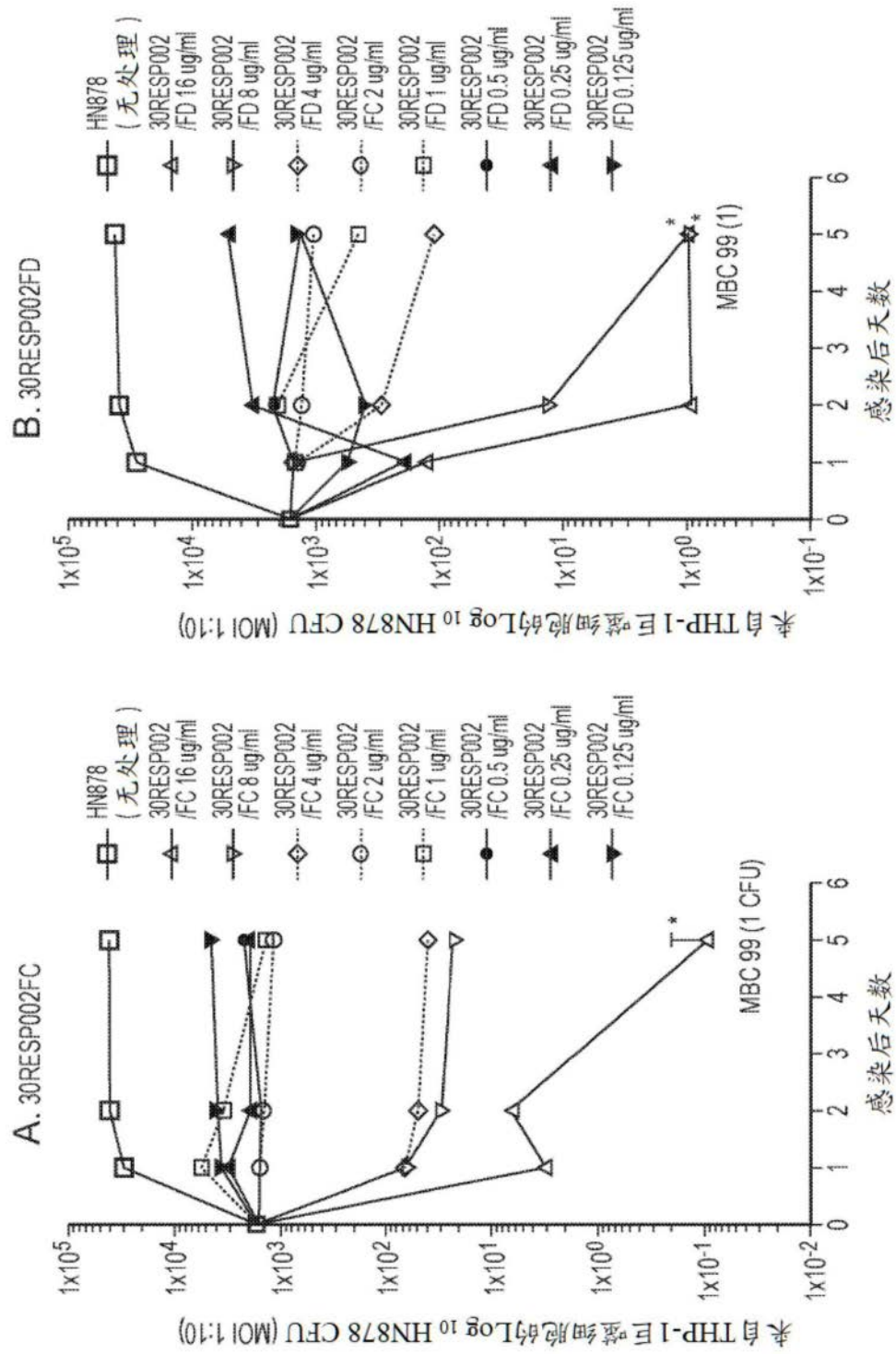


图25

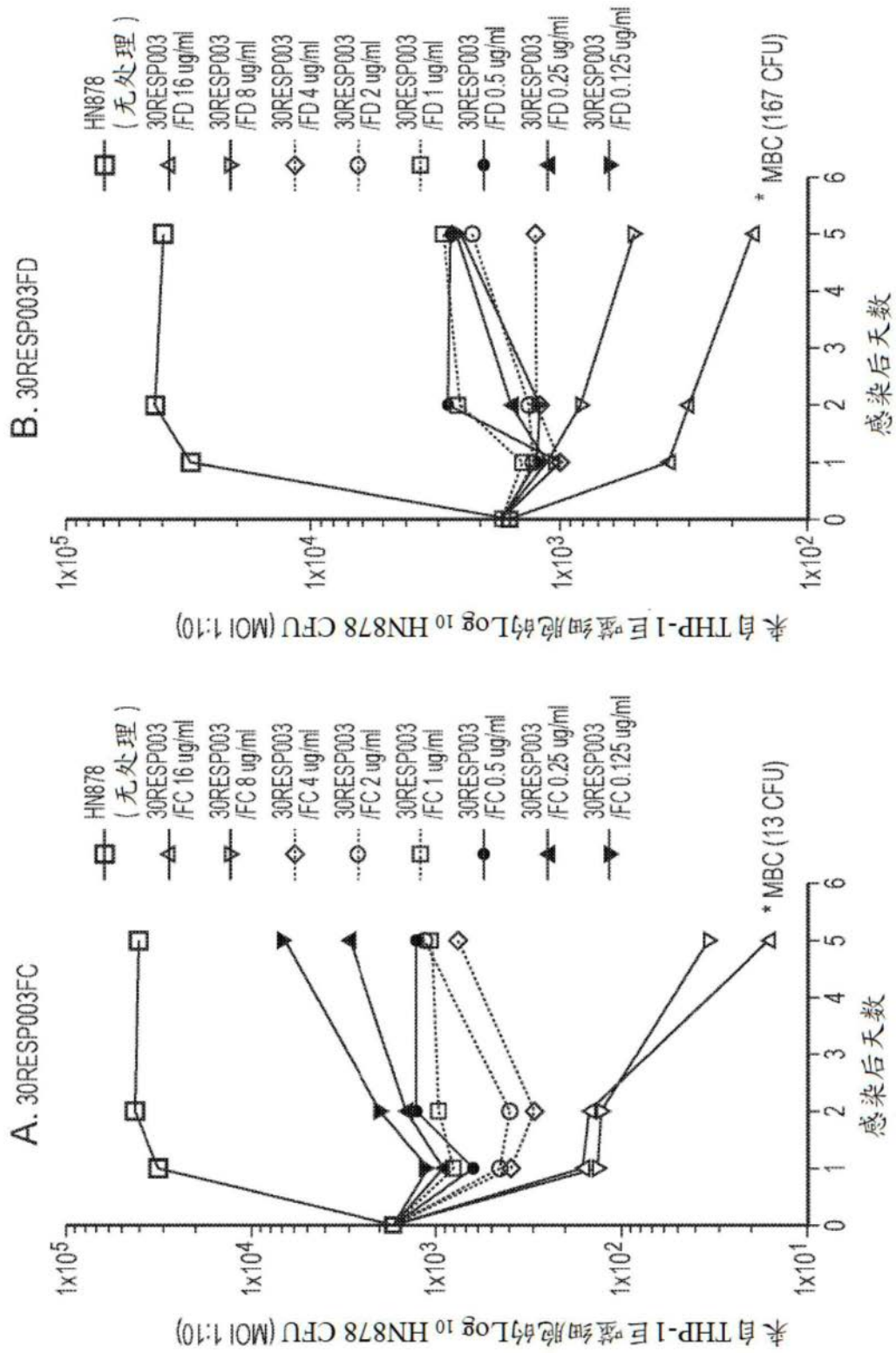


图26

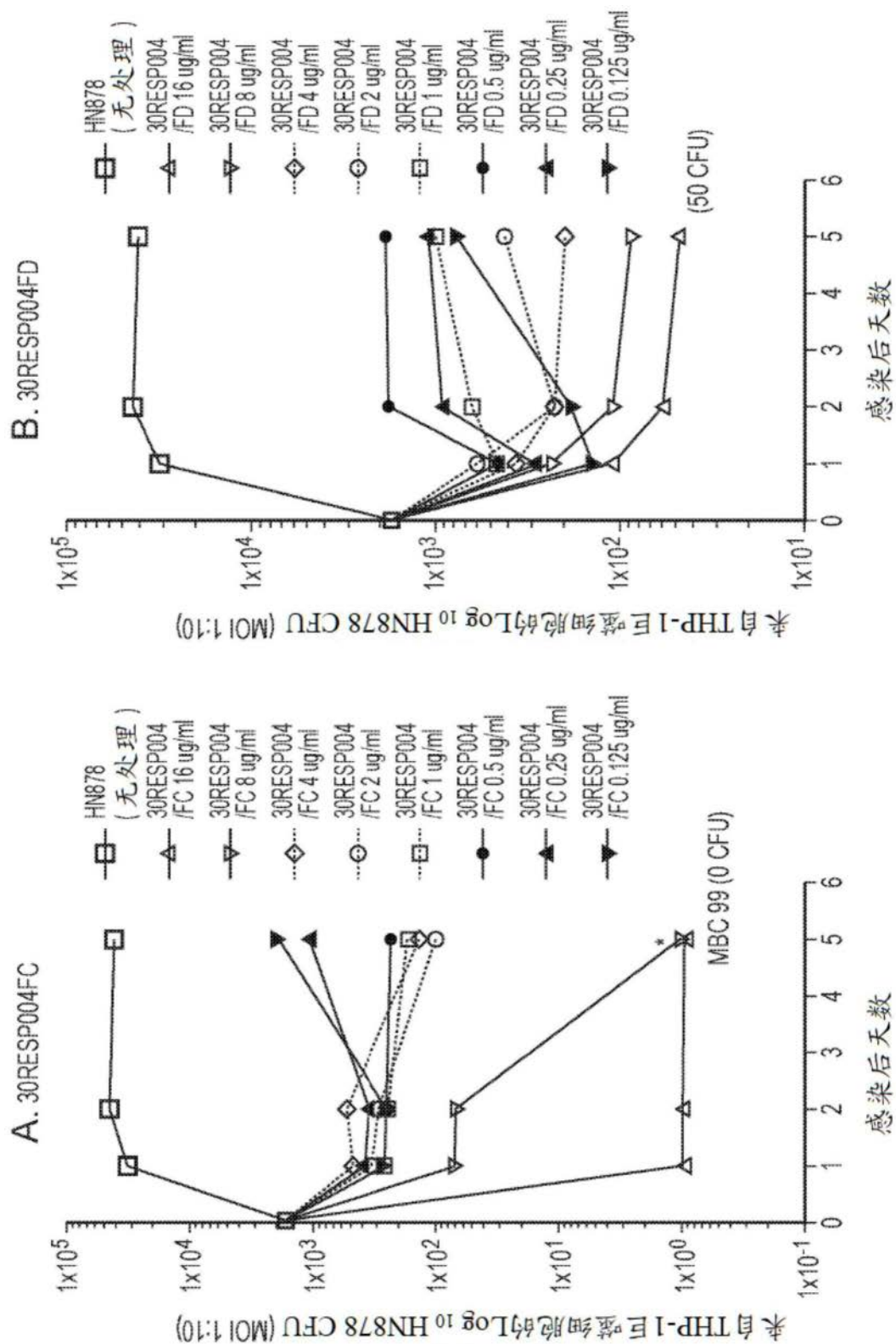
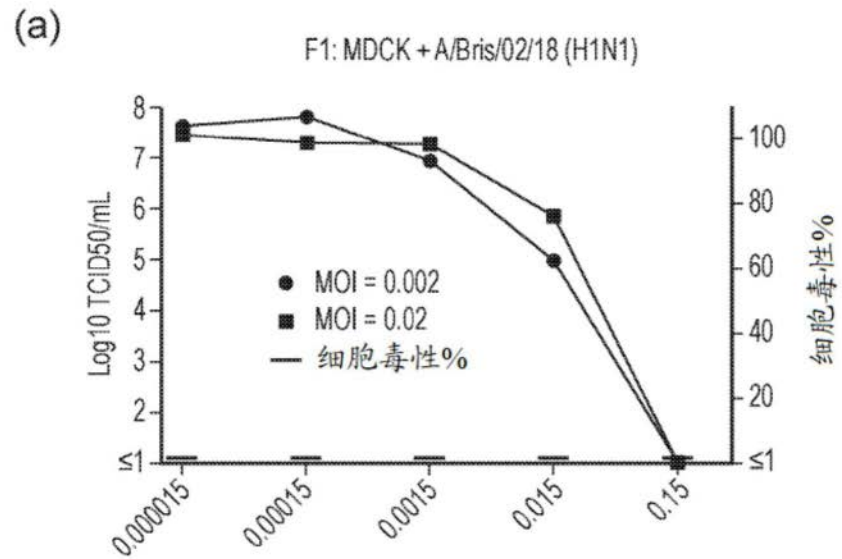


图27



(b)

亚硝酸盐	0.15	0.015	0.0015	奥司他韦	病毒
柠檬酸盐	0.1	0.01	0.001	(1μM)	对照物
甘露糖醇	0.05	0.005	0.0005		
	F1C1	F1C2	F1C3		
MOI = 0.002 ~SOPFU/ 30.000 细胞					
细胞毒性, ?????? 阳性对照物???? ?????????24小时)	16%	0%	0%	0%	NA

图28

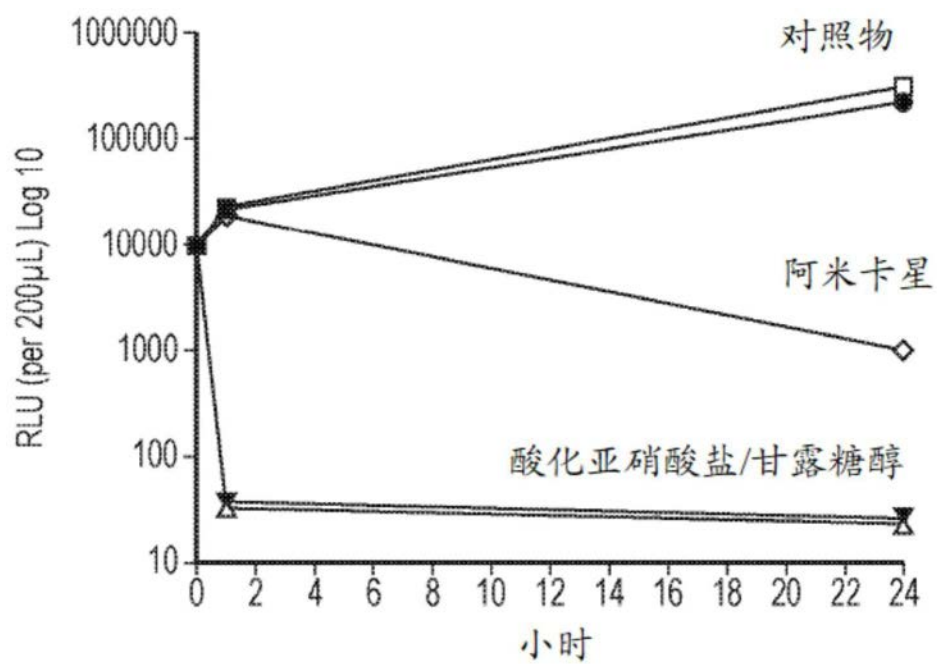


图29

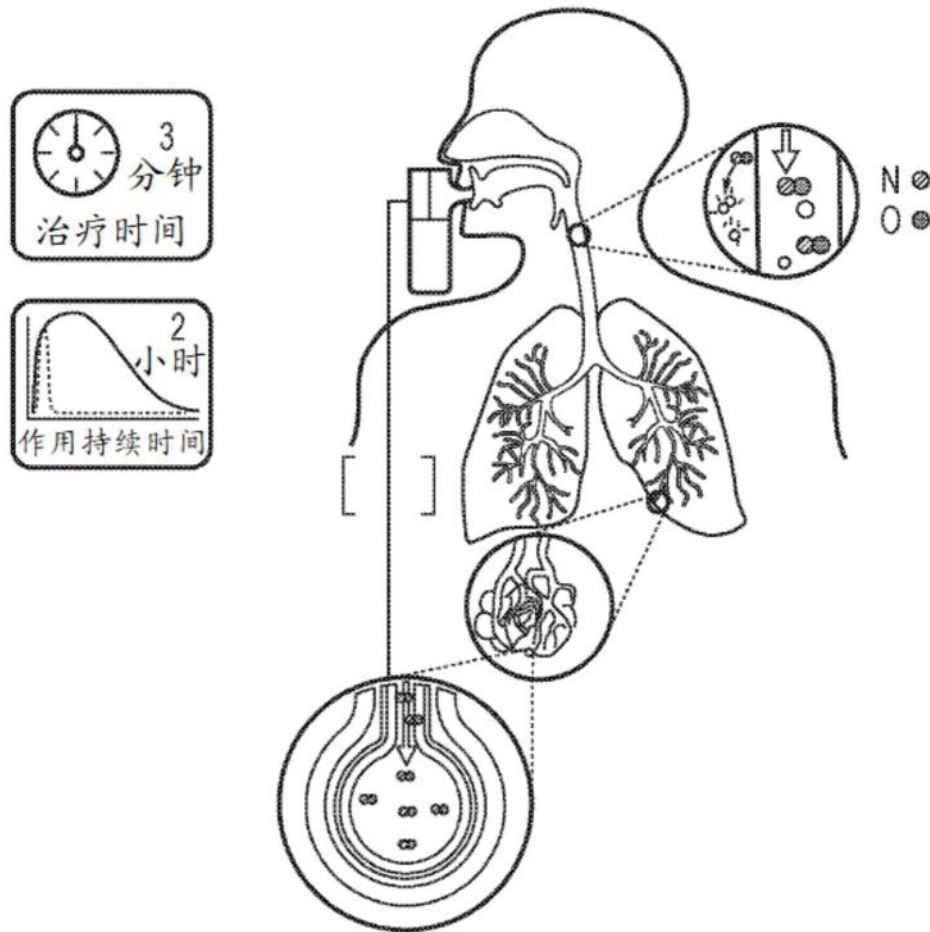


图30

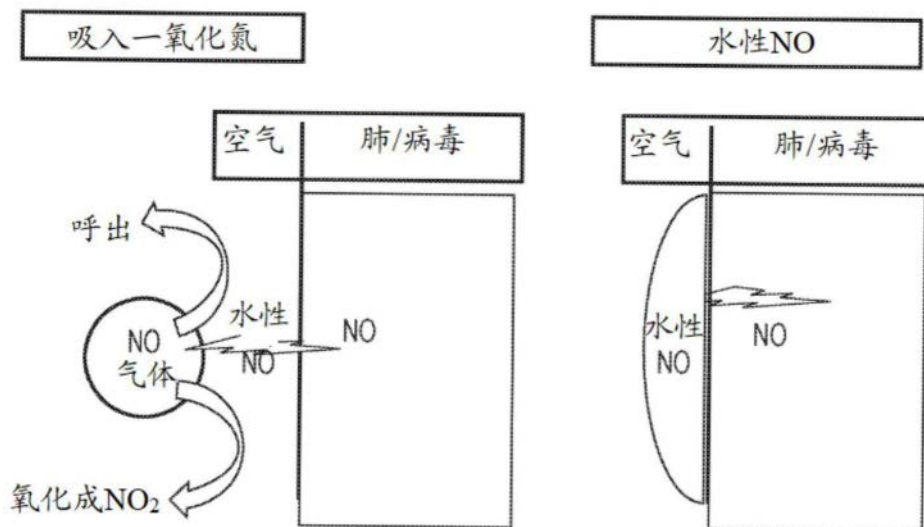


图31

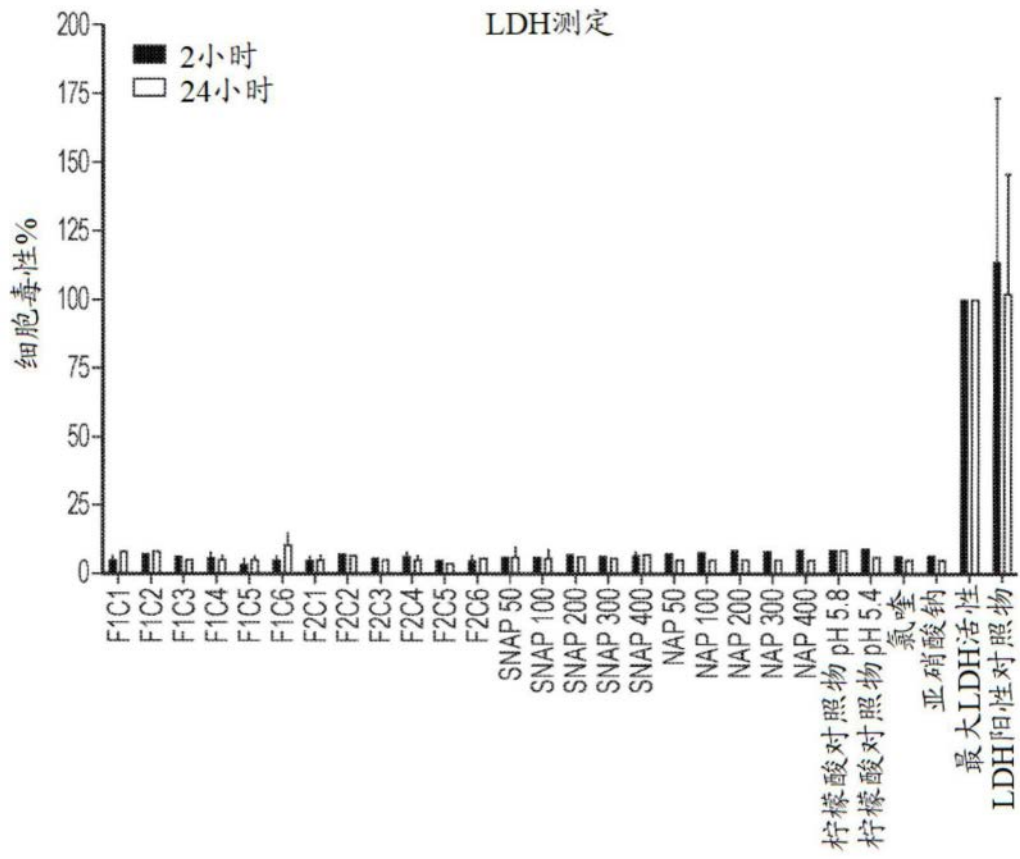


图32

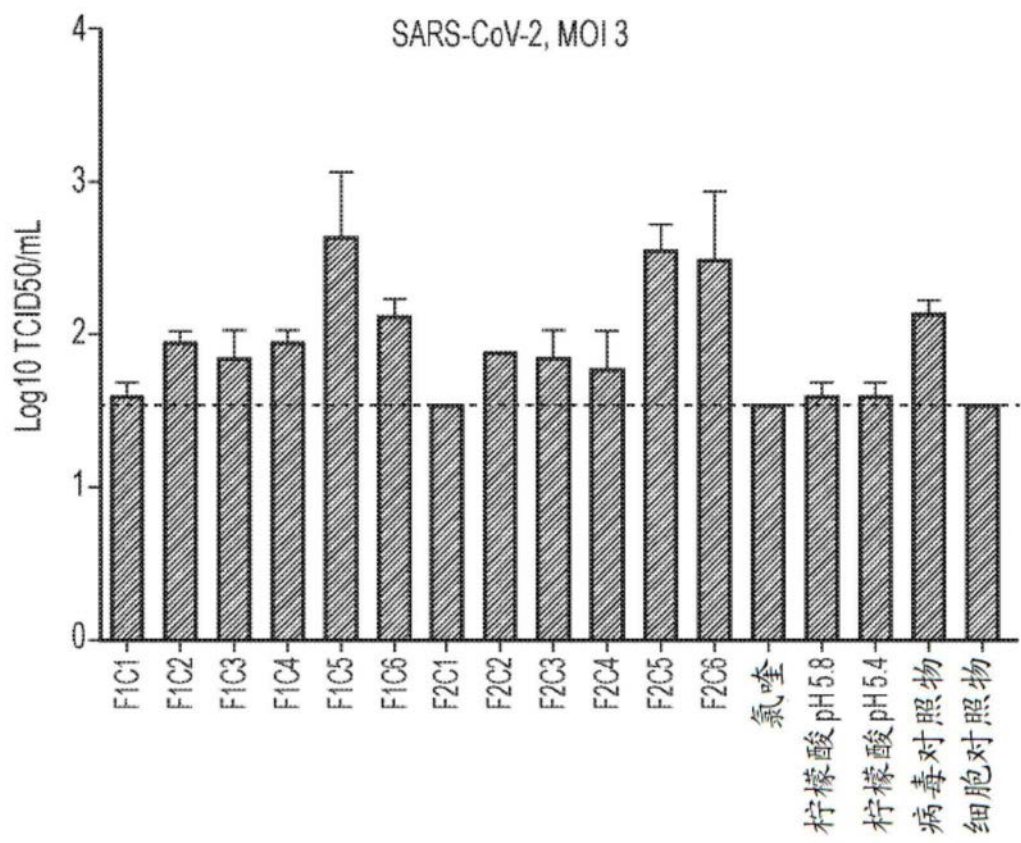


图33

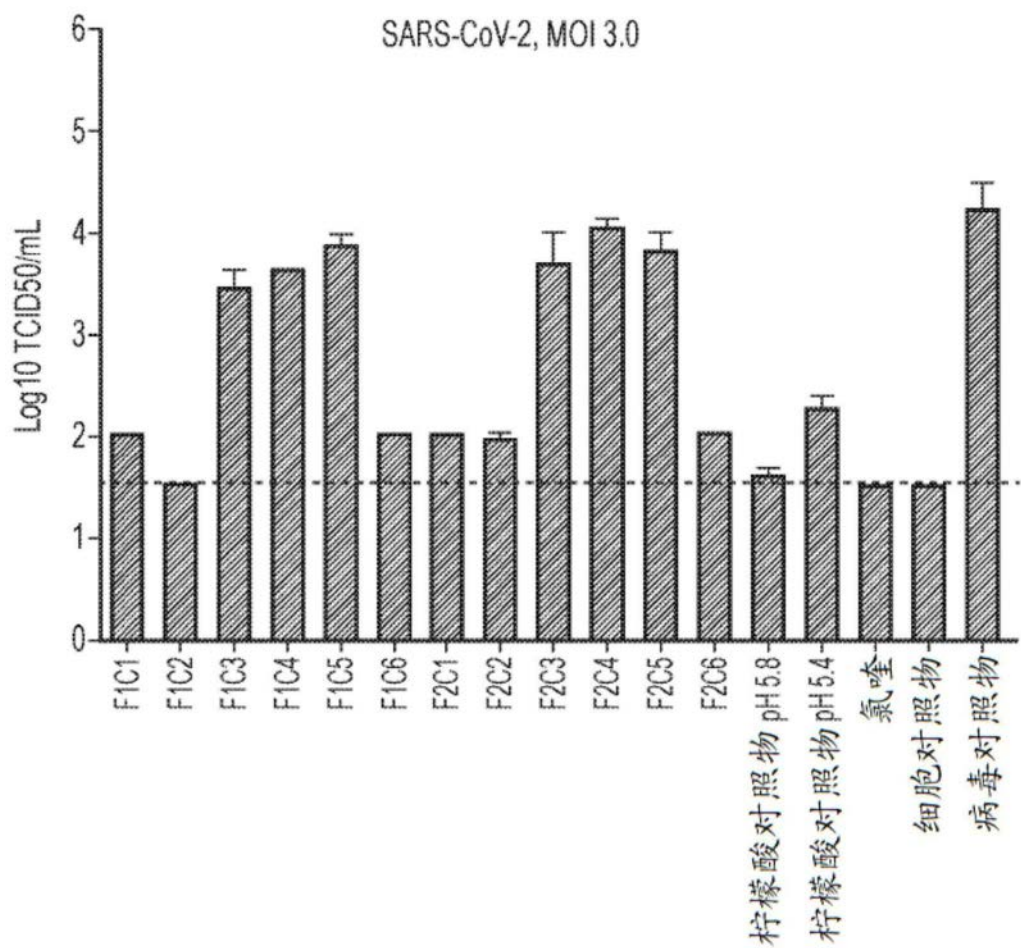


图34 (a)

