



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104825433 A

(43) 申请公布日 2015.08.12

(21) 申请号 201510209789.6

A61P 13/04(2006.01)

(22) 申请日 2007.12.31

A61P 1/04(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 11/00(2006.01)

07460015.6 2007.07.03 EP

A61P 35/00(2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 1/00(2006.01)

200780100471.8 2007.12.31

A61P 1/02(2006.01)

(71) 申请人 达努塔·克鲁谢夫斯卡

地址 波兰华沙

(72) 发明人 达努塔·克鲁谢夫斯卡

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

A61K 31/194(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书23页

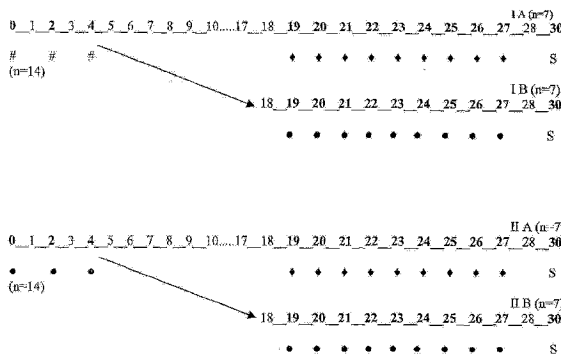
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

α -酮戊二酸的新医药用途

(57) 摘要

本发明涉及 α -酮戊二酸盐在制备预防或治疗活的生物体不希望的健康状况的医药制剂中的新用途。本发明还涵盖新的含有 α -酮戊二酸盐的医学制剂, 饮食补充剂, 专用含药食品和食品/饲料添加剂, 用于预防和抑制活的生物体, 包括人、宠物和家畜, 例如哺乳动物、鸟、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物中有害尿素分解菌的集群, 特别是人和家畜的幽门螺旋杆菌集群。而且, 根据本发明 α -酮戊二酸盐用作预防和治疗与尿素分解菌有关的 a. m. 疾病和状况的方法中的活性成分, 以及用作基于包含木脂素和纤维素的生物量依靠细菌酶的转变制备有机燃料的方法的活性成分, 其中所述酶是在 α -酮戊二酸盐存在下应用的, 所述酶是由食木高等白蚁后肠尿素分解微生物群产生的。



1. 适合于有效量的活性物质向生物体中目标尿素分解菌的出现部位递送或局部给药形式的 α -酮戊二酸盐在制备预防或治疗不希望的与活的生物体中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的医学状况的医药制剂中的新医药用途, 其中所述生物体不包括植物, 包括人和动物, 特别是宠物和家畜, 例如哺乳动物、鸟、两栖动物、鱼、软体动物或节肢动物。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述不希望的医学状况是与胃肠道、呼吸和 / 或泌尿系统中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的状况, 所述尿素分解菌来自包括幽门螺旋杆菌类, 来自布鲁氏杆菌属的菌株, 尿素酶阳性菌如解脲尿枝原体, 和其他嗜碱性菌如巴氏芽孢杆菌, 尿素酶生成小肠结肠炎耶尔森菌杆菌, 参与生物膜形成以及在导管及其他医学装置上沉积物的矿化的尿素分解菌, 引起口腔粘膜感染, 牙龈疾病, 龋齿, 引起牙垢形成的尿素分解菌, 引发由变形杆菌, 尿枝原体属, 克雷伯氏菌属, 假单胞菌属, 葡萄球菌属, 普罗威登斯菌, 棒状杆菌属的泌尿系统感染的感染性结石形成的尿素分解菌, 特别是奇异变形菌和引起生殖道感染—特别是其较低部位感染的支原体, 人型支原体和解脲尿枝原体。

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述适合向目标尿素分解菌的出现部位局部给药的制剂是口服给药制剂, 静脉输注形式的制剂, 灌注液, 阴道片剂, 栓剂或任何其他适于向目标尿素分解菌的特定出现部位给药的制剂形式。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其中所述适合向目标尿素分解菌的出现部位局部给药的制剂进一步包括可与 α -酮戊二酸盐配伍并且有益于治疗不希望的医学状况的其他活性成分。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中制备用于预防幽门螺旋杆菌群集和其产生的结果, 特别是例如胃和十二指肠溃疡, 消化道溃疡, 胃淋巴瘤, 伴有肠道组织变性的慢性萎缩性胃炎和胃癌的疾病的制剂。

6. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中制备用于尿素分解肠道微生物群的调节, 全身整体的稳定和用于感染后及恶病质过程中的肠道微生物群的平衡的制剂。

7. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中制备用于抑制病原尿素分解菌通过胃的制剂。

8. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中以口香糖或牙膏的形式制备用于调节口腔内尿素分解微生物群, 减少牙垢的形成, 和抑制龋齿的制剂。

9. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中制备用于预防泌尿系统感染性结石和沉积的形成的制剂。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中制备用于抑制尿素分解菌, 特别是尿枝原体属和其他引起鱼类感染的支原体的生长的制剂。

11. 如权利要求 10 所述的用途, 其中制备用于预防由某些尿素分解菌引发的鲤鱼和鲤鱼苗以及其他淡水和海水鱼类的鳃部炎症的所述制剂。

12. 权利要求 1-4 任一项所述的用途, 其中制备用于减少生物膜形成和在导管及其他医学装置上沉积物的矿化的所述制剂。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的用途, 其中制备含有 α -酮戊二酸盐的量调整为治疗有效剂量, 特别是剂量范围为 0.001-0.2g/kg 体重 / 天, 或者剂量范围为 0.01-10g/m²组织表面积 / 天的制剂。

14. 用作抗菌剂的 α -酮戊二酸盐, 当向生物体中的目标尿素分解菌的出现部位给药

时其有效对抗人和动物,特别是宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟、两栖动物、鱼、软体动物或节肢动物中的尿素分解菌。

15. 一种用于在目标尿素分解菌的出现部位预防和治疗与活的生物体中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的不希望的医学状况的医药制剂,其是根据权利要求 1-13 任一项权利要求所制备的制剂,所述活的生物体不包括植物,包括人,宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟、两栖动物、鱼、软体动物或节肢动物。

16. 权利要求 1-7 任一项所述的用途,其中以饮食增补剂的形式制备在目标尿素分解菌的出现部位预防除了植物的活的生物体中不希望的医学状况的制剂。

17. 权利要求 1-7 任一项所述的用途,其中以药用食物产品的形式制备在目标尿素分解菌的出现部位预防除了植物的活的生物体中不希望的医学状况的制剂。

18. 权利要求 1-7 任一项所述的用途,其中以起预防作用的、预防幽门螺旋杆菌群集的食品 / 饲料添加剂的形式制备在目标尿素分解菌的出现部位预防除了植物的活的生物体中不希望的医学状况的制剂。

19. 一种在目标尿素分解菌的出现部位预防或治疗与活的生物体中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的不希望的医学状况的方法,所述活的生物体不包括植物,包括人,宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟、两栖动物、鱼、软体动物或节肢动物,其中预防或治疗有效量的 α -酮戊二酸盐给予至需要该治疗的生物体的目标尿素分解菌的出现部位。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述不希望的医学状况是与胃肠道、呼吸和 / 或泌尿系统中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的状况,所述尿素分解菌来自包括幽门螺旋杆菌类,来自布鲁氏杆菌属的菌株,尿素酶阳性菌如解脲尿枝原体,和其他嗜碱性菌如巴氏芽孢杆菌,尿素酶生成小肠结肠炎耶尔森菌,参与生物膜形成以及在导管及其他医学装置上沉积物的矿化的尿素分解菌,引起口腔粘膜感染,牙龈疾病,龋齿,引起牙垢形成的尿素分解菌,引发由变形杆菌,尿枝原体属,克雷伯氏菌属,假单胞菌属,葡萄球菌属,普罗威登斯菌,棒状杆菌属的泌尿系统感染的感染性结石形成的尿素分解菌,特别是奇异变形菌和引起生殖道感染的属—特别是其较低部位感染的支原体,人型支原体和解脲尿枝原体。

21. 如权利要求 19 或 20 所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐是以口服给药制剂,静脉输注形式的制剂,灌注液,阴道片剂,栓剂或其他适于向目标尿素分解菌的特定出现部位给药的制剂的形式给药。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述适合向目标尿素分解菌的出现部位局部给药的 α -酮戊二酸盐制剂与其他可与 α -酮戊二酸盐配伍并且有益于治疗不希望的医学状况的活性成分一同给药。

23. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗的不希望的医学状况与活的生物体的幽门螺旋杆菌集群和其产生的结果,特别是例如胃和十二指肠溃疡,消化道溃疡,胃淋巴瘤,伴有肠道组织变性的慢性萎缩性胃炎和胃癌的疾病相关。

24. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗包括尿素分解肠道微生物群的调节,全身整体的稳定和用于感染后及恶病质过程中的肠道微生物群的平衡。

25. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗包括抑制病原尿素分解菌通过胃。

26. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗包括调节口腔内尿素分

解微生物群,减少牙垢的形成,和抑制龋齿并且 α -酮戊二酸盐以口香糖或牙膏的形式给药。

27. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗包括预防泌尿系统感染性结石和沉积的形成。

28. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中预防或治疗包括抑制尿素分解菌,特别是尿枝原体属和其他引起鱼类感染的支原体的生长。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中 α -酮戊二酸预防性地给药以对抗由某些尿素分解菌引发的鲤鱼和鲤鱼苗以及其他淡水和海水鱼类的鳃部炎症。

30. 前述权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗包括减少生物膜形成和在导管及其他医学装置上沉积物的矿化。

31. 前述权利要求 19-30 任一项所述的方法,其中 α -酮戊二酸盐以预防或治疗有效量,特别是剂量范围为 0.001-0.2g/kg 体重 / 天局部口服给药。

32. 前述权利要求 19-30 任一项所述的方法,其中 α -酮戊二酸盐以适于局部给药的预防或治疗有效量,特别是剂量范围为 0.01-10g/m²组织表面积 / 天给药。

33. 制备有机生物燃料的方法,基于包含木脂素和纤维素的生物量依靠细菌酶的基因转变,其中所述酶是在 α -酮戊二酸盐存在下应用的,所述酶是通过食木高等白蚁后肠尿素分解微生物群产生的。

34. 如权利要求 33 的方法,其中 α -酮戊二酸盐以足以使该方法的产率增加至少 5% 比率的应用。

35. 如权利要求 33 或 34 的方法,其中所应用的酶是不含有破裂的尿素分解菌细胞碎片的纯化形式。

36. 如权利要求 33 或 34 的方法,其中所应用的酶是非纯化形式,即混合有破裂的细菌细胞碎片或是由尿素分解菌释放的。

37. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述 α -酮戊二酸盐是钠盐、钙盐或其混合物。

38. 如权利要求 15 所述的医药制剂,其中所述 α -酮戊二酸盐是钠盐、钙盐或其混合物。

39. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐是钠盐、钙盐或其混合物。

α -酮戊二酸的新医药用途

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 12 月 31 日、发明名称为“ α -酮戊二酸的新医药用途”的中国发明专利申请 No. 200780100471.8 的分案申请。

[0002] 本发明涉及 α -酮戊二酸的新医药用途,包括 α -酮戊二酸在制备用于预防或治疗活的生物体不希望的健康状况的治疗和预防性制剂中的用途,以及 α -酮戊二酸在治疗性和预防性治疗该活的生物体中的用途,所述活的生物体包括人、植物和动物,特别是宠物和 / 或家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。

[0003] 发明背景

[0004] α -酮戊二酸 (Alpha-ketoglutarates) — α -酮戊二酸的盐。

[0005] α -酮戊二酸作为内源性分子存在于活的生物体内。

[0006] α -酮戊二酸的盐已经已知至少 60 年了,也就是说,自从发现三羧酸循环起。内源性 α -酮戊二酸的盐在人体和动物体内与草酰乙酸盐和丙酮酸盐一起在柠檬酸循环中发挥基础性作用。作为可再现反应的结果,存在合成的脂肪酸、甾醇、胆固醇 (有柠檬酸盐参与)、卟啉、血红素、叶绿素 (琥珀酰辅酶 A 的活性)、谷氨酸、氨基酸、核苷酸碱基 (α -酮戊二酸的盐的活性)。

[0007] α -酮戊二酸阴离子在新陈代谢,主要是需氧生物体中的新陈代谢中起关键作用。 α -酮戊二酸是在涉及异柠檬酸脱氢酶的细胞酶的氧化脱羧过程以及另一代谢途径中通过谷氨酸脱氢酶催化的谷氨酸氧化脱氨产生的。

[0008] α -酮戊二酸——作为基础生命循环,即三羧酸循环,也就是克雷布斯循环的的中间体化合物——是细胞内永久性转化的主体,并且由于其在生物体内的完全代谢,其以阴离子形式以相当低的浓度存在于外周血液中。

[0009] 在生物体内, α -酮戊二酸还发挥天然清道夫——去污剂的作用,是通过氨基酸分解代谢产生的氨基基团的氨基转移作用形成的氮转送完成的。该过程在肝脏中进行并且被称作鸟氨酸循环或尿素循环。

[0010] 在 α -酮戊二酸和谷氨酰胺的氨基转移过程中,形成了被称作谷氨酸的神经递质。在维生素 B6 的存在下,谷氨酸可以脱去羧基,同时生成称为 GABA (γ -氨基丁酸) 的化合物,它是一种谷氨酸神经递质抑制剂,可以阻断神经递质。

[0011] 还已经证实 α -酮戊二酸酶参与自由基的清除——自由基是生物体不完全代谢的产物并且是非常有毒的化合物。

[0012] 此外, α -酮戊二酸依赖性加氧酶的一种是分子氧传感器,即环境中氧水平的指示剂。

[0013] α -酮戊二酸还可以通过已知的给药途径引入生物体内,例如:口服,通过吸入、静脉内或通过其他途径。

[0014] 人和动物的日常饮食并不包含 α -酮戊二酸。

[0015] 在市场上,特别是在美国,有众多可商购的饮食补充剂,其含有 α -酮戊二酸的盐,主要是精氨酸、吡多辛、鸟氨酸、肌酸、组氨酸和瓜氨酸的盐,作为现成的产品供人和家畜使用。可商购的还有 α -酮戊二酸的钠、钾和钙盐。

[0016] 在全国营养食品协会 (NNFA) 草拟的饮食补充剂登记簿中, α -酮戊二酸本身以及与吡多辛 (维生素 B6) 联合的 α -酮戊二酸甚至早在 1994 年 9 月 15 日就已列在生物化学产品组中。在市场上的如此长期存在导致了大量的含有这些化合物的饮食补充剂。 α -酮戊二酸的衍生物或盐存在于所有市售产品中的主要原因是 α -酮戊二酸—作为克雷布斯循环中的中间体化合物—是一种可用于细胞呼吸的物质, 并因此确信其能够改善生命质量。

[0017] 在这里讨论的产品中的大部分是包含与 α -酮戊二酸联合的 L-精氨酸的产品。如制造商所宣称的, 这些产品促进体力活动过程中及之后的能量维持, 增强一氧化氮的合成, 此外, 一与一氧化氮联合, 它们增加生物体内该氧化物的水平以及增强营养物的运送, 以及增强肌肉中的代谢。与其它物质联合, 它们还增加能量水平和增强氨基酸的代谢。

[0018] 第二大组的市售产品包含与 α -酮戊二酸联合的鸟氨酸。在这种形式中, α -酮戊二酸不仅增加能量生成, 而且保护肌肉免于支链氨基酸的分解以便产生谷氨酰胺, 谷氨酰胺为能量促进分子。此外, 它还是一种增加生长激素分泌和优化肌肉代谢的化合物。它以安全的方式增加胰岛素和多胺的活性。它还增加神经传递作用, 从而维持生物体良好的精神状态, 支持肌肉最大化运动效果的耐力, 影响生物体脂肪燃烧能力, 增加性欲, 对免疫功能具有有益的影响并且降低氧应激性。

[0019] 另一组用作饮食补充剂的食物制品包括与 α -酮戊二酸联合的吡多辛和 pyridoxyl。这些产品的组分增强细胞内的代谢活性, 平衡生物体产生能量的作用和保护肝脏。

[0020] 在市场上, 还有包含与 α -酮戊二酸联合的肌酸产品。它们作为谷氨酰胺的前体并参与蛋白质的合成。

[0021] 另外, 非特定的 α -酮戊二酸的盐刺激生物体脂肪的减少, 并且是确保肌肉组织完整性所必需的。

[0022] 另一方面, α -酮戊二酸自身是另外一种制剂的成分, 也就是那些具有天然解毒功能, 推荐用于由氨基酸分析诊断为慢性疲劳和代谢缺陷的成分。这种类型的制剂给药导致耐力的增加和提高活力。这类中感兴趣的产品是 α -酮戊二酸的钙和镁盐。由于 α -酮戊二酸属于强有机酸类的事实, 在口服给药时其会刺激食道和胃。钙和镁盐的应用可以生成缓冲的双组分 α -酮戊二酸化合物, 该化合物从而不会引起不愉快的过度酸性感觉。

[0023] 许多专利和专利申请表明 α -酮戊二酸可以在代谢性脑功能障碍、神经系统、血液循环和骨骼肌系统障碍中给药, 以增强细胞线粒体功能。

[0024] 含有 α -酮戊二酸的盐的饮品也可以获得的, 并且用于向生物体提供能量, 特别是在体力活动之前、之中和之后。这样的饮品—作为能量来源—也可以在人和其它哺乳动物快速及持久需要能量的状态下给予。

[0025] 此外, α -酮戊二酸可以用作增加肌肉质量而不会把肌肉转变成脂肪的非甾体合成代谢产物。这样的饮食补充剂的效果与合成代谢类固醇获得的效果类似, 但是没有不利的副作用。

[0026] 含有维生素 B1 (thiamin)、硫辛酸、肌酸衍生物和 L-精氨酸以及 α -酮戊二酸的补充剂也可以口服给予。这种饮食补充剂用于在治疗糖尿病性神经病变过程中降低血液葡萄糖水平和维持低的葡萄糖水平, 以及改善血液循环和肌肉性能。

[0027] 发现 α -酮戊二酸的盐的作为活性剂具有令人感兴趣的应用, 该活性剂旨在降低

人和动物氮排放以及维持蛋白质合成,并且同样用于食品微生物学中。

[0028] 在食品工业中,该盐用作改善和增强发酵产品(例如,酸酱油)和乳制品特别是奶酪的香味和口味的成分。 α -酮戊二酸的盐影响乳酸菌发酵,从而改变氨基酸的代谢,分解代谢产物的水平和转氨酶的活性。在实践中,它通过加快那些保证食物产品高的商品质量的化合物的形成而缩短了奶酪成熟的时间。参见:Williams AG, Noble J, Banks JM., The effect of alpha-ketoglutaric acid on amino acid utilization by nonstarter *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38:289-295。

[0029] 许多专利和专利申请涉及 α -酮戊二酸作为药物制剂或作为药物制剂的组分的应用。

[0030] α -酮戊二酸、谷氨酰胺、谷氨酸及其盐,以及酰胺、二肽和三肽作为药物制剂在治疗和预防关节病,类风湿性关节炎以及炎症和其它原因引起的软骨损伤中的应用在出版物 WO 2007/058612 中公开。

[0031] 出版物 WO 2005/123056 披露了 α -酮戊二酸、谷氨酰胺、谷氨酸及其药学可接受的盐、酰胺、二肽和三肽作为药物制剂、食品和动物饲料添加剂在治疗和预防至少一种下列参数血浆水平过度的应用:胆固醇、LDL、甘油三酯。该制剂还可以用于升高 HDL 水平。

[0032] EP 0922459 披露了 α -酮戊二酸与D-半乳糖和鸟氨酸一起,以及 α -酮戊二酸的盐例如钠盐,钾盐,镁盐,锌盐和钙盐以确定的剂量,以片剂、粉剂、输液剂、糖浆剂的形式,可以用于升高血液中的氨基酸分布,特别是应用于处于代谢性应激状况下的患者。该披露的制剂可以用于治疗肝脏疾病、治疗和预防酒精成瘾患者的肝脏疾病,以维持肝脏的功能和结构以及再生肝脏。

[0033] 在出版物 WO 2006/016143 中已经指出含有 α -酮戊二酸和其许多衍生物的制剂—以前用于活化 HIF α 羟化酶以增加 α -酮戊二酸水平,现在用于治疗癌症和血管生成。

[0034] 根据出版物 WO 2006/062424,也可能使用3-羟基-3-甲基丁酸酯与 α -酮戊二酸及其若干衍生物结合,在生理条件下的骨骼生长和矿化过程中,和成人及动物的骨软骨病过程中。相同的产品可以加入到功能性食品和含药食品中。

[0035] 出版物 WO 2006/016828 显示了 α -酮戊二酸及其许多衍生物作为药物制剂,及作为食品和动物饲料添加剂的应用,所述药物制剂和添加剂用于改善神经细胞和整个神经系统的功能,最小化和预防神经细胞的细胞凋亡以及保护成人和胎儿对抗神经系统疾病。

[0036] 出版物 WO 2007/082914 披露了用于诊断人或动物对与低 α -酮戊二酸 (AKG) 水平有关的胃肠道疾病和病症,例如幽门螺旋杆菌相关的胃炎、胃和十二指肠溃疡、消化性溃疡、胃癌和与胃粘膜有关的淋巴组织淋巴瘤更高易感性的方法。表明了和正常的平均 AKG 水平相比,低 AKG 水平的人或动物需要用含有 AKG、其衍生物、代谢物、类似物或其盐的药物制剂或者食品或饲料补充剂治疗。该出版物披露了一些结果,证实在试验动物(2-3 岁大鼠)对照组中具有低血液 AKG 水平—低于 0.1 μ g/ml 的试验动物,在实验中不能存活而具有相似初始血液 AKG 水平的接受添加 Na₂AKG*2H₂O 饲料的试验动物在实验中存活。然而没有给出证据证明试验动物被幽门螺旋杆菌感染。因此也没有证据表明低 AKG 水平在任何方面与上述的幽门螺旋杆菌相关疾病或病症有关联。说明不同年龄组的人的 AKG 血液水平和不同疾病之间关系的数据未能提供充足量的一方面与每个个体患者健康状况相关而另一方

面与低血液 AKG 水平和年龄、性别、体重、具体疾病或病症的相互关系相关的数据,因为这种相关数据对于每个检查的患者是不同的。重要的是所检查的患者没有人被分类为显示测试中提到的任意一种疾病的严重征兆并且所检查的患者没有人被分类为显示比胃炎的“轻度”征兆更严重的征兆。除此之外,即使对于那些显示胃炎“轻度”征兆的患者,也没有提供患者的胃肠道幽门螺旋杆菌集群的证据。而且,在该出版物中也没有提及如何鉴别出了幽门螺旋杆菌的致病菌株。实验数据仅显示生理性血液 AKG 水平的范围非常宽,并且不必然指示出版物中所列的任何疾病。根据在这么一小群患者中获得的试验结果得到了结论,以至于统计学分析不能提供任何可靠的数据。

[0037] 吡哆醇 α -酮戊二酸作为药物是已知的,用于人药和兽药中预防酸中毒,用于预防所有导致酸中毒的状况以及用于使用降低血液乳酸水平的药物的病理学中。

[0038] α -酮戊二酸还作为生物体中毒的解毒剂用于医疗实践。 α -酮戊二酸的解毒作用用于例如治疗氰化物中毒。 α -酮戊二酸作为解毒剂可预防术后肌肉分解作用,并且其还可以在 hospital 中用于建议胃肠外给食的患者,其中 α -酮戊二酸是所应用的推注中的一种化合物。 α -酮戊二酸还被推荐用于患有脑中风的患者、烧伤患者、缺氧症患者和受 X-射线辐射的患者,以及在亚硒酸盐中毒造成白内障的情况中使用。

[0039] 如在肠系膜淋巴结,肝和脾脏中检查的那样,与鸟氨酸联合的 α -酮戊二酸有效地保护小肠移植术后生物体免受细菌的任何迁移。参见:“de Oca J, Bettonica C, Cuadrado S, Vallet J, Martin E, Garcia A, Montanes T, Jaurrieta E. Effect of oral supplementation of ornithine-alpha-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthotopic small bowel transplantation. *Transplantation*. 1997 ;63:636-639”。

[0040] 在处于实验诱导的创伤后状态的大鼠中,给予鸟氨酸- α -酮戊二酸减少了大肠杆菌的传播和 LPS 后的组织破坏。推定在创伤后的人中,给予该产品可以预防脓毒症及其后果。参见:“Schlegel L, Coudray-Lucas C, Barbut F, Le Boucher J, Jardel A, Zarrabian S, Cynober L. Bacterial dissemination and metabolic changes in rats induced by endotoxemia following intestinal E. coli overgrowth are reduced by ornithine alpha-ketoglutarate administration. *J Nutr*. 2000 ;130:2897-2902”。

[0041] α -酮戊二酸还用于动物饲养以改善氨基酸的吸收。它给予小猪以加快铁离子的吸收。

[0042] 尿素分解细菌

[0043] 氮同化细菌的范围很广:从非致病共生体,如皮肤移植细菌,和栖息于胃肠道粘膜的非致病共生体,到致病菌,包括幽门螺旋杆菌和引起泌尿生殖系统感染的细菌。

[0044] 尿素分解细菌引起的最常见的感染是幽门螺旋杆菌感染。

[0045] 尿素分解细菌的共同特征是它们通过尿素酶利用其环境中存在的尿素的能力,主要是作为生存所必需的氮来源。细菌尿素酶(尿素氨基水解酶 E. C. 3. 5. 1. 5) 是一种包含 2 或 3 个亚基的镍依赖性的多聚体。某些细菌尿素酶的 3D 晶体结构已经被发现(幽门螺旋杆菌,产气克雷伯氏杆菌,巴氏芽孢杆菌)。氨基酸序列的高度近似性表明所有类型的尿素酶起源于一种母体蛋白质,它们可能具有相似的三维结构,并且在将尿素水解为氨和二氧化碳时保持催化活性。

[0046] 依靠自身尿素酶的氮同化细菌的例子是唾液链球菌和内氏放线菌,通常存在于口

腔中并形成生物膜。

[0047] 胃肠道具有最大浓度的尿素分解细菌。微生物,包括尿素分解菌,持久寄居在上皮组织表面,并且它们被认为是天然的肠道微生物群。这意味着使用尿素是胃肠道微生物生态学的一个关键因素,也就是说,它影响细菌在这一区域的数量和质量。通过保持组织完整性,使用尿素是生物体健康的条件之一。内环境稳定的相同的规则支配着寄居身体表面的微生物的存在。

[0048] 尿素作为病原体尿素酶的底物在幽门螺旋杆菌感染过程中炎症的稳定期中也是重要的。

[0049] 病原体进入人及动物体内的通常途径是和食物一起经胃肠道进入,而不管感染进一步发生在什么地方。经胃肠道的尿素分解微生物感染显示尿素酶在这些感染的发病机理中起作用。已证明细菌菌株,例如产生尿素酶的布鲁氏杆菌菌株,在尿素环境中能抵抗胃液的杀生物作用和其强酸性条件。另一方面,这些细菌的尿素酶阴性突变体则对这样的条件敏感,导致经胃通过后细菌数量减少。可以得到结论,在这样的条件下尿素酶保护布鲁氏杆菌在经口进入生物体后抵御胃液的酸性作用。在通过胃屏障后,细菌便自由入侵例如呼吸系统和泌尿生殖系统并产生典型的布鲁氏杆菌病的症状。

[0050] 尿素分解菌,即使它们不是健康生物体泌尿系统感染主要的致病因素,它们也常常和患泌尿系统疾病的人的感染有关。尿素酶产生微生物的泌尿系统感染的后果是伴有磷酸铵镁盐(鸟粪石)和磷酸钙盐的过饱和尿液,以及伴有肾脏病变的鹿角状结石。在生理条件下,尿液不含有这些盐。

[0051] 另一个泌尿生殖系统感染发病的有趣机理是由尿素酶阳性细菌,如解脲尿支原体和其嗜碱性细菌,例如巴氏芽孢杆菌引起的感染的维持。在尿素环境中病原体应用尿素分解产生它们自身的ATP并因此它们得以持久复制。尽管解脲尿支原体和其支原体相对罕见,它们还是可以引起危险和难以治愈人和包括鱼在内的动物的呼吸系统感染。

[0052] 还发现,尿素酶生成小肠结肠炎耶尔森氏菌—胃肠道病原体可以在某些遗传障碍的人中引发反应性关节炎,并且其反应性与酶的化学结构,特别是其UreB亚基相关。

[0053] 应当注意许多能够活动的细菌是能在导管及其他医疗器械上形成生物膜和沉积物矿化的尿素分解生物体。

[0054] 确信尿素代谢还与口腔粘膜感染有关,包括龋疾病、龋齿和牙垢的形成。

[0055] 感染性结石(infectious stones)的形成与由下列的细菌引起的泌尿系统感染有关:变形杆菌、尿支原体属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属,普罗威登斯菌属,棒杆菌属。感染性结石形成的最常见原因是奇异变形菌细菌。该结石形成的另一个因素是支原体,通常报道其与生殖道感染有关,特别是与下生殖道,主要是与阴道感染有关。从男性的尿道中分离出以下生物体:人型支原体和解脲尿支原体。细菌在女性及男性泌尿生殖系统中的集群导致伴随膀胱内感染性结石形成的泌尿系统感染。

[0056] 幽门螺旋杆菌感染

[0057] 人的幽门螺旋杆菌通常从胃和十二指肠中分离。这些以前称为幽门弯曲杆菌的革兰氏阴性尿素分解的螺旋形细菌是胃炎和胃及十二指肠溃疡形成的致病因素的一种。1983年,2005年诺贝尔奖得主Warren和Marschall揭示了胃肠道幽门螺旋杆菌的存在与慢性胃炎之间的因果关系。参见:Marshall BJ,Warren JR.Unidentified curved bacilli

in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984; 1:1311-1315。由于长期感染明显增加了肠腺癌的风险的事实,近年来 WHO 宣布幽门螺旋杆菌为致癌因子 (IARC. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994 ;61:1-241.)。而且,发现了幽门螺旋杆菌感染和除胃以外的器官及组织的病理学之间的关系,比如心脏。

[0058] 很长时间人们都确信胃部是没有细菌的,理由是在胃粘膜上永久集群是非常困难的,原因在于对于大多数微生物的生长而言 pH 值太低了。然而,幽门螺旋杆菌产生的尿素酶使得这种生物体在胃和肠内形成永久性菌落,同时尿素分解是引起与幽门螺旋杆菌感染有关的病理学的主要原因。沉积在细菌外部的尿素酶可以构成甚至达 20% 的细菌蛋白质。该酶保护细菌抵御酸性环境并防止细菌细胞外膜的致命性破坏。另外,在幽门螺旋杆菌感染中,尿素酶在尿素分解过程中释放的铵离子对胃上皮细胞具有细胞毒性作用。在粒细胞和尿素的存在下,细菌尿素酶产生单氯胺,其可诱导 DNA 突变,该突变是在慢性幽门螺旋杆菌感染过程中癌症的发展所涉及的因素之一。

[0059] 正在从人和动物体中分离新种类的尿素分解螺旋菌。但是,迄今为止,还不清楚其它人体内存在的螺杆菌属的种类怎样和胃 (例如 *H. heilmannii*), 肠 (例如同性恋螺杆菌 (*H. cinaed*), *H. canadensis*), 肝脏 (例如肝螺杆菌 (*H. hepaticus*), *H. bilis*), 或者全身感染的疾病 (例如 *H. 鸡白痢菌*, *Helicobacter spp. flexispira taxon 8*, "*F. rappini*") 相关联。

[0060] 近年来已发现实验动物的胃肠道 (肠、胃、肝脏和胰脏) 可以天然地被螺杆菌属的细菌所寄居: *H. bilis*, *H. ganmani*、肝螺杆菌 (*H. hepaticus*)、小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*)、*H. mastomyrinus*、*H. rappini*、*H. rodentium*、*H. typhlonius*。动物——包括野生和驯养的,都可以永久性地被这些微生物寄居,不会显示感染征兆,且在尸检中在其内脏器官中没有发现炎症过程。由于细菌通过粪便和唾液在个体间永久性横向传播,对环境条件敏感的微生物持续旺盛。

[0061] 已经发现人体内幽门螺旋杆菌感染存在于 50% 的人口中,并且似乎与公众的经济状况和年龄有关。它在成人中是增加的,在不发达国家几乎包括了全部人口。在 90-100% 的胃炎病例中都发现了幽门螺旋杆菌。通常发现慢性感染转变为萎缩性炎症的。在 10% 的那些感染者中,发展成严重的疾病。在儿童和成人中幽门螺旋杆菌感染是普遍的。最常见的感染发生在儿童期,并且幽门螺旋杆菌在胃粘膜上集群会保持一生时间。

[0062] 已知如营养不良,维生素缺乏和吸烟等因素在感染中起作用。

[0063] 在 10% 的患者中,应用的常规治疗是无效的,原因是细菌对标准药物存在和增加的耐药性。还发现一些患者会再感染耐药细菌。其它大约 10% 的患者不能耐受质子泵抑制剂类的制剂。在这些患者中显示有副作用。

[0064] 由于治疗的全身性效果下降和因此带来的困难,根据 "Maastricht 2-2000" 报告的推荐,欧洲地方胃病协会推荐了适当的检测幽门螺旋杆菌的诊断过程,并仅在某些疾病症状发生的情况下启动治疗,例如:胃炎、胃和十二指肠溃疡、在会诊过程中证实的消化性溃疡、消化性溃疡的手术、癌前期改变 (萎缩性炎症、组织变形、发育异常)、早期癌症导致的胃切除、家族性癌症 (达到第二水平的近亲)、胃增生腺瘤息肉病 (切除后)、MALT 淋巴

瘤,使用 NSAIDs 的长期治疗。

[0065] 已经注意到人体内幽门螺旋杆菌感染伴随某些疾病,例如消化性溃疡、胃淋巴瘤、伴有肠化生的慢性萎缩性胃炎和胃癌。

[0066] 在螺杆菌属感染诊断中,常规侵入检测和内窥镜检查以及不需要检测患者胃粘膜活组织的非侵入性检查联合应用。

[0067] 粘膜碎片检测能够分离微生物(选择性生长培养基)或者应用合适的指示幽门螺旋杆菌细胞存在的技术(特异性和非特异性的染色法)。粘膜活组织检查过程中的幽门螺旋杆菌细胞的鉴别要通过经典微生物学测定方法(分离过程中表型测定,耐药性测定)以及生物化学方法(幽门螺旋杆菌酶活性——尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶的产生),和分子生物学方法(PCR 检测,使用用于所选择的细菌 DNA 片段的特定引物的实时 PCR)加以证实。

[0068] 最常用的非侵入性方法包括血清学试验和螺杆菌抗原的鉴别——粪便抗原试验,以及检测上述尿素水平的尿素呼吸试验,其被假定为患者呼出空气中的标准尿素浓度。常规的血清学试验是检测幽门螺旋杆菌的特异性 G 类抗体的酶联免疫吸附测定型试验。

[0069] 在第一阶段的幽门螺旋杆菌感染的人中,形成胃和十二指肠粘膜炎症,这应当被药理学措施完全消除。幽门螺旋杆菌感染治疗仍然是基于导入减少胃液分泌和升高胃中 pH 值的物质。这样的物质包括质子泵抑制剂和某些能清除细菌的抗生素——clarythromycin、阿莫西林和化合物——甲硝唑(来自于硝基咪唑衍生物类)。

[0070] 一般来说,目前由尿素分解菌引起的疾病的治疗包括以丸剂、软膏、栓剂和粉剂形式通过口服、静脉内、阴道内、肛门内和外用给予合适的抗菌药物。治疗有效药物的选择是在以下因素确定后:尿素分解菌的生物化学活性,它们对抗生素和化学治疗剂的耐药模式(抗菌谱),以及在细胞外膜结构(例如支原体)的确定后进行的。

[0071] 在欧洲,2002 年出版的在“Maastricht 2-2000”报告推荐的列表中没有包括任何不使用抗菌措施例如抗生素和,和通过化疗化合物——不同于硝基咪唑衍生物的物质幽门螺旋杆菌的治疗。治疗是复杂的、昂贵的、有时是难以忍受的,并且不总是有效果的。根据欧洲地方胃病协会的推荐,治疗方法是基于抗生素和化疗化合物(clarythromycin(2×500),和阿莫西林(2×1g)或甲硝唑(2×500mg)),以及质子泵抑制剂。

[0072] 例如:

[0073] 首次治疗。七天的治疗周期:

[0074] 1. 减少胃液分泌的药物;两倍剂量的属于质子泵抑制剂(PPI)的化合物——例如奥美拉唑,2天,20mg

[0075] 2. 抗生素 I——例如阿莫西林,2天,1g

[0076] 3. 抗生素 II——例如 clarythromycin,2天,0.5g

[0077] 二次治疗。

[0078] 1. 减少胃液分泌的药物;两倍剂量的属于质子泵抑制剂(PPI)的化合物——例如兰索拉唑,2天,30mg

[0079] 2. 抗生素 I——例如维持阿莫西林,2天,1g

[0080] 3. 抗生素 II——其它抗生素或化学物——例如甲硝唑,2天,0.5g

[0081] 4. 铋化合物(柠檬酸盐)。

[0082] 由于幽门螺旋杆菌在世界不同地方流行传播,对减少与感染有关的病症的制剂有

极大的和永久性的需求；医学团体对鉴定这样的制剂有很大的压力。

[0083] 本发明的主要目的是提供一种新的用于在人和动物体，特别是狗和猫，以及其它家畜中治疗和预防由尿素分解菌引起的疾病的制剂，特别是用于调节肠道尿素分解微生物群，调节口腔尿素分解微生物群，抑制致病性尿素分解菌通过消化的胃部，防止泌尿系统中沉积物和感染性结石的形成。

[0084] 本发明的目的还在于提供一种新的控制活的生物机体内不希望的尿素分解菌的生长的试剂，所述活的生物体包括人、植物和动物，特别是宠物和家畜，例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。

[0085] 本发明的一个特定的目的是提供一种新的治疗和预防由幽门螺旋杆菌引起的疾病的制剂。

[0086] 本发明的另一个目的是提供一种在人和动物体，特别是狗和猫，以及其它家畜中治疗和预防尿素分解菌引起的疾病的方法，特别是用于调节肠道尿素分解微生物群，调节口腔尿素分解微生物群，抑制致病性尿素分解菌通过消化的胃部，防止泌尿系统中沉积物和感染性结石的形成的方法。

[0087] 本发明进一步的目的是提供一种新的用于抑制尿素分解菌，特别是脲原体属菌和其它引起鱼类疾病的支原体属生长的制剂，特别用于预防由尿素分解菌引起的鲤鱼及鲤鱼苗，和其它淡水及海水鱼类的鳃部炎症。

[0088] 另外，本发明的一个目的是提供一种新的预防在导管及其他医疗器械上生物膜的形成以及沉积物的矿化的制剂。

[0089] 本发明还有一个目的是提供一种新的用于减少牙垢形成和抑制龋齿的制剂。

[0090] 而且，本发明进一步的目的是提供一种新的饮食补充剂，特殊的含药食物产品和食物/饲料添加剂，用于预防和/或抑制不希望的尿素分解菌在活的生机体的集群，特别是幽门螺旋杆菌在人和家畜的集群，所述活的生机体包括人、宠物和家畜，如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼、软体动物或节肢动物。

[0091] 考虑到 α -酮戊二酸对肠道微生物群的有益效果，本发明另一个目的是提供制造有机生物燃料的改进方法，它是基于包含木脂素和纤维素的生物量依靠细菌酶的转变。

[0092] 这些目的和目标是通过对根据本发明附加的权利要求中所提供的解决方案完成的。

[0093] 根据本发明确保达到上述的目的，——如在附加的权利要求中所限定的，通过使用 α -酮戊二酸作为活性成分，以治疗或预防有效剂量制备治疗或预防用医药制剂或饮食补充剂，特殊的含药食物产品，和食物/饲料添加剂或者其它日常使用的个人卫生产品。

[0094] 当以灌胃或口服给药时，治疗和/或预防有效剂量范围为 0.001g-0.2g/kg 体重/天。对于局部给药来说，有效剂量范围为 0.01-10g/m²组织表面积/天。

[0095] 直到现在，没有报导说 α -酮戊二酸的盐可以有效地用于人或动物以治疗尿素分解菌感染，包括幽门螺旋杆菌感染。

[0096] α -酮戊二酸的有效性，它的充分验证的生物体内的活性，以及该物质被批准用于其它医药和预防性应用的事实为本发明提供了许多优点。

[0097] 本发明进一步以下面详细说明和参考附图加以解释。

[0098] 在附图中，附图 1 显示感染幽门螺旋杆菌的实验小鼠模型的实验设计，用于研究小鼠胃粘膜幽门螺旋杆菌集群水平和使用 α -酮戊二酸的盐灌胃治疗的小鼠间的关系 (n

= 28)。

[0099] 附图 2 显示感染幽门螺旋杆菌的实验小鼠模型的实验设计,用于研究小鼠胃粘膜幽门螺旋杆菌集群水平和使用 α -酮戊二酸的盐灌胃治疗的小鼠间的关系 ($n = 48$)。

[0100] 附图 3 显示在电场中用 DGGE 技术测定的与螺杆菌属细菌 16S rDNA 有关的 PCR 产物的移动性。

[0101] 说明书和附加权利要求书中的术语具有如下含义：

[0102] 本文使用的术语“ α -酮戊二酸”指的是释放酸的活性阴离子的化合物,所述酸为 2-okso-戊二酸,2-okso 戊二酸, α -okso 戊二酸, α -okso 戊二酸,2-酮戊二酸,2-okso-1,5-戊二酸,2-okso 戊二酸,或 2-okso-戊二酸。这些化合物的例子是 α -酮戊二酸的盐、加成盐、酯、酰胺、酰亚胺及其前药。 α -酮戊二酸发挥对集群的抑制作用并防止活的生机体内的尿素分解菌在粘膜上的集群,活的生机体包括人、植物和动物,特别是宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。对于 α -酮戊二酸的盐,本文使用的术语 α -酮戊二酸涵盖了碱金属盐和 / 或碱土金属盐和 / 或酸的壳聚糖盐,或其它碱金属和碱土金属和壳聚糖和 α -酮戊二酸的混合盐。特别优选的是钠盐和钙盐或其混合物。

[0103] 本文使用的术语“医药制剂”指的是含有治疗有效量的 α -酮戊二酸的组合物,用于本发明涵盖的新的医药或预防适应症中。医药制剂可以包含其它活性成分和 / 或额外有益的药学可接受的能够和活性成分配伍的物质,例如载体、稀释剂、赋形剂、辅剂和适合所选择的给药途径的用于制剂的辅助添加剂。作为其它活性成分,含有 α -酮戊二酸的本发明医药制剂可以含有例如维生素。

[0104] 术语“治疗有效量”指的是特定量的衍生物,特别是 α -酮戊二酸在本说明书中描述的体内条件下具有治疗效果,即减少和抑制活的生物体内尿素分解细菌的粘膜集群,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。治疗或预防效果是通过将上文提及的医药制剂以固体或液体形式,与或不与载体、稀释剂、添加剂一起,或者作为药物组合物的组分引入活的生物体内而实现的,所述活的生物体包括人、宠物和农畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。制剂以足以减少和防止尿素分解菌感染的量给予。或者,治疗有效量的医药制剂可以治愈尿素分解菌引起的感染。

[0105] 根据所希望的效果,制剂的量可以根据其在目标区域对尿素分解菌的具体作用而不同。一次剂量的制剂可以包括规定的物质的量,通过带来所希望的治疗结果的方式计算而得。剂量是以纯活性物质的方式,并考虑其化学结构以及存在的附加物质如载体、稀释剂、辅剂和其它允许的药学可接受的添加剂给予的。依据良好的医学实践,需要的治疗效果和因此推荐的剂量可以通过已知的方法由医学和兽医工作者确定,主要基于这样的参数例如患者的年龄、体重、性别、其它伴随的感染和疾病。

[0106] 术语“医药制剂的给药”指的是以与位置,类型和感染强度相适应的适当的给药途径对上述疾病的预防或治疗反应,并考虑有害的尿素分解菌进入生物体的路径。

[0107] 术语“集群的抑制”指的是粘膜或其它组织中尿素分解菌引起的感染的传播和 / 或其严重程度降低,或者完全消除感染因素——导致活的生物体内感染进一步发展的减少和 / 或预防,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼

类、软体动物或节肢动物。

[0108] 术语“集群的预防”指的是当细菌与活的生物体粘膜接触时,对有害的尿素分解菌发展的预防,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。在有效预防集群的情况下,感染不会发生,或者活的生物体,包括人、宠物和家畜,如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物的粘膜一和没有预防集群的情况对比,有显著感染延迟。

[0109] 术语“饮食补充剂”意思是营养物或其它有营养的或生理作用的物质的浓缩源,其用途是提供日常饮食中所缺乏的某些有益成分的补充。饮食补充剂制成易于使用的形式,例如片剂、胶囊或液体形式,优选是单剂量包装。

[0110] 术语“含药食物产品”是指具有通常用于产品的形式和处方,包含具有特定治疗或预防价值的附加物质的食物产品。

[0111] 术语“食物 / 饲料添加剂”指的是固体或液体形式的含有纯的或在组合中的活性物质,含或不含载体、缓冲剂、清洁剂、助溶剂、抗氧化剂、防腐剂和其它符合活性物质特性并且被批准可用于食品的附加物质的产品。

[0112] 发明详述

[0113] 本发明主要涉及 α -酮戊二酸的新医药用途。

[0114] 另一方面,本发明还涉及基于包含木脂素和纤维素的生物量依靠细菌酶的转变制备有机生物燃料的方法,其中酶是在 α -酮戊二酸存在下应用的,所述酶是通过食木高等白蚁后肠尿素分解微生物群产生的。

[0115] 在该方法中, α -酮戊二酸以足以使该方法的产率增加至少 5% 的比率应用。所述的酶以不含有破裂的尿素分解细菌细胞碎片的纯化形式,或是非纯化形式,即与破裂的细菌细胞碎片混合或由尿素分解菌释放的形式应用。

[0116] 白蚁因它们分解木材的能力而被公知。白蚁肠内天然寄居的细菌已经被鉴定作为将木材转变成生物燃料的因素。最近显示在白蚁后肠内发现有 250 多种细菌,含有数百种编码在木质纤维素降解过程中破坏纤维素和木聚糖酶的基因。存在于白蚁肠内的大量尿素酶阳性的高活性螺旋体参与木材多糖的初始水解 (Werneck 等人的 Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. 2007. Nature, 450, 7169, 560-565。)。

[0117] 根据本发明 α -酮戊二酸计划用于加快和加强细菌及其产品的酶活性以实现更有效的和更高水平的纤维素降解,以定量的方式测定生物燃料的性能,改变肠道内尿素酶阳性共生细菌的微生物群体。

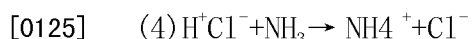
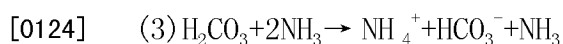
[0118] 根据本发明医药用途方面, α -酮戊二酸是以单一的化合物或是各种化合物的混和物的形式使用,用于制备预防和 / 或治疗活的生物体内致病性尿素分解菌引起的疾病的药物制剂,所述活的生物体包括人、植物和动物,特别是宠物和家畜,如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。

[0119] 当 α -酮戊二酸用量为 0.001—0.2g/kg 体重 / 天时,达到根据本发明制备的制剂给药的预防或治疗效果。当局部及体腔内应用时, α -酮戊二酸在 0.01—10g/m²组织表面 / 天的剂量下是特别有效的。

[0120] 本发明是基于观察到幽门螺旋杆菌能够在高等生物体胃中的高酸性环境中生存

而完成的。

[0121] 幽门螺旋杆菌的一个公知的性质是其在低 pH 值环境中生存的能力,这主要由于尿素酶的活性,它能够水解胃粘膜及胃液中存在的尿素 (Saidijam M, Psakis G, Clough JL, Meuller J, Suzuki S, Hoyle CJ, Palmer SL, Morrison SM, Pos MK, Essenberg RC, Maiden MC, Abu-bakr A, Baumberg SG, Neyfakh AA, Griffith JK, Sachs G, Scott D, Weeks D, Melchers K. Gastric habitation by *Helicobacter pylori*: insights into acid adaptation. *Trends Pharmacol Sci.* 2000, 21:413-416, Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Anmi Rev Physiol.* 2003, 65:349-369, Sidebotham RL, Worku ML, Karim QN, Dhir NK, Baron JH. How *Helicobacter pylori* urease may affect external pH and influence growth and motility in the mucus environment: evidence from in-vitro studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003, 15:395-401.)。各个反应的方案如下:



[0126] 作为尿素降解过程的结果,氨形成了,并且其很快和盐酸反应,这样在组织内(胃粘膜中)微环境的 pH 值局部增加了。众所周知,在自然条件下,胃粘膜由于壁细胞产生 HCl 而显酸性。

[0127] 尽管幽门螺旋杆菌是难以在体外生存的敏感生物,胃部的低 pH 值——对于其它细菌是致命的——反而可以支持幽门螺旋杆菌集群。这主要是由于由细菌尿素酶(幽门螺旋杆菌产生的酶)分解形成氨的内源性尿素的存在,氨升高了细菌微环境的 pH 值。因此,消除了酸性环境对幽门螺旋杆菌的致命影响。甚至还确信 (Nakazawa T. Growth cycle of *Helicobacter pylori* in gastric mucous layer. *Keio J Med.* 2002 ;51, S2:15-19.) 在胃粘膜层幽门螺旋杆菌生长周期被微生物的尿素分解特性所刺激。已经证明在细胞水平上,尿素酶 mRNA 的稳定及不稳定取决于环境的 pH 值。假定细菌从降解细胞中使用营养物质以生长并在 pH 值已经改变的区域集群。尿素酶的激活伴有细菌细胞中 pH 依赖性脉通道的开放,其利于尿素的水解 (Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science.* 2000 ;287:482-485, Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2001 ;40:1249-1259.)。还注意到幽门螺旋杆菌具有向尿素浓度更高的地域移动的能力,并且这一趋化作用加速尿素水解过程。这解释了生长周期的第二种路径,和在胃部感染的稳定结果 (Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2002 ;123:187-195, Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Lee A, Melchers K, Sachs G. Expression of the *Helicobacter pylori* urel gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infect Immun.* 2000 ; 68:470-477, Voland P, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene

cluster. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 ;284:96-106.)。

[0128] 另一方面,已知在氨基酸降解过程中——作为氧化脱氨的结果,α-氨基转变为α-酮酸,并伴随铵离子的脱离。作为氨基酸降解结果的铵离子部分参与含氮化合物的生物合成,剩余的部分在转化为尿素后从生物体内去除。在尿素中一个氮原子是直接来自于铵离子。

[0129] 在自然条件下尿素可以从生成的地方,即从肝细胞向整个消化系统自由扩散,这是由于该化合物的低分子量(Mr 60)的缘故。由于铵离子的强毒性,生物体通过利用这些离子合成低毒性化合物的方式进行自身保护,如尿素(排尿素的生物——哺乳动物)。排尿素的生物不能贮存氮:所述氮与蛋白质、氨基酸和氨相关。

[0130] 在活有机体内,虽然氨基酸持续脱氨,但游离氨以微量存在。一些氨很快被谷氨酸和天冬酰胺结合。一些氨通过肾以铵离子的形式排泄。大部分有毒的氨在肝脏中在鸟氨酸循环中转化为尿素。

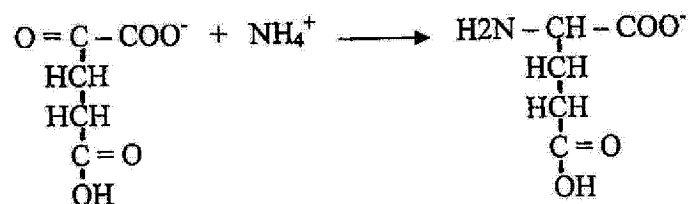
[0131] 目前,令人意想不到地发现向胃给予α-酮戊二酸后,幽门螺旋杆菌的总数降低了。尽管改善了阴离子向胃粘膜层细胞的转运(通过DC运载体),但是在体内实验条件下铵离子水平相对较低,且被α-酮戊二酸去除了(快速地和谷氨酸和天冬酰胺结合),从而导致尿素分解菌的死亡。从尿素中产生的对胃中幽门螺旋杆菌生存必需的铵离子,不能满足杆菌的需要,是因为在给予α-酮戊二酸后,铵离子很快在谷氨酸和其它氨基酸化合物合成中被用掉。

[0132] 仍不清楚为什么幽门螺旋杆菌产生相对于底物过量的尿素酶。细菌尿素酶是镍依赖酶,二价镍阳离子在翻译后结合上。假定为了维持合适的活性酶的数量,幽门螺旋杆菌聚积以保护后代细胞生长的尿素分解活性,即使在镍缺乏的情况下。由于在胃中α-酮戊二酸摄取的加强,幽门螺旋杆菌还可以完成接近这些盐,其在感染第一阶段引起细菌尿素酶生成的加强。

[0133] 由于幽门螺旋杆菌感染的流行传播,寻找限制导致感染的病症的制剂成为许多报道的主题。参见:El-Omar EM. Mechanisms of increased acid secretion after eradication of Helicobacter pylori infection. Gut. 2006 ;55:144-146., Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet. 1991 ;338:1175-1176。

[0134] α-酮戊二酸和铵离子一起参与某些氨基酸的合成,例如谷氨酸,和随后谷氨酰胺,反应式如下:

[0135]



[0136] α-酮戊二酸 + 铵离子 → 谷氨酸

[0137] 正是α-酮戊二酸与铵离子结合的这种能力鼓动了本发明对这种已知物质的新医药用途的研究。

[0138] 假定上述的反应是结合铵离子竞争性合成尿素的途径,尿素对于胃肠道环境中幽门螺旋杆菌或者是其它尿素分解菌是必需的氮源,例如在泌尿生殖系统中。

[0139] 由于缺乏有关 α -酮戊二酸对健康志愿者胃及小肠粘膜的有害作用的报道,在健康实验室动物中进行一系列的实验以建立 α -酮戊二酸对幽门螺旋杆菌在健康实验室动物的胃和小肠中集群的影响。

[0140] 令人意想不到的是,结果证实了上述提到的假设并显示如下:

[0141] 1. 在感染了幽门螺旋杆菌和随后灌胃 α -酮戊二酸后的小鼠胃中,没有粘膜增厚的形态学改变,或者在试验动物中没有小肠粘膜增厚以及绒毛宽度和小囊深度的形态学改变。

[0142] 2. 在试验动物包括那些感染幽门螺旋杆菌和随后灌胃 α -酮戊二酸的小鼠样本中,通过刮擦胃粘膜(窦部分)分离到的乳酸菌数量没有改变。

[0143] 3. 和对照组(用磷酸缓冲液 PBS 实验)相比,在感染幽门螺旋杆菌和随后灌胃 α -酮戊二酸的动物中,观察到集中于胃腺幽门部位的胃泌素——胃的激素——生成细胞有 17% ($p < 0.01$) 的减少。在感染幽门螺旋杆菌和随后灌胃 α -酮戊二酸的动物中,血液胃泌素的水平降低(从 21.8pM—24.7pM 降至 12.8pM—15.6pM) ($p < 0.05$),最可能的是由于胃粘膜中胃泌素生成细胞数量的减少。该事实说明 α -酮戊二酸和质子泵抑制活性之间间接(通过组织胺)的相互抑制作用。它的机能亢进表现在反流性疾病中。

[0144] 4. 在用 α -酮戊二酸处理的动物小肠中注意到一些胆囊收缩素(CCK)组织激素生成细胞数量减少的趋势。对比没有感染和仅仅接种 PBS 的小鼠的相同小肠片段,有 30% 的斜率(没有统计学差异, $p = 0.1$)。与只接种 α -酮戊二酸的小鼠相比,在感染幽门螺旋杆菌和随后给予 α -酮戊二酸的小鼠的小肠中,CCK 生成细胞的数量没有显著差异 ($p = 0.25$)。在感染幽门螺旋杆菌的动物和接种幽门螺旋杆菌并随后给予 α -酮戊二酸的动物中,低的 CCK 血液水平(从 3.1pM—4.0pM 降至 1.9pM—2.5pM) ($p < 0.05$) 与小肠中 CCK 生成细胞数量的减少相关。因此低 CCK 水平能够刺激胃以递增的频率排空;医疗机构表明它是一个避免幽门螺旋杆菌进一步集群和感染发展的因素。

[0145] α -酮戊二酸对幽门螺旋杆菌的杀菌效果

[0146] 最近令人意想不到地发现 α -酮戊二酸的盐抑制哺乳动物胃肠道幽门螺旋杆菌的集群过程。最近的研究表明在第一次给予细菌细胞悬浮液后的第三十天,从只感染幽门螺旋杆菌的小鼠胃幽门部粘膜分离的平均菌落数等于 $7.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$ 。在感染十四天后接受连续 9 天 α -酮戊二酸的盐灌胃给药的实验室动物组中,其分离菌群的平均数量仅有 $3.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$ 。在最后的幽门螺旋杆菌感染剂量十四天后开始的连续 9 天的 9 次 α -酮戊二酸灌胃给药导致胃粘膜层细菌集群减少 49%。该结果证明了 α -酮戊二酸的盐抑制幽门螺旋杆菌引起的胃部集群。

[0147] 在另一个实验中,在第一次给予细菌细胞悬浮液后的第二十天,发现从仅仅感染幽门螺旋杆菌的小鼠胃幽门部粘膜分离的平均菌落数等于 $4.3 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$ 。在感染 8 天后接受连续 3 天 α -酮戊二酸灌胃给药的实验室动物组中,没有发现幽门螺旋杆菌菌落。在最后的幽门螺旋杆菌感染剂量 8 天后开始的连续 3 天 α -酮戊二酸灌胃给药的 3 个完全停止了集群,并完全消除了小鼠胃粘膜幽门螺旋杆菌。

[0148] 在观察过程中,胃部微生物群发生了改变,在感染幽门螺旋杆菌的小鼠中也发

现了 *H. bilis* 的 DNA ; 在额外接种 α -酮戊二酸的小鼠中, 仅发现了 *H. rodentium*, *H. bilis*, 肝螺杆菌 (*H. hepaticus*) 的 DNA ; 在对照组给予了 α -酮戊二酸的小鼠中, 鉴定出 *H. hepaticus* 和 *H. rodentium* 的 DNA。在用 PBS 处理的小鼠中, 没有发现螺杆菌属的 DNA。

[0149] 该结果是用常规诊断方法得到的, 该方法由标准技术支持, 其假定活的微生物必须经培养以确定细菌在组织中的存在 (应用柯赫氏法则)。另外, 该研究由幽门螺旋杆菌和螺杆菌属其它非致病性细菌的 DNA 检测方法支持。在通过变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 的 PCR 产物电泳分离之间 PCR 和用于检测 DNA 组合物的产物序列测定是这里所描述的检测变化的方法。在实践中, 在序列测定过程中, 在 α -酮戊二酸处理的小鼠中没有发现幽门螺旋杆菌 DNA (灵敏水平: 溴化乙锭染色)。

[0150] 因此, 对于大量和各种需要预防和治疗对抗幽门螺旋杆菌和由尿素分解菌引起的泌尿生殖系统感染的患者而言, α -酮戊二酸是理想的活性物质。

[0151] α -酮戊二酸对尿素分解菌灭菌作用的机制——非常不同于迄今为止已知的那些机制, 能够安全消除这些微生物而没有导致尿素分解菌耐药性增加的担心。在实践中, 它会导致再感染和重复感染以及使用抗生素治疗难度的降低。

[0152] 如迄今为止已经确定的, α -酮戊二酸支持, 或者可替代, 标准的抗生素治疗。而且, 在恶病质的情况中, 它可以用于平衡天然尿素分解微生物群。

[0153] 根据本发明, α -酮戊二酸和 / 或在体内条件下释放 α -酮戊二酸阴离子的适当前体可用于制造预防和 / 或治疗由尿素分解菌引起的疾病的医药制剂。

[0154] 为治愈尿素分解菌引起的感染和与该感染有关的疾病, 目前根据本发明推荐给予带有导管和泌尿系统感染的患者 α -酮戊二酸, 通过向导管给予 α -酮戊二酸溶液以确保 α -酮戊二酸和细菌菌落宿主粘膜和或形成感染性结石的尿素分解菌直接接触。

[0155] 根据本发明提出的, 还推荐在泌尿生殖系统感染的情况下将 α -酮戊二酸以栓剂或灌洗剂的形式引入体腔中。

[0156] 根据本发明提出的, 含有 α -酮戊二酸的栓剂应能在肛门腺感染 (动物) 中肛门给药, 还可以在与痔疮, 疝病或者消化系统远端部分 (包括直肠) 的粘膜溃疡一起随时间形成的耐药感染中给药。

[0157] 在全身尿素分解菌感染形成菌血症 (脓毒症) 的情况下, 根据本发明目前推荐应用 α -酮戊二酸治疗, 包括直接给药入血液, 例如静脉灌注的形式。

[0158] 从外表看, 除了疝和溃疡, 尿素分解菌引起皮肤感染可以给予 α -酮戊二酸, 正如本发明所提出的, 以粉剂、敷剂和软膏形式。

[0159] 根据本发明, 固体形态的 α -酮戊二酸可以在喂养过程中给予感染的鱼类。

[0160] 在上述提及的 α -酮戊二酸给药的各种示例性途径中, 总是需要采取必要的措施以确保药物形式和含有活性成分 α -酮戊二酸的制剂的 pH 值不会刺激受感染的组织或器官, 因为刺激会导致感染严重度的增加。

[0161] 根据本发明得到的制剂可特别用于防止和 / 或抑制幽门螺旋杆菌的集群。

[0162] 以下的盐优选用作 α -酮戊二酸: α -酮戊二酸的单和双取代盐, 和碱金属盐, 和 / 或碱土金属盐和 / 或壳聚糖。优选的盐是钠盐和 / 或钙盐。

[0163] 根据本发明, α -酮戊二酸可以用于人和动物, 作为医药制剂、饮食补充剂、特殊的含药食品产品和 / 或食品 / 饲料添加剂使用, 根据情况, 用于抑制人和动物的幽门螺旋杆菌

集群,以防止幽门螺旋杆菌感染和其后果,或减轻幽门螺旋杆菌感染和其后果。

[0164] α -酮戊二酸可以和已知的载体和添加剂一起给药,这些载体和添加剂是批准用于药学应用的并且可以和选择的 α -酮戊二酸前体配伍。适合的添加剂包括,例如水、盐、葡萄糖、甘油、乙醇或其它类似物或其组合。而且,如果需要,制剂可以含有附加的物质,例如湿润剂、乳化剂、pH 调节剂、缓冲剂及其它。

[0165] α -酮戊二酸可以和其它的已知活性物质一起给药,这些活性物质是批准用于药学应用的并且可以和选择的 α -酮戊二酸前体配伍。其它有价值的活性成分是维生素,特别是维生素 C,以及许多其它成分。

[0166] 根据本发明,含有 α -酮戊二酸的制剂可以是固体和 / 或液体,取决于预期的给药途径。

[0167] 本发明还涉及 α -酮戊二酸在制备治疗和预防其它尿素分解菌感染的制剂中的用途。 α -酮戊二酸进一步的医药用途的例子包括 α -酮戊二酸在制备抑制致病性尿素分解细菌通过胃的制剂的用途,在制备预防泌尿系统中感染性结石和沉积物的形成的制剂的用途,在制备减少在导管和其它医疗装置上生物膜的形成和沉积物矿化的制剂的用途,以及在制备抑制泌尿生殖系统中其它致病性尿素分解菌生长的制剂的用途,应用形式是尿道浸注液、片剂、灌洗液、阴道片剂。

[0168] 根据本发明, α -酮戊二酸还可以膀胱输注液形式用于由尿素分解细菌引起的狗、猫和家养动物细菌感染。

[0169] α -酮戊二酸新用途的进一步的例子是用于制备调整口腔内尿素分解微生物群、减少牙垢形成和抑制龋齿发展的制剂中的用途。该产品可以是口香糖或牙膏的形式。

[0170] 根据本发明,发现 α -酮戊二酸进一步具有制备抑制尿素分解菌生长的制剂的用途,特别是脲原体属菌和其它在鱼类中引起感染的支原体。在这方面, α -酮戊二酸的新用途是用于制备防止由上述提及的尿素分解菌在鲤鱼和鲤鱼苗以及其它淡水和海水鱼类中引起的鳃部感染的制剂中的用途。

[0171] 本发明还涵盖 α -酮戊二酸在制备用于防止和 / 或抑制幽门螺旋杆菌集群的饮食补充剂、特定的含药食物产品、和食品 / 饲料添加剂中的应用。

[0172] 以下的实施例提供了本发明更好的解释。

[0173] 实施例 1.

[0174] 实验用动物:28 只 6 周龄 BALB/cA(雌性)小鼠,重 $25 \pm 2g$ (附图 1)。14 只小鼠通过管子(外径 1.3mm)使用 0.2ml 浓度为 10^9 cfu/ml 的 119/95 菌株的幽门螺旋杆菌细胞悬浮液间隔一天刺激三次。在最后一次刺激后两周,七只小鼠连续 9 天用相同的方法灌胃接种 α -酮戊二酸的钙盐或钠盐溶液(0.2ml,浓度为 30mM)(组 IA)。余下的七只小鼠像 IA 组动物那样用 0.01M 磷酸缓冲液 PBS 进行假治疗(组 IB)。

[0175] 根据幽门螺旋杆菌感染的动物的操作方案,用 0.2ml 的 PBS 处理来自组 IIA,和组 IIB 的另外 14 只小鼠。在上述处理两周,七只小鼠连续三天用 PBS(0.2ml)连续接种。余下七只小鼠用 α -酮戊二酸的盐溶液(0.2ml,浓度 30mM)处理(组 IIA)。

[0176] 在实验的第 30 天,所有小鼠用 CO_2 处死。为进一步的分析,收集感染幽门螺旋杆菌的进行或未进行 α -酮戊二酸的盐接种的小鼠血液和胃样本。实验小鼠感染幽门螺旋杆菌模型方案在附图 1 中显示。在该实验中,幽门螺旋杆菌的小鼠胃粘膜($n = 28$)集群水

平和用 α -酮戊二酸的盐灌胃治疗的小鼠之间的关系按照上述的时间方案进行研究。

[0177] 在附图 1 中,使用以下缩写。实验组 ($n = 28$) 的小鼠灌胃接种以下制剂:幽门螺旋杆菌细胞悬浮液: #; α -酮戊二酸的盐溶液: □; PBS 溶液: ●。菌株的名称,接种物(幽门螺旋杆菌)的浓度和体积, α -酮戊二酸的盐溶液和 PBS 的浓度和剂量与上面的信息相对应。字母 S 伴随的加粗的数据表示尸检的日子。尸检是按照常规标准进行的。

[0178] 所有试验动物的血样在 GAB-CAMP 琼脂平板上涂片,并在 37°C 微量需氧条件下培养 7-10 天。从胃窦一半的位置刮擦粘膜并和灭菌的 500 μ l 的 PBS 混合。匀浆平衡后,注意到从胃窦一半的位置刮擦下的粘膜的量一般都在 40 μ g-50 μ g。为计算幽门螺旋杆菌细胞数量,100 μ l 胃粘膜匀浆涂片于 GAB-CAMP 琼脂平板上,并于 37°C 在微量需氧条件下培养 5-10 天。每只小鼠的匀浆粘膜样本分三份检测。结果以平均值 \pm SD 表示。幽门螺旋杆菌的存在通过菌落形态学、尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶试验,以及革兰氏染色的细胞形态学检测加以鉴定。

[0179] 从灌胃接种了 PBS 和 α -酮戊二酸的盐的动物组织(附图 1 中的组 IIA),或灌胃接种了 PBS 的动物组织(附图 1 中的组 IIB)没有分离的幽门螺旋杆菌。

[0180] 从幽门螺旋杆菌接种然后接种 α -酮戊二酸的盐(附图 1 中的组 IA)或 PBS(附图 1 中的组 IB)的动物样本中,在培养第 5 至第 10 天间分离出了细菌。从仅感染幽门螺旋杆菌的小鼠胃粘膜胃窦部分离的菌落数(平均值 \pm SD)是 $7.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$,而根据实验设计灌胃 α -酮戊二酸的盐治疗的小鼠,分离的菌落数(平均值 \pm SD)是 $3.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$ (附图 3)。连续 9 天中共 9 次,在对小鼠幽门螺旋杆菌最后感染量给予后 14 天开始的 α -酮戊二酸的盐的胃内诱导引起了 49% 程度的幽门螺旋杆菌菌落的降低。这解释为 α -酮戊二酸的盐对幽门螺旋杆菌胃内集群阶段的抑制作用。

[0181] 从小鼠采集的血液样本中没有分离到幽门螺旋杆菌和其它细菌。

[0182] 所得到的结果如以下表 1 所示。

[0183] 表 1. 从非感染和感染幽门螺旋杆菌接种或不接种 α -酮戊二酸的盐的小鼠胃粘膜匀浆中分离的幽门螺旋杆菌

[0184]

接种*	幽门螺旋杆菌培养**	
	感染小鼠数/组	细菌数 (cfu) /小鼠
幽门螺旋杆菌+PBS (组 IB)	7/7	$7.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$
PBS (组 IIB)	0/7	0
幽门螺旋杆菌+AKG (组 IA)	7/7	$3.8 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$

[0185]

PBS+AKG (组 IIA)	0/7	0
------------------------	------------	----------

[0186] */ 根据附图 1 的设计方案。

[0187] **/ 细菌在 GAB-CAMP 固体平板上涂片培养。

[0188] 只感染幽门螺旋杆菌的动物 (幽门螺旋杆菌 +PBS), 感染幽门螺旋杆菌并随后接种 α -酮戊二酸的盐的动物 (幽门螺旋杆菌 +AKG), 及对照组没有感染的动物, 只接种 PBS 的动物或接种 PBS 和 α -酮戊二酸的盐的动物 (PBS+AKG)。

[0189] 实施例 2.

[0190] 实验用动物: 48 只 6 周龄 BALB/cA (雌性) 小鼠, 重 $25 \pm 2g$ (附图 2)。24 只组 IIIB 和组 III 的小鼠 (附图 2) 使用 0.2ml 浓度为 10^9 cfu/ml 的 119/95 菌株的幽门螺旋杆菌细胞悬浮液间隔一天刺激三次。在最后一次攻击后八天, 16 只小鼠连续 3 天通过管子灌胃接种 0.2ml 浓度为 30mM 的 α -酮戊二酸的盐溶液 (组 IIIB)。余下的 8 只小鼠用 0.2ml 的 0.01M 的 PBS 根据组 III 的操作进行假治疗 (组 III)。

[0191] 剩余 24 只小鼠 (附图 2) 间隔一天胃内给予 0.2ml 浓度为 0.01M 的 PBS 三次。上述处理后 8 天, 16 只小鼠连续三天接种 α -酮戊二酸的盐 (0.2ml, 浓度 30M) (组 IVB)。余下的 8 只小鼠用 0.2ml 的 0.01M 的 PBS 处理 (组 IV)。

[0192] 在实验的第 20 天, 所有小鼠用 CO₂ 处死。为进一步的研究, 收集胃和血液样本。

[0193] 在附图 2 中, 使用以下缩写。实验组 (n = 76) 的小鼠灌胃接种以下制剂: 幽门螺旋杆菌细胞悬浮液: #; α -酮戊二酸的盐溶液: □; PBS 溶液: ●。菌株的名称, 接种物 (幽门螺旋杆菌) 的浓度和体积, α -酮戊二酸的盐溶液和 PBS 的浓度和剂量与上面的信息相对应。字母 S 伴随的加粗的数据表示尸检的日子。尸检是按照常规标准进行的。

[0194] 如实施例 1 所示, 从收集的样本中, 幽门螺旋杆菌在 GAB-CAMP 琼脂平板上培养。还分离 DNA 与引物 (5' CTATGACGGTATCCGGC-3' 和 (5' -CTCACGACACGAGCTGAC-3') 进行 PCR, 该引物识别螺杆菌属细菌 DNA 的 16S rDNA 片段。然后根据变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE) 分离大小 470bp 的 PCR 产物并进行测序。在 9% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺 / 双丙烯酰胺溶液, 比率为 37.5:1) 中进行 DGGE 分析。电泳是在温度 60°C 下 125V 下 16 小时过程内完成。

[0195] 所得结果如以下表 2 所示。

[0196] 表 2. 感染幽门螺旋杆菌接种或不接种 α -酮戊二酸的盐的小鼠胃粘膜 (窦部位) 匀浆中的螺杆菌属细菌, 包括幽门螺旋杆菌

[0197]

接种*	幽门螺旋杆菌培养		16S rDNA PCR——螺杆菌属细菌	
	小鼠数	细菌数 (cfu) /小鼠	小鼠数	
	感染的 组		幽门螺旋杆菌 DNA 组	非幽门螺旋杆菌 DNA 组
幽门螺旋杆菌+PBS (组 III)	8/8	$4.3 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$	8/8	2/8
幽门螺旋杆菌+AKG (组 IIIB)	0/16	0	0/16	5/16
PBS+AKG (组 IVB)	0/16	0	0/16	3/16
PBS (组 IV)	0/8	0	0/8	0/8

[0198] */ 根据附图 2 的设计方案。

[0199] 只感染幽门螺旋杆菌的动物 (幽门螺旋杆菌 +PBS), 感染幽门螺旋杆菌并随后接种 α -酮戊二酸的盐的动物 (幽门螺旋杆菌 +AKG), 及对照组没有感染的动物, 只接种 PBS 的动物或接种 PBS 和接种 α -酮戊二酸的盐的动物 (PBS+AKG)。

[0200] 8 只感染幽门螺旋杆菌 +PBS (附图 2 中的组 III) 的小鼠的 8 个胃样本中分离到幽门螺旋杆菌。应用 PCR 在由相同的胃样本分离的 DNA 中鉴别 16S rDNA 幽门螺旋杆菌特定片段。

[0201] 得自于 16 只感染幽门螺旋杆菌并用 α -酮戊二酸的盐处理 (附图 2 中的组 IIIB) 小鼠的胃样本中均未发现幽门螺旋杆菌培养物或 PCR 产物中幽门螺旋杆菌的特定序列 (表 2)。

[0202] 从这些动物采集的血液样本中没有培养出幽门螺旋杆菌。使用所选择的引物, 分离自 PBS 处理 (附图 2 中的组 IV) 的 8 只小鼠的血液和胃样本的 DNA 没有扩增。

[0203] 在附图 3 的插图中显示了使用 DGGE 技术评估的在电流电场中通常用于螺杆菌属细菌 16S rDNA 片段的 PCR 产物的移动性。A :小家鼠螺杆菌 (*H. muridorum*), B :*H. bilis*, C :幼禽螺杆菌, D :幽门螺旋杆菌, E :螺杆菌属 *spp. flexispira taxon 8*"F.rappini", F :肝螺杆菌 (*H. hepaticus*), G :*H. bizzozeronii* 作为标记物。箭头指示 *H. bilis* 的 DNA。字母 1 到 8 评估从实施例 2 中 PCR 产物迁移路径。

[0204] 在从感染幽门螺旋杆菌及然后用或不用 α -酮戊二酸的盐处理的小鼠, 或未受感染的小鼠的胃窦部位提取的 16 个 PCR 产物中检测到了 19 个大小为 470bp 的 DNA 片段。结果如附图 3 和以下表 3 所示。在这些片段中发现的 DNA 片段的序列测定 (n = 19) (在 DGGE 之前分离) 符合幽门螺旋杆菌 (n = 8), 以及 *H. rodentium* (n = 4), *H. bilis* (n = 3) 和肝螺杆菌 (*H. hepaticus*) (n = 4) (附图 3)。

[0205] 表 3. 胃粘膜刮屑 (胃窦部位) 匀浆扩增后得到的 PCR 产物的序列测定

[0206]

接种*	PCR 产物	螺杆菌属 spp.
幽门螺旋杆菌+PBS (组 III)	1.	幽门螺旋杆菌
	2.	幽门螺旋杆菌
	3.	幽门螺旋杆菌
	4.	幽门螺旋杆菌
	5.	幽门螺旋杆菌, <i>H. bilis</i>
	6.	幽门螺旋杆菌
	7.	幽门螺旋杆菌, <i>H. bilis</i>
	8.	幽门螺旋杆菌
幽门螺旋杆菌+AKG (组 IIIB)	1.	<i>H. rodentium</i> , <i>H. bilis</i>
	2.	肝螺杆菌
	3.	<i>H. rodentium</i>
	4.	肝螺杆菌
	5.	<i>H. rodentium</i>
PBS+AKG (组 IVB)	1.	肝螺杆菌
	2.	肝螺杆菌
	3.	<i>H. rodentium</i>

[0207] */ 根据附图 2 的设计方案。

[0208] 只感染幽门螺旋杆菌的动物 (幽门螺旋杆菌 +PBS), 感染幽门螺旋杆菌并随后接种 α -酮戊二酸的盐的动物 (幽门螺旋杆菌 +AKG), 及没有感染, 接种 α -酮戊二酸的盐的动物 (PBS+AKG)。

[0209] 如上表 3 中, 在 3 只不同的小鼠中检测到两个螺杆菌属种的 DNA: 幽门螺旋杆菌和 *H. bilis*, 以及 *H. rodentium* 和 *H. bilis*。在组 III (幽门螺旋杆菌 +PBS) 的 2 只小鼠的胃样本中发现了幽门螺旋杆菌和 *H. bilis*。在组 IIIB (幽门螺旋杆菌 + α -酮戊二酸的盐) 的小鼠胃样本中, 检测到了 *H. rodentium* 和 *H. bilis* (表 3)。然后在 4 个动物中鉴别出了肝螺杆菌的 DNA, 两只组 IIIB (幽门螺旋杆菌 + α -酮戊二酸的盐) 的小鼠, 和两只接种了 PBS+ α -酮戊二酸的盐 (组 IVB) 的小鼠 (表 3)。

[0210] *H. bilis* 的 DNA 没有单独出现在任何 PCR 产物中, 而 *H. rodentium* 的 DNA 出现在三个样本中, 没有序列相伴, 并且在一个样本中与 *H. bilis* 的 DNA 一起出现 (附图 3. 表 3)。

[0211] 总之, 仅感染幽门螺旋杆菌 (组 III) 的小鼠胃粘膜窦部位分离的菌落数量 (平均值 \pm SD) 为 $4.3 \times 10^2 \pm 5.0 \times 10^1$, 而在额外胃内给予 α -酮戊二酸的盐处理 (组 IIIB) 之后, 便没有幽门螺旋杆菌菌落被培养出来 (表 2)。在最后一次小鼠感染幽门螺旋杆菌剂量间隔 8 天后开始的, 连续 3 天 3 次灌胃给予 α -酮戊二酸的盐引起了细菌菌落集群的完全抑制效果和幽门螺旋杆菌从胃粘膜中的完全消除。

[0212] 而且, 在实验过程中, 胃尿分解微生物群的组成发生了变化, 并且在感染了幽门螺旋杆菌 (组 III) 的小鼠中也鉴别出了 *H. bilis* 的 DNA, 而在随后接种 α -酮戊二酸的盐 (组 IIIB) 的小鼠中, 仅仅发现了 *H. rodentium*, *H. bilis*, 肝螺杆菌的 DNA, 在用 α -酮戊二酸的盐处理的对照组小鼠中 (组 IVB) 鉴别出肝螺杆菌和 *H. rodentium* 的 DNA。

[0213] 实施例 3.

[0214] α -酮戊二酸的钙和钠盐水溶液混合或单独制备并且作为添加剂用于日用产品和饮料中。

[0215] α -酮戊二酸的盐 0.001g-0.2g

[0216] 葡萄糖 20g

[0217] 水 加至 100g

[0218] 治疗和 / 或预防有效量为每日剂量从 0.001g 至 0.2g/kg 体重。

[0219] 应用模型动物 (小鼠) 和志愿者的参与, 已经证实了以水溶液形式灌胃或口服给予 α -酮戊二酸钠和 / 或钙盐, 获得了预防活性, 感染过程的减轻以及减少幽门螺旋杆菌的胃肠道集群。

[0220] 实施例 4

[0221] 在九月和十一月间, 10 名 (6 男 4 女, 年龄在 45-60 岁, 体重 60-95 公斤) 通过微生物方法 (内窥镜检查) 证实的幽门螺旋杆菌感染者, 在每年的这个时间经历了肠道急性症状, 自愿在每日早餐结合奶饮品服用 α -酮戊二酸的钙盐 (2g)。治疗两周后, 胃灼热症状和其它消化不良特征在选择的志愿者中消失。消化不良症状的缺少在 AKG 给药后维持了一个月时间。

[0222] 本发明实施例说明尿素分解菌——在这一例子中为幽门螺旋杆菌——是如何完成对抗宿主生物体细胞以接近底物, 即尿素的。胃灌注导入 α -酮戊二酸的盐利于尿素由尿素分解菌分解成氨满足大生物体的需要, 即在 α -酮戊二酸作为试剂之一的谷氨酸合成中的需要。不管细菌尿素酶的活性如何, 胃环境总保持酸性 pH 值, 防止幽门螺旋杆菌微生物环境的形成。因此, 大生物体粘膜尿素分解菌的集群被阻碍和停止了。 α -酮戊二酸还用于防止尿素分解菌引起的感染。

[0223] 本发明涉及以下实施方式:

[0224] 1. α -酮戊二酸盐在制备预防或治疗活的生物体不希望的健康状况的医药制剂中的新用途, 其中所述活的生物体包括人、植物和动物, 特别是宠物和家畜, 例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物, 所述的不希望的健康状况与生物体内尿素分解菌的存在和 / 或活性相关。

[0225] 2. 如实施方式 1 所述的用途, 其中所述不希望的健康状况是与胃肠道、呼吸和 / 或泌尿生殖系统中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的状况, 所述尿素分解菌来自包括幽门螺旋杆菌, 来自布鲁氏杆菌属的菌株, 尿素酶阳性菌例如解脲尿支原体的菌株, 和其他嗜碱性菌例如巴氏芽孢杆菌, 尿素酶生成小肠结肠炎耶尔森氏杆菌, 参与在导管及其他医学装置上生物膜的形成以及沉积物的矿化的尿素分解菌, 引起口腔粘膜感染、牙龈疾病、龋齿、引起牙垢形成的尿素分解菌, 引发由变形杆菌、尿支原体属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属、普罗威登斯菌属、棒杆菌属的泌尿系统感染过程中的感染性结石形成的尿素分解菌, 特别是奇异变形菌, 和引起生殖道感染——特别是其较低部位感染的支原体, 人型支原体和解脲尿支原体。

[0226] 3. 如实施方式 1 或 2 所述的用途, 其中所述制剂被制成适合于有效量的活性物质向目标尿素分解菌的出现部位递送或局部给药的形式。

[0227] 4. 如实施方式 3 所述的用途, 其中所述适合向目标尿素分解菌出现的部位局部给

药的制剂是口服给药制剂、静脉输注制剂、灌注液、阴道片剂、栓剂或其他任何适于向目标尿素分解菌的特定出现部位给药的制剂形式。

[0228] 5. 如实施方式 4 所述的用途,其中所述适合向目标尿素分解菌的出现部位局部给药的制剂进一步包含其他可与 α -酮戊二酸盐配伍并且有益于治疗不希望的健康状况的活性成分。

[0229] 6. 如前述实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中制备所述制剂用于预防幽门螺旋杆菌集群和其结果,特别是例如胃和十二指肠溃疡、消化道溃疡、胃淋巴瘤、伴有肠化生的慢性萎缩性胃炎和胃癌的疾病。

[0230] 7. 如实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中制备所述制剂用于尿素分解肠道微生物群的调节,全身整体性的稳定和用于平衡感染后及恶病质过程中的肠道微生物群。

[0231] 8. 如实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中制备所述制剂用于抑制致病尿素分解菌经胃的通过。

[0232] 9. 如实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中所述制剂以口香糖或牙膏的形式制备得到,用于调节口腔内尿素分解微生物群,减少牙垢的形成和抑制龋齿。

[0233] 10. 如实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中制备所述制剂用于预防沉积物的形成和泌尿系统感染性结石。

[0234] 11. 如实施方式 1 或 2 所述的用途,其中制备所述制剂用于抑制尿素分解菌,特别是脲原体属和其他引起鱼类感染的支原体的生长。

[0235] 12. 如实施方式 11 所述的用途,其中制备所述制剂用于预防由某些尿素分解菌引起的鲤鱼和鲤鱼苗,以及其他淡水和海水鱼类的鳃部炎症。

[0236] 13. 如实施方式 1-5 任一项所述的用途,其中制备所述制剂用于减少在导管及其他医学装置上生物膜的形成和沉积物的矿化。

[0237] 14. 如实施方式 1-13 任一项所述的用途,其中含有 α -酮戊二酸盐的制剂被制备得到,其用量调整为以治疗有效剂量,特别是以 0.001-0.2g/kg 体重 / 天的剂量,或者以 0.01-10g/m²组织表面积 / 天的剂量。

[0238] 15. 一种预防和治疗活的生物体不希望的健康状况的医药制剂,其是根据实施方式 1-14 任一项所制备的,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物,所述的不希望的健康状况与生物体内尿素分解菌的存在和 / 或活性相关。

[0239] 16. 用于预防活的生物体不希望的健康状况的饮食补充剂,其特征在于其含有 α -酮戊二酸盐,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物,所述的不希望的健康状况与生物体内尿素分解菌的存在和 / 或活性相关。

[0240] 17. 用于预防活的生物体不希望的健康状况的药用食物产品,其特征在于其含有 α -酮戊二酸盐,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物,所述的不希望的健康状况与生物体内尿素分解菌的存在和 / 或活性相关。

[0241] 18. 起预防作用的用于预防活的生物体幽门螺旋杆菌集群的食品 / 饲料添加剂,其特征在于其含有 α -酮戊二酸盐,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、

鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物。

[0242] 19. 如实施方式 1 所述的用途,其中所述不希望的健康状况是与尿素酶生成植物致病菌的存在和 / 或活性相关的植物状况,所述制剂被制成适合于向目标尿素分解菌的出现部位递送有效量的活性物质的制剂。

[0243] 20. 一种预防或治疗活的生物体不希望的健康状况的方法,所述活的生物体包括人、宠物和家畜,例如哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、软体动物或节肢动物,所述不希望的健康状况和生物体内尿素分解菌的存在和 / 或活性相关,其中给予需要这种治疗的生物体预防或治疗有效量的 α -酮戊二酸盐,特别是向目标尿素分解菌的出现部位局部给药。

[0244] 21. 如实施方式 20 所述的方法,其中所述不希望的健康状况是与胃肠道、呼吸和 / 或泌尿生殖系统中的尿素分解菌的存在和 / 或活性相关的状况,所述尿素分解菌来自包括幽门螺旋杆菌,来自布鲁氏杆菌属的菌株,尿素酶阳性菌例如解脲尿支原体的菌株,和其他嗜碱性菌例如巴氏芽孢杆菌,尿素酶生成小肠结肠炎耶尔森菌杆菌,参与在导管及其他医学装置上生物膜的形成以及沉积物的矿化的尿素分解菌,引起口腔粘膜感染、牙龈疾病、龋齿、引起牙垢形成的尿素分解菌,引发由变形杆菌、尿支原体属、克雷伯氏菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属、普罗威登斯菌属、棒杆菌属的泌尿系统感染过程中的感染性结石形成的尿素分解菌,特别是奇异变形菌,和引起生殖道感染—特别是其较低部位感染的支原体,人型支原体和解脲尿支原体。

[0245] 22. 如实施方式 20 或 21 所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐是以口服给药制剂、静脉输注制剂、灌注液、阴道片剂、栓剂或其他任何适于向目标尿素分解菌的特定出现部位给药的制剂形式给药。

[0246] 23. 如实施方式 22 所述的方法,其中以适合向目标尿素分解菌的出现部位局部给药的 α -酮戊二酸盐与其他可与 α -酮戊二酸盐配伍并且有益于治疗不希望的健康状况的活性成分一同给药。

[0247] 24. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述的预防或治疗性治疗不希望的健康状况与活的生物体的幽门螺旋杆菌集群和其结果相关,特别是与例如胃和十二指肠溃疡、消化道溃疡、胃淋巴瘤、伴有肠化生的慢性萎缩性胃炎和胃癌的疾病相关。

[0248] 25. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括尿素分解肠道微生物群的调节,全身整体性的稳定和用于平衡感染后及恶病质过程的肠道微生物群。

[0249] 26. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括抑制致病尿素分解菌经胃的通过。

[0250] 27. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括调节口腔内尿素分解微生物群,减少牙垢的形成,和抑制龋齿,并且 α -酮戊二酸盐以口香糖或牙膏的形式施用。

[0251] 28. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括预防沉积物的形成和泌尿系统感染性结石。

[0252] 29. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括抑制尿素分解菌,特别是脲原体属和其他引起鱼类感染的支原体的生长。

[0253] 30. 如实施方式 29 所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐预防性给药用于对抗由

某些尿素分解菌引起的鲤鱼和鲤鱼苗,以及其他淡水和海水鱼类的鳃部炎症。

[0254] 31. 如前述实施方式 20-23 任一项所述的方法,其中所述预防或治疗性治疗包括减少在导管及其他医学装置上生物膜的形成和沉积物的矿化。

[0255] 32. 如前述实施方式 20-31 任一项所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐以预防或治疗有效量局部口服给药,特别是以 0.001-0.2g/kg 体重 / 天的剂量。

[0256] 33. 如前述实施方式 20-31 任一项所述的方法,其中所述 α -酮戊二酸盐以适于局部给药的预防或治疗有效量给药,特别是以 0.01-10g/m²组织表面积 / 天的剂量。

[0257] 34. 基于包含木脂素和纤维素的生物量依靠细菌酶的转变制备有机生物燃料的方法,其中所述酶是在 α -酮戊二酸盐存在下应用的,所述酶是由食木高等白蚁后肠尿素分解微生物群产生的。

[0258] 35. 如实施方式 34 的方法,其中 α -酮戊二酸盐以足以使该方法的产率增加至少 5% 的比率应用。

[0259] 36. 如实施方式 34 或 35 的方法,其中所述的酶以不含有破裂的尿素分解菌细胞碎片的纯化形式应用。

[0260] 37. 如实施方式 34 或 35 的方法,其中所述的酶以非纯化形式,即与破裂的细菌细胞碎片混合或由尿素分解菌释放的形式应用。

[0001]

序列表

<110>	KRUSZEWSKA, Danuta	
<120>	α -酮戊二酸的新医药用途	
<130>	EP-I/148900	
<140>	EP 07 460015.6	
<141>	2007-07-03	
<150>	PL380103	
<151>	2006-07-03	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	螺旋杆菌属物种	
<400>	1	
	ctatgacggg tatccggc	18
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	螺旋杆菌属物种	
<400>	2	
	ctcaccgacac gagctgac	18

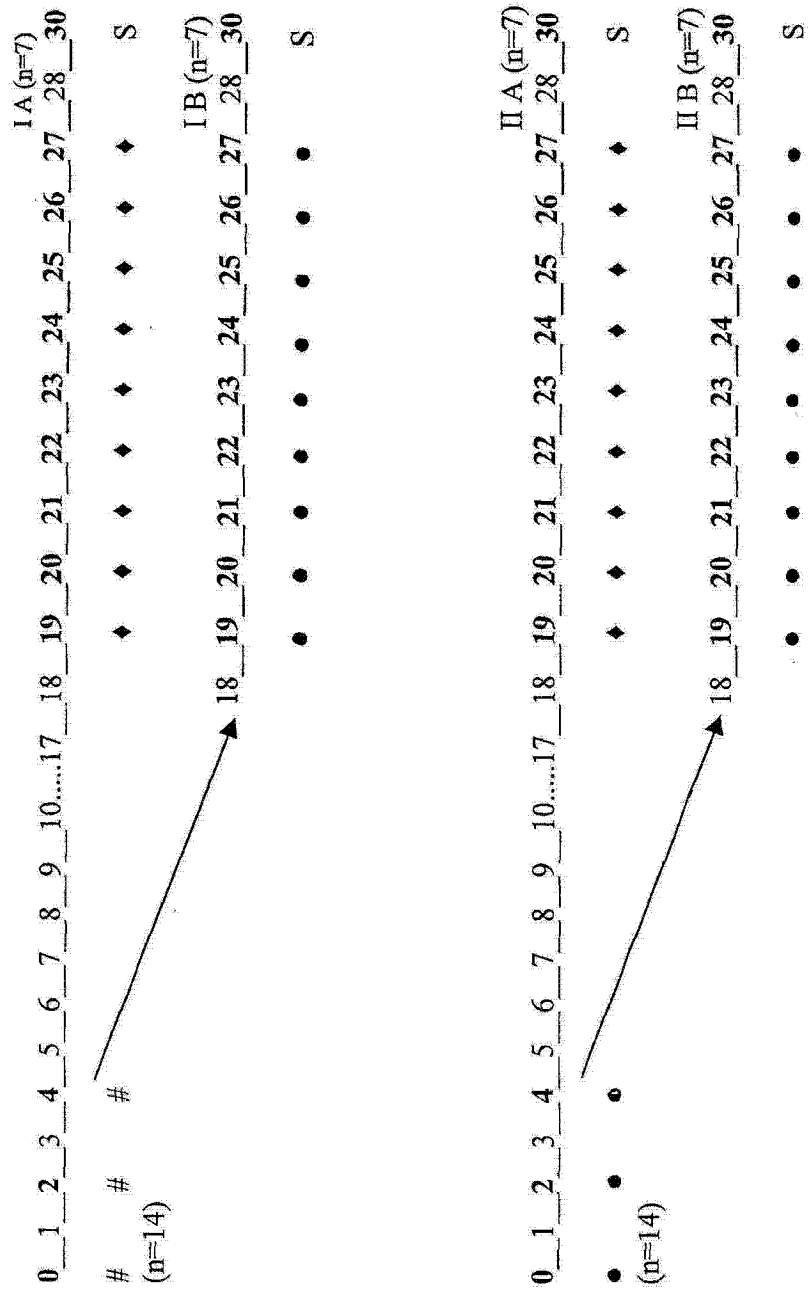


图 1

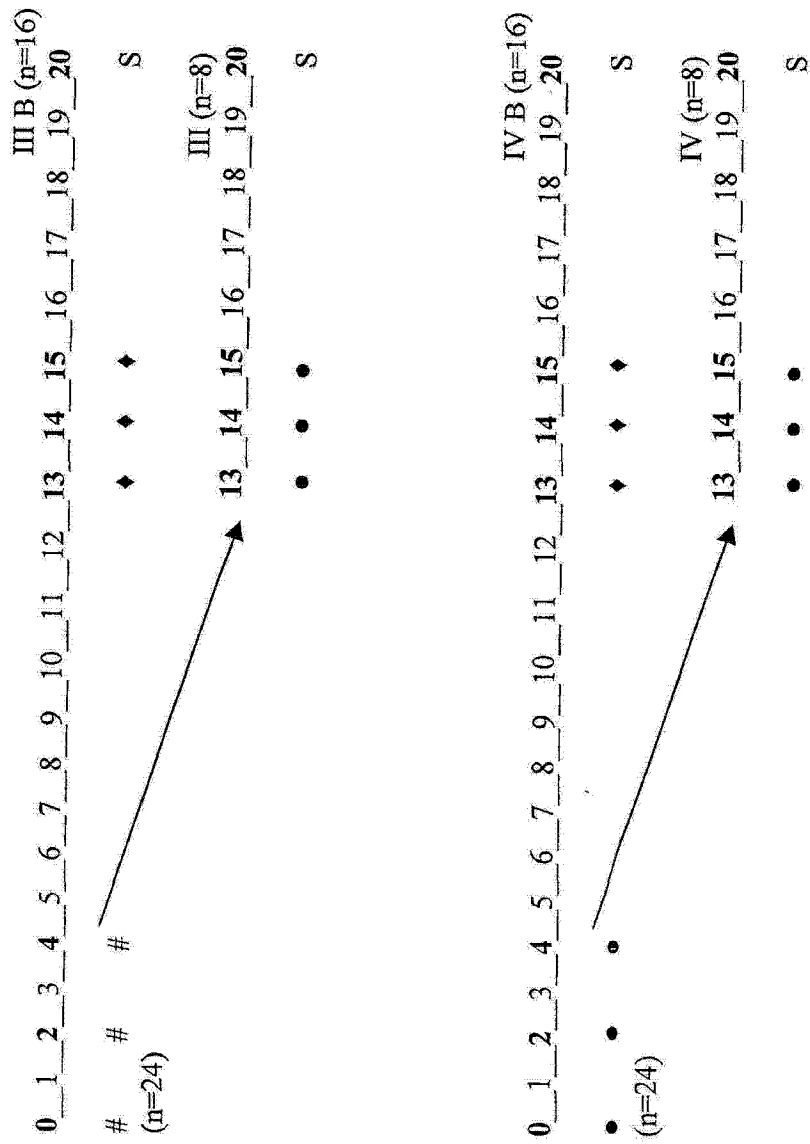


图 2

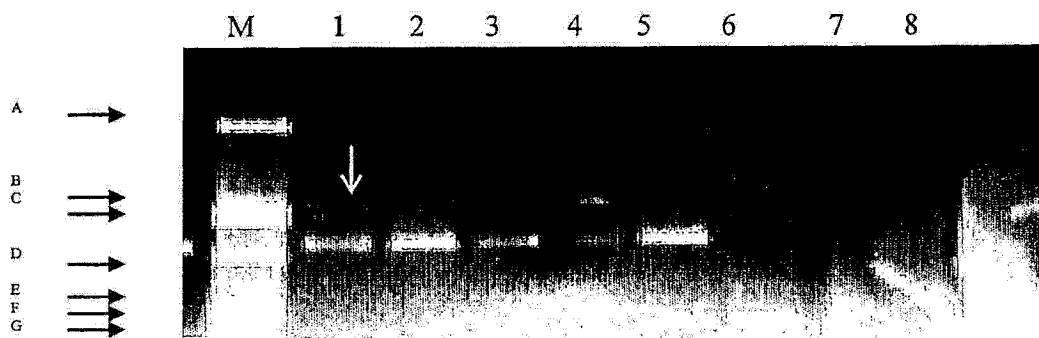


图 3