

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 33/00

A61K 47/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192199.1

[43]公开日 1997年3月5日

[11] 公开号 CN 1144484A

[22]申请日 95.2.17

[30]优先权

[32]94.2.21 [33]GB[31]9403284.4

[32]94.3.7 [33]GB[31]9404365.0

[86]国际申请 PCT/GB95/00338 95.2.17

[87]国际公布 WO95/22335 英 95.8.24

[85]进入国家阶段日期 96.9.23

[71]申请人 阿伯丁大学

地址 英国阿伯丁

[72]发明人 N·本杰明

H·多吉尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所
代理人 张 闾

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 用作抗微生物剂的酸化亚硝酸盐

[57]摘要

本发明涉及作为抗微生物剂的酸化亚硝酸盐的应用,描述了用于治疗细菌病、病毒病或真菌病的药剂形式。该药剂可以是与任意药物上可接受的载体配伍的形式,并含有降低环境 pH 的酸化剂。在本发明许多有效的应用中,已表明本发明组合物是特别有效的动物饲料添加剂及物品消毒剂。本发明还描述了这些应用中所使用的组合物和方法。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 用于治疗细菌病、病毒病或真菌病的药剂形式，其包括：
药学上可接受的酸化剂，
药学上可接受的亚硝酸根离子源或其硝酸盐前体；
以及药学上可接受的载体或稀释剂，其中酸化剂的存在量足以使使用环境的 pH 值降至低于 pH4。
2. 根据权利要求 1 的药剂形式，其中酸化剂是一种有机酸。
3. 根据权利要求 2 的药剂形式，其中酸化剂是水杨酸或抗坏血酸。
4. 根据前述任一权利要求的药剂形式，其中硝酸盐前体是碱金属或碱土金属硝酸盐。
5. 根据前述任一权利要求的药剂形式，其中药学上可接受的载体置于惰性乳膏或软膏中，其中所述酸化剂和所述亚硝酸根离子源分别置于不同的乳膏或软膏中以便在所使用的环境中混合释放硝酸根离子。
6. 根据权利要求 1 至 4 任一项的药剂形式，呈片剂或液体形式。
7. 一种消毒物品的方法，该方法包括如下步骤：
 - 1) 制备药学上可接受的酸化剂和药学上可接受的硝酸根离子源或其硝酸盐前体，
 - 2) 在与所说物品接触时，将所说酸化剂与亚硝酸根离子源在液体载体或稀释剂中混合，由此使 pH 降至小于 4 以释放出灭菌剂亚硝酸根离子来消毒所说物品。
8. 根据权利要求 7 的方法，其中所说酸化剂是一种有机酸。
9. 根据权利要求 8 的方法，其中所说有机酸是水杨酸。
10. 根据权利要求 7 - 9 任一项的方法，其中所说前体是碱金属或碱土金属硝酸盐。
11. 一种灭菌组合物，包括药学上可接受的酸化剂，
药学上可接受的亚硝酸根离子或其前体形式，
及药学上可接受的载体或稀释剂，其中酸化剂用来使使用环境的 pH 降至 4 以下。
12. 一种动物饲料添加剂，包括药学上可接受的酸化剂和药学上可接

受的亚硝酸根离子或其硝酸盐前体，用量足以对靶动物产生有利的抗菌效果但不足以产生副作用。

13.根据权利要求 12 的动物饲料添加剂，其中酸化剂选自水杨酸或抗坏血酸。

14.根据权利要求 12 或 13 任一项的动物饲料添加剂，其中亚硝酸根离子源为无机硝酸盐。

15.根据权利要求 14 的动物饲料添加剂，其中将该饲料添加剂用于猪，并且饲料中的无机硝酸盐以足以为成猪提供约 1 克/天的量存在。

说 明 书

用作抗微生物剂的酸化亚硝酸盐

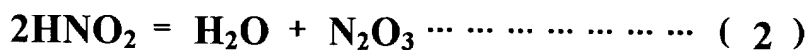
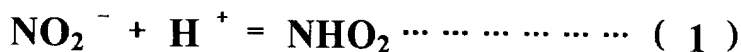
本发明涉及用作抗微生物剂的酸化亚硝酸盐。

虽然使用亚硝酸盐作为食品防腐剂已多年，但一直都未能阐明亚硝酸盐杀死微生物的机理。现在我们发现，当 pH 低于 4 时，低浓度的亚硝酸盐能有效地减少动物体上细菌、真菌和病毒的数量。我们认为，哺乳动物是采用这种机理来消灭所吞食的微生物的。

人体中活跃的肠 - 唾液循环使硝酸盐连续流入口腔中，口腔中舌上的细菌能使硝酸盐迅速还原为亚硝酸盐。分泌唾液硝酸盐的效果是提供亚硝酸盐分解产生氮的氧化物的前体。

简言之，我们已发现，将酵母菌白色假丝酵母 (Candida albicans) 和细菌大肠肝菌 (E.Coli) 暴露于唾液亚硝酸盐及类似于胃中酸性条件环境中 1 小时，会使存活的菌依赖于剂量而减少。因此，明显可知，在口腔中、胃肠道中特别是胃肠道上部由酸化的亚硝酸盐产生的氮的氧化物和/或亚硝酸能防止微生物感染。

在口腔中，细菌能使硝酸盐很快还原为亚硝酸盐。一旦亚硝酸盐被吞入，则胃中的酸性条件会使亚硝酸盐质子化而形成亚硝酸 (pKa 约为 3.5)。亚硝酸反过来分解形成氮的氧化物，如下所示。



由唾液腺活跃地将内源和食物中的硝酸盐浓缩，使其浓度比血浆中硝酸盐浓度高 10 倍多并将其分泌于唾液中。这样，唾液就会给胃肠道上部连续提供硝酸盐。口腔中硝酸盐向亚硝酸盐的转化很快，并且仅限于人的舌表面和鼠的舌后三分之一。

我们还不知道硝酸盐的这种肠 - 唾液间循环的作用是什么，但这有可能是胃酸本身并不总是足以消灭食入的众多微生物，唾液分泌硝酸盐

及向亚硝酸盐的转化的主要作用是作为胃中氮的氧化物的前体，这些氮的氧化物会杀死所食入的微生物。

上述机理也适用于消灭皮肤上的微生物。例如脚癣。

我们已发现，惰性载体乳膏或软膏中浓度达 4 % 的亚硝酸盐当与水杨酸这样的有机酸混合时，会反应生成氮的氧化物，有效地杀死皮肤上的传染性生物体，包括真菌、酵母菌、细菌和病毒。由于氮的氧化物的释放，亚硝酸与酸的结合会在皮肤上引起轻微的红斑（红色）产生，但这不会引发严重的炎症。

上述机理也适用于对物品的消毒，如使用灭菌硝酸盐溶液对托牙进行消毒。有效消毒托牙的常规溶液由于主要含氯消毒剂，通常口感味道不好。亚硝酸盐和酸结合形成的灭菌溶液没有什么味道或根本没有味道。可以用同样方式对其它物品如隐形眼镜进行消毒。

胃肠炎一直是饲养猪及其它饲养动物的主要疾病。肠病原大肠杆菌（Escherichia coli）（尤其是那些带有 K88 抗原的）是主要因素。虽然胃酸被认为是一种主要的宿主防御体系，其能提供防御因食物引起感染的屏障，但这显然在预防生物体到达动物肠的较远端时是没有效用的。

因此，本发明第一方面是提供一种治疗细菌病、病毒病或真菌病的药剂形式，其包括：

药学上可接受的酸化剂，

药学上可接受的亚硝酸根离子源或其硝酸盐前体，以及

药学上可接受的载体或稀释剂，其中酸化剂用来使应用环境 pH 值降至 pH4 以下。优选酸化剂为有机酸，例如水杨酸或抗坏血酸。亚硝酸根离子的前体可以是碱金属或碱土金属的硝酸盐，在酶的作用下它们能转化为硝酸盐。

药学上可接受的载体或稀释剂可以是惰性乳膏或软膏。本发明特别优选的形式中，酸化剂和亚硝酸根离子源或其前体分别处于所说乳膏或软膏中，在使用环境中将其混合释放出亚硝酸根离子。

也可将酸性组合物制成片剂或液体形式，用于给药。

本发明的另一方面是提供消毒物品的方法，该方法包括以下步骤：

1) 制备药学上可接受的酸化剂和药学上可接受的亚硝酸根离子源，

2)在与所说物品接触时,将该酸化剂与亚硝酸根离子源在液体载体或稀释剂中混合,使 pH 降至低于 4,使所说消毒剂亚硝酸根离子消毒所述物品。

本发明另一方面是提供一种消毒剂组合物,包含药学上可接受的酸化剂,

药学上可接受的亚硝酸根离子源或其硝酸盐前体,

以及药学上可接受的载体或稀释剂,其中酸化剂用来使用药环境 pH 值降至 pH4 以下。

本发明另一方面是提供动物饲料添加剂,包含药学上可接受的酸化剂和,

药学上可接受的亚硝酸根离子源或其硝酸盐前体,其用量足以产生有利的抗菌药理效果,但不致对靶动物形成副作用。

酸化剂可以是上述的水杨酸或抗坏血酸,亚硝酸根离子源或其硝酸盐前体可以是上述的无机硝酸盐。当动物为猪时,所用添加剂的量应足以保证每只成年猪得到的平均剂量为 0.3 至 5.0 克/天,优选约为 1 克/天。

通过解释说明,结合下述实施例及说明书附图来描述本发明。

图 1 表明了暴露于硝酸盐及不同氢离子浓度中,对白色假丝酵母 (*C.albicans*) 存活的影响效果,其中纵轴是光密度值,以吸光度为单位,横轴是 pH。

图 2 是大肠杆菌暴露于酸中或者亚硝酸盐和酸中的生长曲线,其中纵轴是以吸光度为单位的光密度,横轴是以小时为单位的时间。

图 3 是大肠杆菌暴露于 pH3 不同浓度亚硝酸盐中的生长曲线,其中纵轴是以吸光度为单位的光密度,横轴是以小时为单位的时间。

图 4 表明在不同酸度水平时由亚硝酸钠生成氮的氧化物,纵轴为氧化氮的浓度 (nM),横轴是 pH。

实施例 1

参见图 1,白色假丝酵母的单一菌落被接种于沙氏 (Sabouraud's) 肉汤过夜培养。将 10 μ l 该肉汤加入至 940 μ l 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲的沙氏肉汤中,其中加入亚硝酸钠 (50 μ l; 终浓度 250 μ M) 或蒸馏水作为对照。37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时后,移出 10 μ l,连续振

荡条件下于 96 孔微滴板于 37 °C 下在 190 μ l 标准沙氏肉汤中培养 (Gallenkamp 定轨培养箱)。以一定时间间隔在 570nm 下测定光密度值来监测生长情况。结果为 16 个单独实验的平均值。

暴露于亚硝酸盐和不同氢离子浓度中对白色假丝酵母存活率的影响效果示于图 1。空心柱表示仅暴露于酸中 1 小时后用光密度法测定的白色假丝酵母的生长情况, 封闭柱表示暴露于酸和 250 μ M 亚硝酸钠后的生长情况。与对照样显著不同, $P > 0.05$ (Mann-Whitney U 检验)。明显可见, 将白色假丝酵母仅保温于酸中一小时, 对随后生长的活生物体数目没什么影响; 而加入 250 μ M 亚硝酸盐由于 pH 值减至低于 4, 杀死的白色假丝酵母增多。实际上, 对高于 250 μ M 的所有浓度(数据未示出), 在 pH1 时亚硝酸盐能有效地消灭白色假丝酵母。在 pH 升至 5 时, 5nN 亚硝酸盐能杀死白色假丝酵母。很显然, 对 10 名实验人员进行一项随机试验, 正常饮食中唾液亚硝酸盐限于 23 至 220 μ M (平均 114 μ M), 食入 200mg 硝酸钾溶液 45 分钟后, 亚硝酸盐升为 409 至 1890 μ M (平均 1030 μ M)。

实施例 2

图 2 表示大肠杆菌仅暴露于酸中(空心符号)或者酸和 250 μ M 亚硝酸盐中(封闭符号)之后的生长曲线。与对照样相比, 在亚硝酸盐存在且 pH 为 2、3、4 时生长情况明显受破坏 ($P < 0.05$)。

实验方法与图 1 所用的相似, 所不同的是使用大肠杆菌(生长于 MacConkey's 琼脂上的 NCTC10418 株)和用营养肉汤(Oxoid CM1)代替沙氏肉汤。图 2 所示结果为 20 个实验的平均值。正如图 2 所示, 大肠杆菌对酸比白色假丝酵母更敏感。然而, 暴露于 pH2 中 1 小时不会杀死所有的生物体, 因为这些生物体能在营养肉汤中大量生长。pH3 时许多生物体能存活。向暴露的培养基中加入 250 μ M 亚硝酸盐, 在 pH2 时能减少大肠杆菌数量, 在 pH3 和 pH4 时能明显减少这一生物体的存活率。在高于 pH4 时此浓度下的亚硝酸盐没有效果。

实施例 3

图 3 表示大肠杆菌暴露于 pH3 不同浓度亚硝酸盐(10 - 1000 μ M 终浓度)中的生长曲线。方法与图 2 中使用的相同。图 3 表示 pH3 时亚

硝酸盐对大肠杆菌的毒性效果与硝酸盐浓度间存在一直接的关系。即使在 $10 \mu\text{M}$ 时也有着看得出的效果，而 1mM 能彻底杀死大肠杆菌。

实施例 4

图 4 表示不同酸度时由亚硝酸钠 (μM) 产生的氧化氮。条件与图 1 中生物体暴露的环境条件相同。特别是要将亚硝酸盐加入柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液中以达到图 4 所示的终浓度。用氧化氮敏感仪 (ISO-NO, World Precision Instruments) 与 Maclab 采集系统和 Macintosh 计算机连接, 测定缓冲液中的氧化氮浓度。连续记录测量值, 当氧化氮浓度达到稳态时 2 分钟读一次读数。图 4 表示出随 pH 减小氧化氮的释放。在图 4 实验条件下产生的我们示出的氧化氮很快扩散穿过细胞膜, 对含铁-硫的呼吸酶具有高亲和性, 并破坏细菌的 DNA。当被激活的白细胞酶促产生亚硝酸时, 亚硝酸会杀死 *Leishmania sp.*、葡萄球菌属 (*Staphylococcus sp.*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella sp.*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*) 及白色假丝酵母 (*C.albicans*)。酸性条件下与超氧化物的反应还可以产生高反应性的羟基。

实施例 5

实验中, 对脚部患有真菌感染的 9 名志愿患者使用 2% (W/W) 的水杨酸和 2% (W/W) 亚硝酸钠的结合物, 研究这一结合物的效果。治疗两周后, 除 1 名病人外所有患者接受治疗后均被治愈。症状评分 (源自评分系统, 检测红斑、水疱、脓疱、脱皮、结壳和瘙痒症状) 在治疗前平均值为 7, 治疗后平均值为 2。

实施例 6

对硝酸盐或亚硝酸盐的用途进行研究, 口腔局部给药, 制成牙膏、漱口药或其它口服可接受的载体形式, 用来减少牙斑上产生龋的生物体的数量及抑制白色假丝酵母或其它有害生物体的感染, 结果表明硝酸盐或亚硝酸盐的使用是有效的。

在类似胃中条件下亚硝酸盐非酶促产生氮的氧化物能杀死白色假丝酵母和大肠杆菌, 这一效果对肠道也是如此。大肠杆菌与沙门氏菌 (*Salmonella*)、志贺氏菌 (*Shigella*) 和其它病原肠菌密切相关; 这些都是在哺乳动物中引起胃肠炎的重要原因。

这些结果提供了由唾液腺活跃分泌硝酸盐的理论。硝酸盐本身是没有毒性作用的前体，当被转化为亚硝酸盐且置于酸性条件下，便形成杀微生物的物质。食用糖后乳芽孢杆菌属（*Lactobacilli* sp.）能在口腔中瞬时产生足够的酸，抑制口腔病原菌的生长，但很明显，适量摄入硝酸盐，尽管存在成为亚硝胺的前体的可能，但在任何被污染的环境条件下都可以是所需要的前提条件。

并且，如果能转化硝酸盐为亚硝酸盐的口腔菌丛在治疗之后受广谱抗生素的抑制，则肠道中氮的氧化物的产生可能是不够的。同样，如果产生的胃酸减少，或大大依赖于叶用蔬菜的硝酸盐摄入量降低，那么这种防护机制就会受破坏。这就是易形成口腔和肠内感染的情况。

虽然上述研究均是集中于白色假丝酵母和大肠杆菌及其它所述有机体，但该研究结果对于预防其它危险的肠病原菌也是很重要的，其中当这些肠病原菌如 *Helicobacter pylori* 被食入时会引起十二指肠溃疡、阿米巴性痢疾和慢性肠道寄生物感染。所以，本发明提供了治疗细菌病、病毒病或真菌病的剂量形式、对物品进行消毒的方法以及药物组合物。

上文所述说明了通过在饲养猪的日常饮食中加入一定的硝酸盐而不需使用抗生素来预防胃肠炎的廉价和简单的方法。

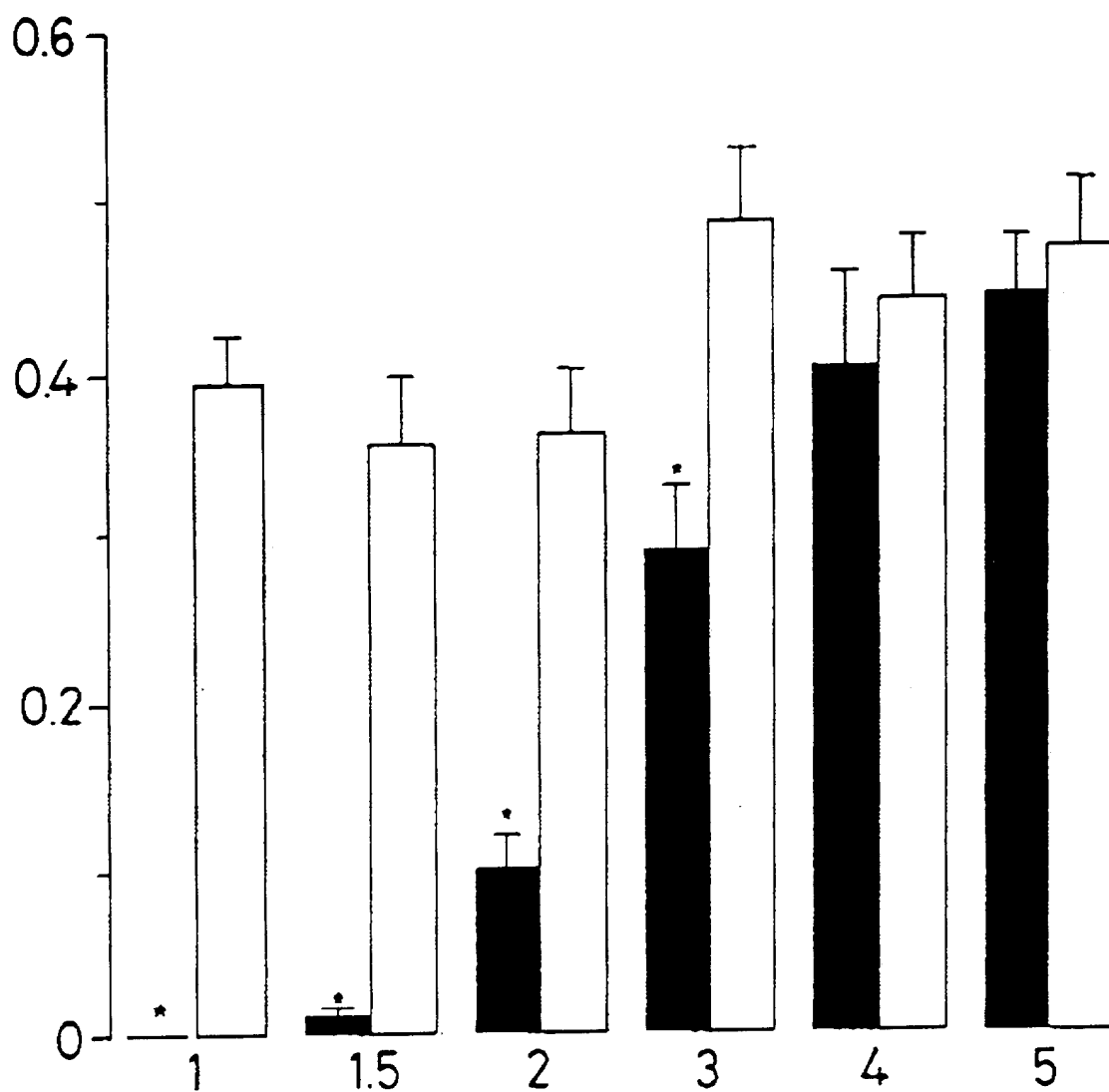


图 1

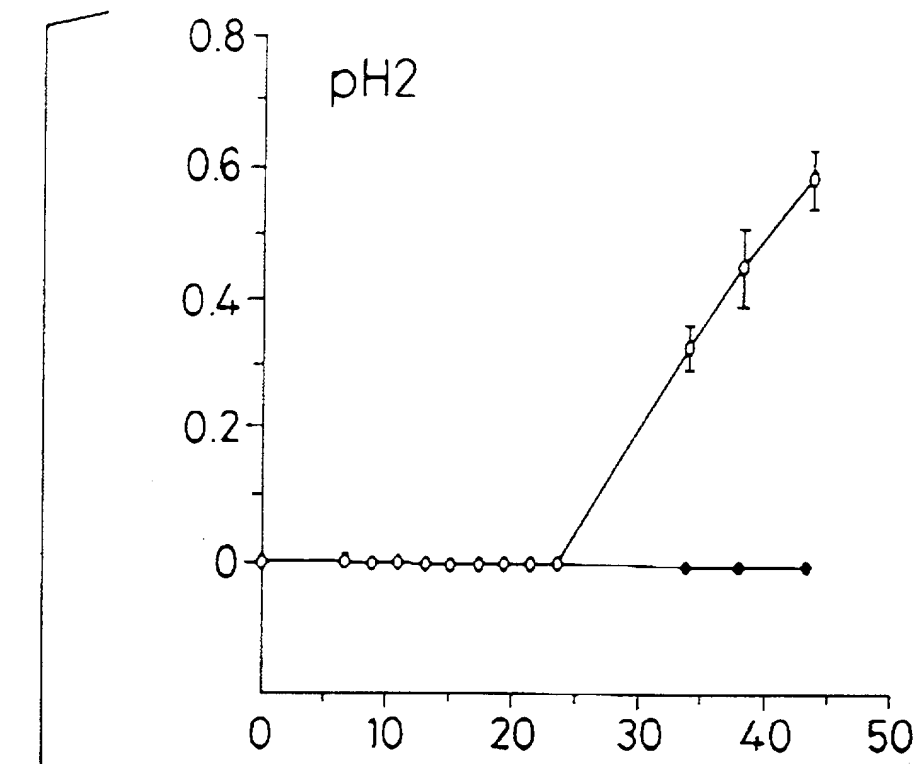
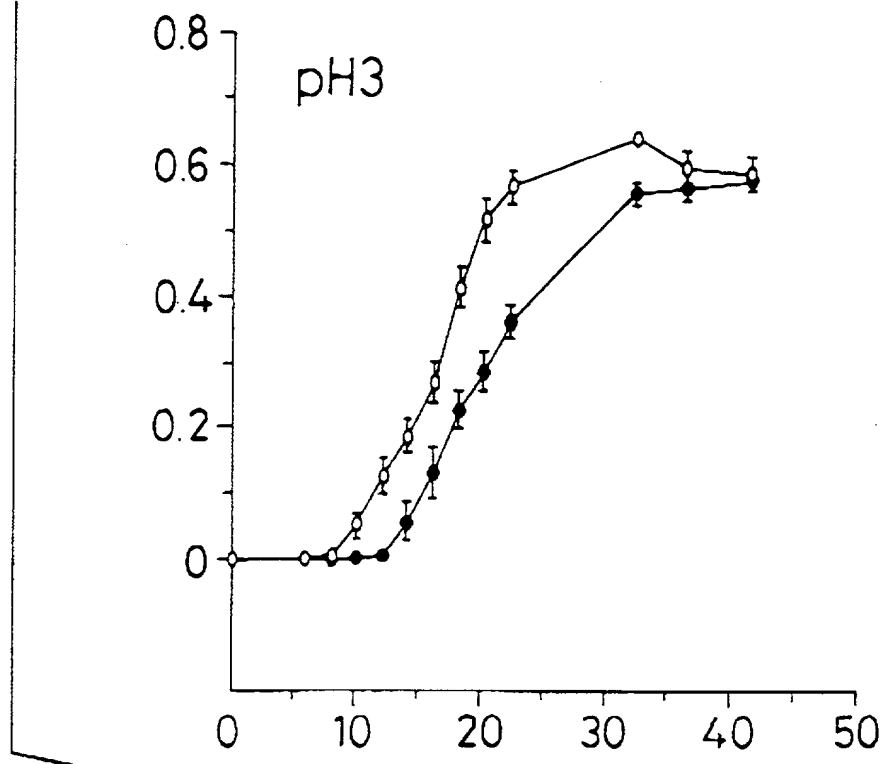


图 2



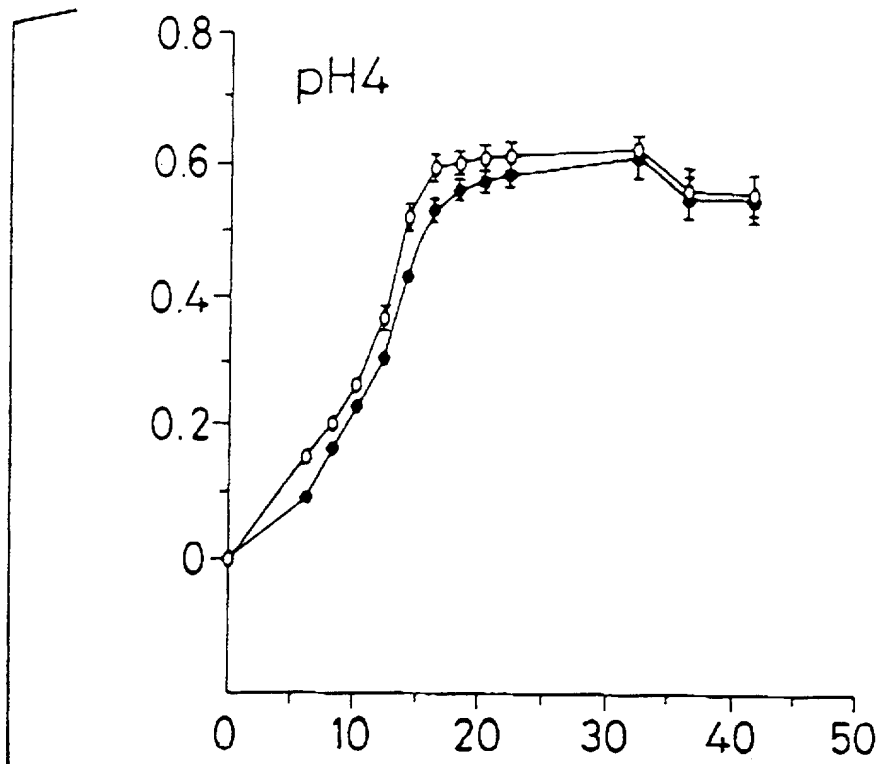
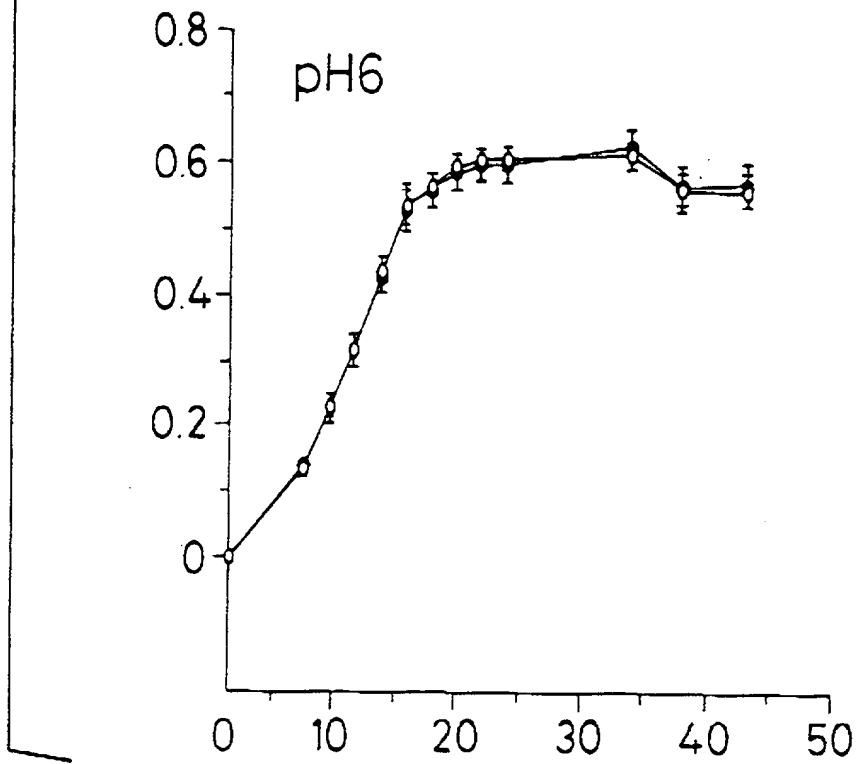


图 2 (续)



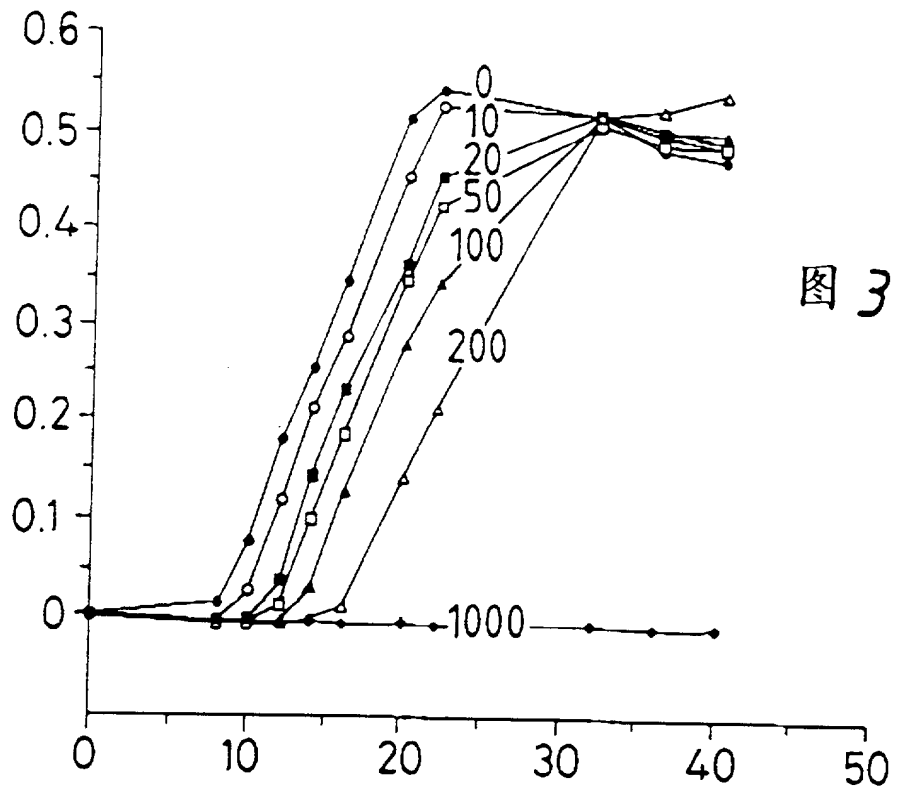


图 3

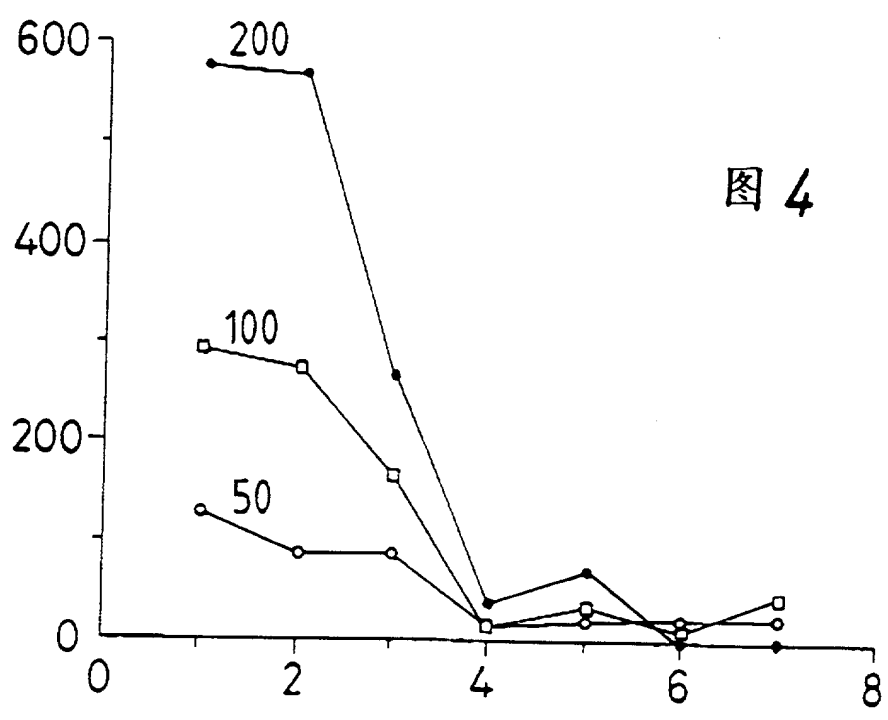


图 4