



(10) 授权公告号 CN 111526873 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 04

(21) 申请号 201880055664.4

(22) 申请日 2018.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111526873 A

(43) 申请公布日 2020.08.11

(30) 优先权数据
62/537,661 2017.07.27 US
62/676,676 2018.05.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/043833 2018.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/023425 EN 2019.01.31

(73) 专利权人 生物曼迪克斯有限责任公司
地址 美国俄亥俄

(72) 发明人 K·M·麦克圭勒 C·蔡
E·L·普罗茨尼克
A·M·麦克科米克

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 郑天松

(51) Int.Cl.
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/09 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2002103262 A1, 2002.08.01
US 2016296477 A1, 2016.10.13

审查员 张冲

权利要求书4页 说明书18页 附图16页

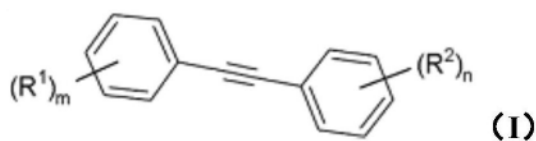
(54) 发明名称

用于调节微生物定殖的经取代的二苯乙炔

(57) 摘要

本申请描述了通过与包含经取代的二苯乙炔化合物的抗微生物制剂接触来对物理或生物表面进行消毒的方法,所述取代为例如在所述二苯乙炔的1个或2个苯环上的1个或多个烷氧基(例如甲氧基)和羟基取代基。根据剂量和可疑微生物,化合物和方法为抑微生物和/或杀微生物的。可疑的病原微生物包括革兰氏阴性细菌,例如铜绿假单胞菌(P.aeruginosa)和大肠埃希氏菌(E.coli);革兰氏阳性细菌,例如金黄色葡萄球菌(S.aureus),包括MRSA;以及真菌病原体,例如假丝酵母属(Candida)和白色假丝酵母(C.albicans)。本申请还描述了抑制或破坏一种或多种微生物的生物膜形成的方法。

1. 具有结构(I)的经取代的二苯乙炔化合物及其盐在制备用于抑制可疑病原微生物在物理或生物表面上生长或杀灭在物理或生物表面上的可疑病原微生物的制剂中的用途:



其中 R^1 和 R^2 是在苯环的任何可用位置上的独立取代基, m 和 n 独立地是1、2或3,分别代表苯环上的取代基数;且

其中每个 R^1 、 R^2 独立地选自:羟基;巯基; $-(C_1 \sim C_6)$ 烷氧基; $-(C_1 \sim C_6)RH$,其中 R 是O或S;或(卤代) $_p(C_1 \sim C_6)$ 烷基-,其中 p 是1、2或3;

然而,前提条件是 R^1 或 R^2 中的至少1个是甲氧基,

其中所述可疑病原微生物是:

(i) 细菌病原体,其选自下列物种:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)和大肠埃希氏菌(*E.coli*);或

(ii) 假丝酵母属(*Candida*)真菌。

2. 权利要求1的用途,其中 R^1 和 R^2 中的至少1个是羟基。

3. 权利要求1的用途,其中

R^1 是 $-(C_1 \sim C_6)$ 烷氧基,且

m 是1或2。

4. 权利要求3的用途,其中

R^2 是羟基,且

n 是1、2或3。

5. 权利要求1的用途,其中

R^2 是羟基,且

n 是1、2或3。

6. 权利要求1的用途,其中所述经取代的二苯乙炔选自:4,4'-二羟基-3-甲氧基二苯乙炔,4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔,2,4,4'-三甲氧基二苯乙炔和3,5,3',5'-四甲氧基二苯乙炔。

7. 权利要求1的用途,其中所述经取代的二苯乙炔化合物的存在量是基于所述制剂的总重量的约0.01%~约30%。

8. 权利要求1的用途,

其中所述制剂的pH是约4.1~约8.5,且

其中所述制剂还包含清洁剂和第二抗微生物剂。

9. 权利要求8的用途,其中所述清洁剂不含苯酚。

10. 权利要求8的用途,其中所述第二抗微生物剂选自:苯酚,双氯酚,六氯酚,醛,醇,抗微生物羧酸,有机金属化合物,碘化合物,季铵化合物,硫和磷化合物,巯基化合物及其碱金属、碱土金属和重金属盐,脲,三溴水杨酰苯胺,2-溴-2-硝基-1,3-二羟基丙烷,二氯苯并噁唑酮,氯己定,异噻唑酮,苯并异噻唑酮以及这些化合物中任意两种或多种的组合。

11. 权利要求1的用途,其中所述表面是物理表面,所述物理表面选自:手术设备,手术

器械和台面表面,所述物理表面必须进行灭菌、且在整个手术过程中保持无菌。

12. 权利要求1的用途,其中所述表面是选自食物制备表面的物理表面,所述食物制备表面选自:砧板,台面和炊具。

13. 权利要求1的用途,其中所述表面是在皮肤未完全保持完整的部位处的生物表面,所述部位选自:静脉内管线或端口,动脉管线或端口,PICC管线,导管,引流管和切口部位。

14. 权利要求1的用途,其中所述表面是选自下列的人类生物表面:皮肤,头发,眼睛,粘膜以及内部或外部孔口。

15. 权利要求14的用途,其中所述皮肤是头皮。

16. 权利要求1的用途,其中所述真菌是白色假丝酵母(*Candida albicans*)。

17. 权利要求1的用途,

其中所述制剂还包含抗生素,或者

其中所述物理或生物表面进一步与所述抗生素接触。

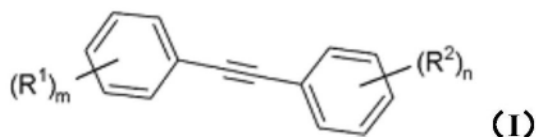
18. 权利要求17的用途,其中所述抗生素包括:氨基糖苷,安沙霉素,碳头孢烯,FLAGYL(甲硝唑),碳青霉烯,头孢菌素,糖肽,大环内酯,单酰胺菌素,青霉素,多肽,多粘菌素,喹诺酮,磺酰胺或四环素。

19. 权利要求18的用途,其中所述氨基糖苷是硫酸新霉素。

20. 权利要求17的用途,其中所述抗生素选自:克林霉素,替加环素,万古霉素,环丙沙星,氧氟沙星,磺胺甲噁唑,甲氧苄啶/磺胺甲噁唑,阿莫西林,青霉素V,青霉素G,普鲁卡因青霉素,苄星青霉素,羧苄西林,美洛西林,氨苄西林,哌拉西林,肿凡纳明,氯霉素,林可霉素,乙胺丁醇,磷霉素,夫西地酸,呋喃唑酮,异烟肼,利奈唑胺,甲硝唑,莫匹罗星,呋喃妥因,平板霉素,吡嗪酰胺,奎奴普汀/达福普汀,利福平,甲砒霉素,Timidazole,氨苯砒,氯法齐明,巴氨西林,替卡西林,哌拉西林/三唑巴坦,氨曲南,头孢替坦,氯碳头孢,MEFOXIN, MERREM,左氧氟沙星,洛美沙星,Primaxim,环丝氨酸,卡那霉素,双氯西林,地美环素,米诺环素,多西环素,土霉素,妥布霉素,庆大霉素,新霉素,阿米卡星,Craramycin,Nebsin,红霉素/磺胺甲噁唑,奈替米星,链霉素,头孢噻肟,头孢呋辛,头孢唑林,头孢布烯,头孢噻肟,头孢克洛,头孢哌酮,头孢丙烯,头孢羟氨苄一水合物,头孢他啶,头孢氨苄,头孢孟多酯钠,头孢吡肟,头孢尼西,磺胺嘧啶,诺氟沙星,依诺沙星,头孢地尼,Seromycin,头孢曲松,头孢克肟,克拉霉素,地红霉素,乌洛托品,乙硫异烟胺,曲伐沙星,司氟沙星,干扰素- α ,茚地那韦,更昔洛韦,膦甲酸,拉米夫定,泛昔洛韦,金刚乙胺,扎西他滨,干扰素- β ,沙奎那韦,利托那韦,利巴韦林,红霉素,醋竹桃霉素,阿奇霉素,粘菌素,两性霉素B,氟胞嘧啶,氟康唑,灰黄霉素,格帕沙星,特比萘芬,酮康唑,克霉唑,地拉韦啶,齐多夫定,金刚烷胺,帕利珠单抗,伐昔洛韦,去羟肌苷,奈非那韦,奈韦拉平,西多福韦,乙胺嘧啶,阿托伐醌,司他夫定,拉美夫定,阿昔洛韦,Miconazole,制霉菌素,伊曲康唑,氯喹,甲氟喹,羟氯喹,卷曲霉素,扑灭司林,克罗米通,氟-尿嘧啶,利福布汀,氨基水杨酸,利福喷汀,Coenzoyl过氧化物,葡萄糖酸氯己定,钠奥昔氯生,苯甲酰基过氧化物,利福平,利福平/异烟肼,利福平/异烟肼/吡嗪酰胺,萘啶酸,阿托品,土霉素/磺胺甲二唑/非那吡啶,氯霉素,新霉素/多粘菌素,甲氧苄啶/Polythyxin,妥布霉素/地塞米松,阿糖腺苷,磺胺醋酰胺,Povidoneiodine,杆菌肽,硫康唑,四氯水杨酰苯胺,Metromdazole,环吡司胺,克霉唑/倍他米松,布替萘芬,萘替芬,奥昔康唑,硒,益康唑,喷昔洛韦或其药学上可接受的盐。

21. 权利要求20的用途,其中所述灰黄霉素是超微尺寸灰黄霉素。

22. 具有结构(I)的经取代的二苯乙炔化合物及其盐在制备用于抑制或破坏一种或多种微生物的生物膜形成的制剂中的用途:



其中 R^1 和 R^2 是在苯环的任何可用位置上的独立取代基, m 和 n 独立地是1、2或3,分别代表苯环上的取代基数;且

其中每个 R^1 、 R^2 独立地选自:羟基;巯基; $-(C_1 \sim C_6)$ 烷氧基; $-(C_1 \sim C_6)RH$,其中 R 是O或S;或(卤代) $_p(C_1 \sim C_6)$ 烷基-,其中 p 是1、2或3;

然而,前提条件是 R^1 或 R^2 中的至少1个是甲氧基,

其中所述微生物是:

(i) 细菌病原体,其选自下列物种:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)和大肠埃希氏菌(*E. coli*);或

(ii) 假丝酵母属(*Candida*)真菌。

23. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物以约0.008mM~约1mM的浓度存在于所述制剂中。

24. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物以约0.625mM的浓度存在于所述制剂中。

25. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物在所述制剂中的存在量是基于所述制剂总重量的约0.0001%~约30%。

26. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物在所述制剂中的存在量是基于所述制剂总重量的约0.01%~约25%。

27. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物在所述制剂中的存在量是基于所述制剂总重量的约0.1%~约30%。

28. 权利要求22的用途,其中所述二苯乙炔化合物包括4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔。

29. 权利要求22的用途,

其中所述制剂还包含抗生素,或

其中一种或多种微生物进一步与所述抗生素接触。

30. 权利要求29的用途,其中所述抗生素包括:氨基糖苷,安沙霉素,碳头孢烯,FLAGYL(甲硝唑),碳青霉烯,头孢菌素,糖肽,大环内酯,单酰胺菌素,青霉素,多肽,多粘菌素,喹诺酮,磺酰胺或四环素。

31. 权利要求30的用途,其中所述氨基糖苷是硫酸新霉素。

32. 权利要求29的用途,其中抗生素选自:克林霉素,替加环素,万古霉素,环丙沙星,氧氟沙星,磺胺甲噁唑,甲氧苄啶/磺胺甲噁唑,阿莫西林,青霉素V,青霉素G,普鲁卡因青霉素,苄星青霉素,羧苄西林,美洛西林,氨苄西林,哌拉西林,肿凡纳明,氯霉素,林可霉素,乙胺丁醇,磷霉素,夫西地酸,呋喃唑酮,异烟肼,利奈唑胺,甲硝唑,莫匹罗星,呋喃妥因,平板霉素,吡嗪酰胺,奎奴普丁/达福普汀,利福平,甲砒霉素,Trimidazole,氨苯砒,氯法齐明,巴

氨西林,替卡西林,哌拉西林/三唑巴坦,氨曲南,头孢替坦,氯碳头孢,MEFOXIN,MERREM,左氧氟沙星,洛美沙星,Primaxim,环丝氨酸,卡那霉素,双氯西林,地美环素,米诺环素,多西环素,土霉素,妥布霉素,庆大霉素,新霉素,阿米卡星,Craramycin,Nebcin,红霉素/磺胺异噁唑,奈替米星,链霉素,头孢噻肟,头孢呋辛,头孢唑林,头孢布烯,头孢唑肟,头孢克洛,头孢哌酮,头孢丙烯,头孢羟氨苄一水合物,头孢他啶,头孢氨苄,头孢孟多酯钠,头孢吡肟,头孢尼西,磺胺嘧啶,诺氟沙星,依诺沙星,头孢地尼,Seromycin,头孢曲松,头孢克肟,克拉霉素,地红霉素,乌洛托品,乙硫异烟胺,曲伐沙星,司氟沙星,干扰素- α ,膦甲酸,拉米夫定,泛昔洛韦,金刚乙胺,扎西他滨,干扰素- β ,茚地那韦,更昔洛韦,沙奎那韦,利托那韦,利巴韦林,红霉素,醋竹桃霉素,阿奇霉素,粘菌素,两性霉素B,氟胞嘧啶,氟康唑,灰黄霉素,格帕沙星,特比萘芬,酮康唑,克霉唑,地拉韦定,齐多夫定,金刚烷胺,帕利珠单抗,伐昔洛韦,去羟肌苷,奈非那韦,奈韦拉平,西多福韦,乙胺嘧啶,阿托伐醌,司他夫定,拉美夫定,阿昔洛韦,Miconazole,伊曲康唑,氯喹,甲氟喹,羟氯喹,卷曲霉素,扑灭司林,克罗米通,氟-尿嘧啶,利福布汀,氨基水杨酸,利福喷汀,Coenzoyl过氧化物,葡萄糖酸氯己定,钠奥昔氯生,苯甲酰基过氧化物,利福平,利福平/异烟肼,利福平/异烟肼/吡嗪酰胺,萘啶酸,阿托品,土霉素/磺胺甲二唑/非那吡啶,新霉素/多粘菌素,甲氧苄啶/Polythyxin,妥布霉素/地塞米松,阿糖腺苷,磺胺醋酰胺,Povidoneiodine,制霉菌素,杆菌肽,硫康唑,四氯水杨酰苯胺,Metromdazole,环吡司胺,克霉唑/倍他米松,布替萘芬,萘替芬,奥昔康唑,硒,益康唑,喷昔洛韦或其药学上可接受的盐。

33. 权利要求32的用途,其中所述灰黄霉素是超微尺寸灰黄霉素。

用于调节微生物定殖的经取代的二苯乙炔

[0001] 【相关应用】

[0002] 本申请要求于2017年7月27日根据35USC§111 (b) 提交的美国临时申请No.62/537,661以及于2018年5月25日根据35USC§111 (b) 提交的美国临时申请No.62/676,676的优先权。出于所有目的,所有上述申请的全部公开内容通过引用明确纳入本文。

【发明领域】

[0003] 本发明总体上涉及微生物学领域,并且更具体地,涉及通过使物理或生物表面与化合物或化合物的制剂接触来减少微生物生长或消除微生物菌落特别是病原体的化合物,制剂和方法。

[0004] 【发明背景】

[0005] 将微生物指定为有害微生物是基于其致病潜力和引起感染或疾病的能力。在革兰氏阴性和革兰氏阳性家族中均发现病原细菌。一些相关的微生物病原体包括:革兰氏阳性细菌(诸如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*),肠球菌属(*Enterococcus* ssp.)物种,破伤风梭菌(*Clostridium tetani*),单核细胞增多性利斯特菌(*Listeria monocytogene*)和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringen*)),革兰氏阴性细菌(诸如假单胞菌属(*Pseudomonas* ssp.)物种,克雷伯菌属(*Klebsiella* ssp.)物种,沙门氏菌属(*Salmonella* ssp.)物种和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)),和真菌(诸如白色假丝酵母(*Candida albicans*),副假丝酵母(*Candida parapsilosis*),糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*),毛癣菌属(*Trichophyton* ssp.)物种,木霉属(*Trichoderma*),和曲霉属(*Aspergillus* ssp.)物种)。典型的皮肤病原体包括细菌,例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),各种假单胞菌属(*Pseudomonas* ssp.)物种,和真菌诸如白色假丝酵母(*Candida albicans*)。

[0006] 公认的知识是,将水用作医学,家庭或工业用途的清洁剂可以为微生物的粘附,增殖和定植提供适当的维持。如果不使用足够的清洁剂,防腐剂或现有的抗微生物剂,则产品或制备该产品的物理表面可能会感染多种微生物。这最终会在变色,有气味的产品中出现,或者包含导致产品变质的霉菌或其他微生物,从而使消费者无法接受。此外,在病原微生物的情况下,不可见的微生物污染不仅存在着食源性疾病的极大危险,而且还危害着消费者的健康。此外,医院设备,外科手术器械的准备,灭菌和清洁以及与血液和其他生物流体相互作用的管道和材料的无菌性维护提出了重大挑战。最后,许多微生物已经对当前的抗生素产生抗药性,尽管使用了现有的清洁技术,但仍使它们扩散。在临床环境中迫切需要针对这些抗性微生物的新疗法。

[0007] 由于组织破坏特性,许多消毒剂在使用过程中对人类构成危险。例如,含有苯酚,氯和其他强效剂的消毒剂可能会在产品使用过程中造成损害消费者皮肤和粘膜组织的风险。对人类的潜在毒性可能会限制消费者可使用的消毒剂类型和/或消毒剂可用于的应用。

[0008] 美国专利6,599,945和7,094,809公开了几种羟基二苯乙炔化合物及其在抑制传染性疱疹病毒颗粒形成或治疗由淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)引起的淋病中的

用途。美国专利6,599,945和7,094,809中概述的化合物显示对淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的活性,但是对脑膜炎奈瑟球菌 (*N.meningitidis*),大肠埃希氏菌 (*E.coli*),金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*),酿脓链球菌 (*S.pyogenes*),铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*),和白色假丝酵母 (*C.albicans*) 没有活性。当将本申请中概述的化学物质应用于大肠埃希氏菌 (*E.coli*) 和沙门氏菌属 (*Salmonella*) 时,它们以比美国专利7,094,809中所述的剂量低得多的剂量显示出抗微生物活性。W02009/126700公开了类似化合物在皮肤护理中的用途,例如UV辐射和化妆品用途。以及US 8,716,355 (W02011/0130468) 和US 8,680,142 (W02011/0160301) 公开了用作抗肿瘤剂的羟基二苯乙炔。申请人BioMendics的W02016/164531 A2公开了某些二苯乙炔和二苯乙炔化合物,用作自噬调节剂和伤口护理应用。然而,直到制备本发明之前,尚不清楚这些或其他二苯乙炔作为抗微生物化合物的潜在用途。

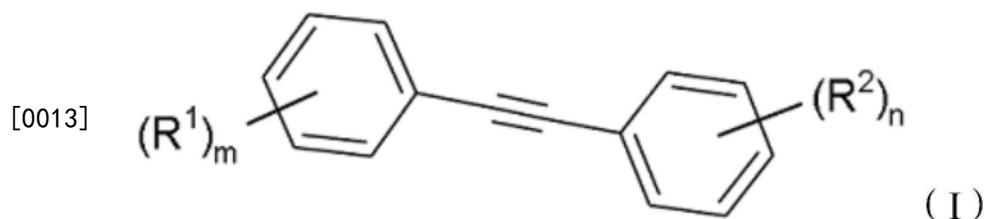
[0009] 仍然需要可用于处理物理表面和/或生物表面的改进的抗微生物剂。

【发明概要】

[0010] 本发明总体上涉及微生物生长的抑制或调节,特别是在诸如皮肤,粘膜,伤口等的生物表面上,或诸如桌子,柜台,医疗器械等物理表面上的微生物生长。

[0011] 在第一方面,本发明包括用于抑制可疑病原微生物在物理或生物表面上生长或杀灭在物理或生物表面上的可疑病原微生物的方法,该方法包括使所述物理或生物表面与抗微生物制剂接触,所述抗微生物制剂包括:

[0012] 抗微生物有效量的具有结构(I)的经取代的二苯乙炔化合物及其盐:



[0014] 其中R¹和R²是在苯环的任何可用位置上的独立取代基,m和n独立地是1、2或3,分别代表苯环上的取代基数;且

[0015] 其中每个R¹、R²独立地选自:羟基;巯基;- (C₁~C₆) 烷氧基;- (C₁~C₆) RH,其中R为O或S;和(卤代)_p (C₁~C₆) 烷基-,其中p是1、2或3;

[0016] 前提是所述经取代的二苯乙炔化合物不是3,4',5'-三羟基二苯乙炔。

[0017] 例如,在一些实施方式中,二苯乙炔化合物是烷氧基二苯乙炔,其中R¹和R²取代基中的至少1个是-(C₁~C₆) 烷氧基,例如甲氧基或乙氧基。在其他实施方式中,二苯乙炔化合物是羟基二苯乙炔,并且R¹和R²取代基中的至少1个是羟基。在其他实施方式中,二苯乙炔化合物是硫代二苯乙炔,R¹和R²取代基中的至少1个是巯基。在某些情况下,二苯乙炔化合物是以上任何的组合。

[0018] 经取代的二苯乙炔化合物包括至少1个R¹和1个R²,尽管它们可以相同或不同。例如,二苯乙炔化合物可以是二取代的,三取代的,四取代的或被5或6个取代基取代的,其中任何1个可以相同或不同。下表A中提供了一些示例性的经取代的二苯乙炔化合物,包括4,4'-二羟基二苯乙炔,4,4'-二羟基-3-甲氧基二苯乙炔;4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔,3,5,3',5'-四羟基二苯乙炔,2,4,4'-三甲氧基二苯乙炔,3,5,3',5'-四甲氧基二苯乙炔和4-羟

基-4'-三氟甲基二苯乙炔。

[0019] 基于抗微生物制剂的总重量,经取代的二苯乙炔化合物可以按重量计约0.01%至约30%的量存在。例如,二苯乙炔化合物可以按重量计约0.0001%至约25%,或约0.1%至约20%,或约0.001%至约20%的量存在。所述制剂可以具有约4.1至约8.5的pH,并且可以进一步包含清洁剂,优选基本上不含苯酚的清洁剂。在一些实施方式中,第二抗微生物剂选自:双氯酚,六氯酚,醛,醇,抗微生物羧酸及其衍生物,有机金属化合物,碘化合物,季铵化合物,铈和磷化合物,巯基化合物及其碱金属、碱土金属和重金属盐,脲,三溴水杨酰苯胺,2-溴-2-硝基-1,3-二羟基丙烷,二氯苯并噻唑酮,氯己定,异噻唑酮,苯并异噻唑酮衍生物以及这些化合物中任意两种或多种的组合。

[0020] 通过调节微生物在其上的生长,上述方法和制剂可用于清洁或消毒表面。在某些情况下,该表面是物理表面,该物理表面选自:诸如手术设备,手术器械,工作台面,管道,注射器等必须在整个过程中保持无菌的东西。在其他实施方式中,该表面是选自食物制备表面的物理表面,该食物制备表面选自:砧板,台面,桌面,刀具,其他器具,炊具等,其可能导致未被消毒的不希望的细菌被摄入。在其他实施方式中,该表面是皮肤未完全完整的部位的生物表面,例如静脉内管线或端口,动脉管线或端口,PICC管线,导管,排液管和切口部位。这样的生物表面可以包括例如皮肤,头皮,头发,眼睛,粘膜以及内部或外部孔口。

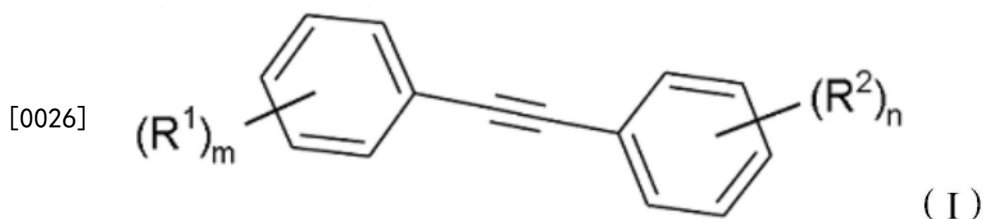
[0021] 在另一个实施方式中,该方法和制剂可用于原位破坏细菌生物膜。

[0022] 在该方法的某些方面,可疑的病原微生物是革兰氏阴性细菌,例如奈瑟球菌属(*Neisseria*),衣原体属(*Chlamydia*),不动杆菌属(*Acinetobacter*),嗜血杆菌属(*Haemophilus*),螺杆菌属(*Helicobacter*),变形杆菌属(*Proteus*),博德特菌属(*Bordetella*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),沙门氏菌属(*Salmonella*),肠杆菌属(*Enterobacter*),埃希氏菌属(*Escherichia*),克雷伯菌属(*Klebsiella*),弧菌属(*Vibrio*),或耶尔森菌属(*Yersinia*)。在其他方面,可疑的病原微生物是革兰氏阳性细菌,例如葡萄球菌属(*Staphylococcus*),链球菌属(*Streptococcus*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),梭菌属(*Clostridium*),利斯特菌属(*Listeria*),或棒杆菌属(*Corynebacterium*)。在特定的实施方式中,可疑的病原微生物是由于对已知的“最后手段”抗生素(例如甲氧西林,万古霉素或碳青霉烯)的普遍性或实际或即将发生的耐药性而被认为是重要的病原体。这些重要病原体包括:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) (耐碳青霉烯的);铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (耐碳青霉烯的);肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*) (耐碳青霉烯的,生产ESBL);屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) (耐万古霉素的);金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (耐甲氧西林的,中等和耐万古霉素的);幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*) (耐克拉霉素的);弯曲杆菌属(*Campylobacter* ssp.) 物种(耐氟喹诺酮的);沙门氏菌属(*Salmonella*) (耐氟喹诺酮的);淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*) (耐头孢菌素的,耐氟喹诺酮的);和大肠埃希氏菌(*E.coli*) 物种的菌株。

[0023] 在其他方面,可疑病原微生物是真菌,例如假丝酵母属(*Candida*),曲霉属(*Aspergillus*),枝孢属(*Cladosporium*),表皮癣菌属(*Epidermophyton*),微孢子菌属(*Microsporum*),毛癣菌属(*Trichophyton*),和青霉属(*Penicillium*)的那些。

[0024] 在另一方面,本发明包括用于抑制或破坏一种或多种微生物的生物膜形成的方法,该方法包括使微生物与抗微生物制剂接触,所述抗微生物制剂包括:

[0025] 有效量的具有结构 (I) 的经取代的二苯乙炔化合物及其盐:



[0027] 其中 R^1 和 R^2 是在苯环的任何可用位置上的独立取代基, m 和 n 独立地是1、2或3,分别代表苯环上的取代基数;且

[0028] 其中每个 R^1 、 R^2 独立地选自:羟基;巯基; $-(C_1 \sim C_6)$ 烷氧基; $-(C_1 \sim C_6) RH$,其中 R 为 O 或 S ;和(卤代) $_p(C_1 \sim C_6)$ 烷基-,其中 p 是1、2或3;

[0029] 前提是所述经取代的二苯乙炔化合物不是3,4',5-三羟基二苯乙炔。

[0030] 在某些实施方式中,经取代的二苯乙炔化合物以约0.008mM至约1mM的浓度存在于抗微生物制剂中。在某些实施方式中,经取代的二苯乙炔化合物以约0.625mM存在于抗微生物剂制剂中。

[0031] 在某些实施方式中,基于抗微生物制剂的总重量,经取代的二苯乙炔化合物以约0.0001重量%至约30重量%的量存在于抗微生物制剂中。在某些实施方式中,基于抗微生物制剂的总重量,经取代的二苯乙炔化合物在抗微生物制剂中的存在量为约0.01重量%至约25重量%。在某些实施方式中,基于抗微生物制剂的总重量,所述经取代的二苯乙炔化合物以约0.1重量%至约30重量%的量存在于抗微生物制剂中。

[0032] 在某些实施方式中,抗微生物制剂从每天给药1次至每天给药约6次。在某些实施方式中,抗微生物制剂通过选自下列的给药途径给药:局部,透皮,口服,经鼻,经眼,经耳,静脉内,肌内,皮下,直肠和阴道。

[0033] 在某些实施方式中,经取代的二苯乙炔化合物包含4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔。在某些实施方式中,一种或多种微生物包括革兰氏阳性细菌。在某些实施方式中,一种或多种微生物包括革兰氏阴性细菌。在某些实施方式中,一种或多种微生物包括真菌。在某些实施方式中,一种或多种微生物包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (MRSA)。

[0034] 下面描述其他实施例和方面。

[0035] **【附图简述】**

[0036] 结合于此并形成说明书一部分的附图以其几个方面示出了本发明,并且与说明书一起用于解释本发明的原理。在该图中,为了清楚起见,线,层和区域的厚度可能被放大。

[0037] 图1描绘了经取代的二苯乙炔BM3103的抗微生物作用的条形图。

[0038] 图2描绘了经取代的二苯乙炔BM3103的抗微生物作用的条形图。

[0039] 图3描绘了经取代的二苯乙炔BM3213的抗微生物作用的条形图。

[0040] 图4描绘了经取代的二苯乙炔BM3303的抗微生物作用的条形图。

[0041] 图5描述了实施例10-12中使用的方法。

[0042] 图6A-6B描绘了BM3103制剂对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (MRSA USA 300)的抗微生物剂效应的条形图(图6A)和表(图6B)。

[0043] 图7描绘了BM3103制剂对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的抗微生物剂

效应的条形图。

[0044] 图8描绘了BM3103制剂对白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 的抗微生物剂效应的条形图。

[0045] 图9是显示在醇凝胶制剂中对BM3103进行24小时平板测定后的MRSA USA 400的细菌计数的图。

[0046] 图10是显示在Transcutol制剂中对BM3103进行24小时平板测定后的MRSA USA 400的细菌计数的图。

[0047] 图11是Transcutol制剂中BM3103的24小时平板测定后鲍曼不动杆菌 (*A.baumannii*) 的细菌计数图。

[0048] 图12A至图12D是示出MRSA USA 400的生物膜抑制测定的结果的图。

[0049] 图13是一系列图像,其显示MRSA USA 400的BM3103处理诱导细胞死亡,如阳性PI染色所示。

[0050] 图14A-14D是显示用BM3103处理已建立的MRSA USA 400生物膜24小时的图像。

[0051] 图15是一系列图像,其显示MRSA USA 400的BM3101处理诱导了现有生物膜中的细胞死亡,如阳性PI染色所示。

[0052] 【发明详述】

[0053] 用于表征本发明的数值范围,测量值和参数-例如,角度,成分数量,聚合物分子量,反应条件 (pH, 温度, 电荷水平等), 物理尺寸等-必须近似; 并且, 尽管报告得尽可能准确, 但它们固有地包含从各自测量得出的不精确性。因此, 在说明书和权利要求书中使用的所有表示幅度范围的数字在所有情况下均应理解为被术语“约”修饰。所有数值范围应理解为包括该范围的外边界内的所有可能的增量子范围。因此, 在30至90U的范围内公开了例如35至50U, 45至85U和40至80U等。除非另外定义, 百分率是wt/vol%。

[0054] 本文引用的所有专利, 公开的专利申请和非专利文献参考文献通过引用整体并入本文。

[0055] 在一些方面, 本发明包括调节细菌感染的方法, 该方法包括施用单种二苯乙炔, 共施用多于一种二苯乙炔或连续施用一种二苯乙炔及随后的第二种二苯乙炔。二苯乙炔化合物在以下部分中更详细地描述。它们可以顺序或同时给予。取决于制剂赋形剂, 化合物可以从每天给药1次至每天给药约6次。给药途径包括局部, 透皮, 口服, 经鼻, 经眼, 经耳, IV, IM, 皮下, 直肠和阴道。

[0056] 药物赋形剂在制备药物产品中的使用通常熟知于药品条约诸如Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, 1990年) 及其后续版本, 如Remingtons: The Science and Practice of Pharmacy, 第22版 (2012)。局部用制剂可与溶剂, 乳化剂, 润肤剂, 溶剂等混合制成溶液, 悬浮液, 乳膏, 软膏和水凝胶等 (Handbook of Formulating Dermal Application, Nava Dayan, 2016; Topical Drug Delivery Formulations, David Osborne & Anton Amann, 1989)。

[0057] 在某些实施方式中, 本发明涉及一种制剂, 该制剂包含按重量百分比计的活性成分 (二苯乙炔化合物) 可以占制剂的约0.01%至约30%。在某些实施方式中, 活性成分 (二苯乙炔) 可占制剂的约0.1%至约25%。最佳地, 活性成分的量在0.1-20%之间。

[0058] 【化学和生物学定义】

[0059] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管与本文描述的那些方法或材料相似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试中,但是本文描述了优选的方法和材料。本文引用的所有参考文献,包括书籍,期刊文章,已公开的美国或外国专利申请,已发布的美国或外国专利以及任何其他参考文献,均通过引用整体并入本文,包括在引用的参考文献中介绍的所有数据,表格,图形和文本。

[0060] 贯穿本申请使用的以下术语具有以下赋予的含义。

[0061] 如本文所用,术语“(C₁~C₆)烷基”是指具有1至6个碳原子的直链和支链非环状饱和烃。代表性的直链-(C₁~C₆)烷基包括甲基,-乙基,-正丙基,-正丁基,-正戊基和-正己基。代表性支链-(C₁~C₆)烷基包括异丙基,仲丁基,异丁基,叔丁基,异戊基,新戊基,1-甲基丁基,2-甲基丁基,3-甲基丁基,1,1-二甲基丙基和1,2-二甲基丙基,甲基戊基,2-甲基戊基,3-甲基戊基,4-甲基戊基,1-乙基丁基,2-乙基丁基,3-乙基丁基,1,1-二甲基丁基,1,2-二甲基丁基,1,3-二甲基丁基,2,2-二甲基丁基,2,3-二甲基丁基,3,3-二甲基丁基等。更一般地,下标是指链中碳原子的数目。因此,术语“(C₁~C₃)烷基”是指具有1-3个碳原子的直链和支链非环状饱和烃。

[0062] 如本文所用,“(C₁~C₆)烷氧基”是指具有1个或多个醚基和1-6个碳原子的直链或支链非环状烃。代表性的直链和支链(C₁~C₆)烷氧基包括:-甲氧基,-乙氧基,-丙氧基,-丁氧基,-戊氧基,-己氧基,-甲氧基甲基,-2-甲氧基乙基,-5-甲氧基戊基,-3-乙氧基丁基等。除了仅具有1至3个碳之外,“(C₁~C₃)烷氧基”类似地定义。

[0063] 如本文所用,“(C₁~C₆)RH”,其中R为O或S是指具有1个或多个羟基或巯基且为1至6个碳原子的直链或支链非环状醇或硫醇。代表性的直链和支链-(C₁~C₆)RH包括:-甲醇,甲硫醇,乙醇,乙硫醇,正丙醇,异链烷醇,正丙硫醇等。除了仅具有1至3个碳之外,“(C₁~C₃)RH”类似地定义。

[0064] 如本文所用,术语“卤代”和“卤素”是指氟,氯,溴或碘。

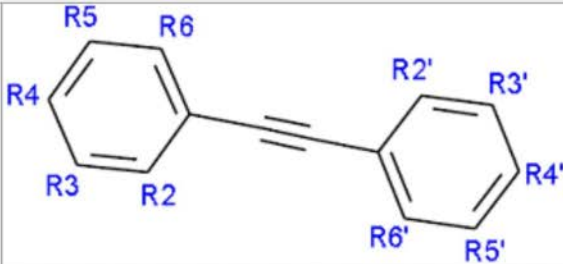
[0065] 如本文所用,“卤代烷基”或“(卤代)_p(C₁~C₆)烷基-”是指在p个位置被卤素取代的(C₁~C₆)烷基链,其中p为1、2或3。卤素取代基可以在(C₁~C₆)烷基的相同或不同碳上被取代。代表性的“(卤代)_p(C₁~C₆)烷基-”基团包括例如-CF₃,-CH₂CHF₂,-CH₂CH₂CH₂Cl,-CHBr₂,-CHBrCl,-CHCl₂,-CH₂CHI₂,-CH₂CH₂CHClCH₂Br等。

[0066] 在一些实施方式中,在结构中存在2个苯环,并且包含取代基R¹和R²。在某些实施方式中,在苯环上有1-3个R¹取代基,和1-3个R²取代基。在一些实施方式中,苯环上的R¹和/或R²的位置主要在对位和间位,即1个苯环上的3、4或5位以及在另一个苯环上的3'、4'和5'位,尽管也可以在邻位(2、2',6和6')具有取代基。第一苯环上可能有1个,2个或3个R¹取代基,相应地,第二苯环上可能有1个至3个R²取代基。这些范围内的所有排列都是可能的,例如:1个R¹和1个R²;2个R¹和2个R²;3个R¹和3个R²;1个R¹和2个R²;1个R¹和3个R²;2个R¹和1个R²;2个R¹和2个R²;2个R¹和3个R²;3个R¹和1个R²;或3个R¹和2个R²。每个R¹⁻²独立地选择,并且当存在2个或更多个时,它们可以相同或不同。换句话说,R¹每次出现都可以与另一个R¹或R²相同或不同;R²每次出现可以与另一个R²或R¹相同或不同。

[0067] 根据本公开,表A中给出了一些特定的经取代的二苯乙炔抗微生物化合物的非限制性实例。

[0068] 【表A:代表性的经取代的二苯乙炔抗微生物化合物】

[0069] R^1 和 R^2 取代基的性质和位置

二苯乙炔核心	
羟基	3,5-二羟基二苯乙炔; 3,4-二羟基二苯乙炔; 3,4,5-三羟基二苯乙炔; 3,3',4,5'-四羟基二苯乙炔; 3,3',4,4'-四羟基二苯乙炔; 3,4,4'-三羟基二苯乙炔; 3,3',4'-三羟基二苯乙炔; 2,4,4'-三羟基二苯乙炔; 2,4,2',4'-四羟基二苯乙炔;
巯基	3,5-二羟基-4'-巯基二苯乙炔; 3,4-二羟基-4'-巯基二苯乙炔; 4,5-二羟基-4'-巯基二苯乙炔; 3,4,5-三羟基-4'-巯基二苯乙炔; 3,4'-二巯基-二苯乙炔; 4,4'-二巯基-二苯乙炔;
糖苷和混合的	3,5'-二羟基-4'-甲氧基二苯乙炔-5-O-β-D-葡萄糖苷; 3',4'-二羟基-3-甲氧基二苯乙炔-5-O-β-D-葡萄糖苷; 3,4'-二羟基二苯乙炔-5-O-β-D-葡萄糖苷; 2,3-二羟基-4'-甲氧基二苯乙炔-5-O-β-D-葡萄糖苷; 2,3,3'-三羟基-4'-甲氧基二苯乙炔-5-O-β-D-葡萄糖苷;
卤代烷基	4-羟基-4'-(三氟)甲基二苯乙炔 (BM3213);
烷氧基和混合	3,5,4'-三甲氧基二苯乙炔; 3,4,4'-三甲氧基二苯乙炔 (BM3303); 4,5,4'-三甲氧基二苯乙炔; 3,4,5,4'-四甲氧基二苯乙炔; 4'-羟基-3,5-二甲氧基二苯乙炔; 4'-羟基-3,4-二甲氧基二苯乙炔; 4'-(O-烷氧基)-4,5-二甲氧基二苯乙炔; 4'-羟基-3,4,5-三甲氧基二苯乙炔; 3,5-二羟基-4'-甲氧基二苯乙炔; 4,4'-二甲氧基二苯乙炔; 3,5,3'-三羟基-4'-甲氧基二苯乙炔; 4,4'-二羟基-3-甲氧基二苯乙炔; 3,4-二羟基-4'-甲氧基二苯乙炔; 3,4-二甲氧基二苯乙炔; 3,4'-二甲氧基二苯乙炔; 4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔 (BM3103);
醇和硫醇及其混合物	3,5-二羟基-4'-甲醇二苯乙炔; 3,4-二羟基-4'-乙醇二苯乙炔; 4,5-二甲醇-4'-巯基二苯乙炔; 3,5-二乙醇-4'-甲醇二苯乙炔; 3,5-二甲基巯基-4'-羟基二苯乙炔; 3,4-二羟基-4'-乙巯基二苯乙炔; 4,5-二羟基-4'-丙巯基二苯乙炔; 3,5-二甲基巯基-4'-甲氧基二苯乙炔; 3,4'-二甲基巯基-二苯乙炔; 4, 4'-二甲基巯基-二苯乙炔

[0071] 可以观察到,上述二苯乙炔化合物通常是极性的,并且具有某些电负性取代基(例如, -OH, -OCH₃, -卤代等)。尽管这不是必需的,但可能希望为分子提供类似于液晶的行为,使其在溶液状态下呈液溶或部分有序的结构。不希望受到理论的束缚,据信这可以促进它们穿透和破坏具有液晶性质的细菌生物膜的能力。这些化合物单独或组合起作用,可防止

细菌或其他微生物可能粘附并定殖的植物,动物,人或物理表面的微生物定殖。本发明进一步描述了将这些化合物配制成喷雾剂,涂料,胶束,脂质体,凝胶,肥皂,泡沫或乳膏以预防或治疗细菌感染的用途。

[0072] 二苯乙炔化合物在本文中也称为经取代的二苯乙炔化合物,还包括上述化合物的盐。二苯乙炔化合物,特别是那些单羟基或多羟基化合物,根据pH容易释放1个或多个质子以形成阴离子。这样的阴离子可以与阳离子如一价,二价和三价阳离子结合以形成盐。对于一价阳离子(M^+),单二苯乙炔连接形成 M^+ 二苯乙炔⁻盐。类似地,对于二价阳离子(M^{2+}),2个二苯乙炔分子连接形成 M^{2+} (二苯乙炔⁻)₂盐;对于三价阳离子(M^{3+}),3个二苯乙炔分子连接形成 M^{3+} (二苯乙炔⁻)₃盐。这些盐通常容易溶于水介质,这可能有助于配制。用于二苯乙炔盐形成的说明性但非限制性阳离子包括: Na^+ 或 K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 。O-糖苷可以类似的方式形成。

[0073] 【抗微生物剂二苯乙炔作为消毒剂的用途或对表面进行消毒】

[0074] 已显示代表性的经取代的二苯乙炔,4-羟基-4'-甲氧基二苯乙炔(BM3103)可用于控制微生物生长。发现BM3103对野生型大肠埃希氏菌(*E. coli*)有效,以前的数据显示3,5,4'-三羟基二苯乙炔是无效的。BM3103还显示出破坏细菌菌苔或生物膜的形成。另外,已显示BM3103对一系列微生物具有显著的抗微生物活性。此外,BM3103及其相关的经取代的二苯乙炔具有较低的局部毒性,并且在人和动物皮肤中具有广泛的安全性。这使它们可用于具有广泛安全性的产品制剂中。而且,它们可以与其他组分一起配制以提供具有抗微生物特性的最终产品。

[0075] 具有抗微生物活性的经取代的二苯乙炔可以配制并用作消毒剂,并用于物理或生物表面。如本文所用,“微生物”是广义术语,其涵盖所有分类的病原体,尤其包括细菌和真菌(包括其丝状和酵母形式)。细菌包括革兰氏阴性和革兰氏阳性染色类型,以及杆和杆菌形态。重要的细菌和真菌病原体以及可能发现它们的应用包括表B中确定的那些。

[0076] 【表B:选定的病原微生物】

[0077]	与各种应用有关的微生物	
	微生物	潜在的应用
	真菌	
	黑曲霉 (<i>Aspergillus Niger</i>) , 黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>) , 寄生曲霉 (<i>Aspergillus parasiticus</i>) , 米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>) , 曲霉属 (<i>Aspergillus sp.</i>) , 枝孢属 (<i>Cladosporium</i>) , 产黄青霉 (<i>Penicillium chrysogenum</i>) , <i>Margarinomyces fasciculatis</i> , 密葡柄霉 (<i>Stemphylium congestum</i>) , 绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	粘液形成
	皮肤赘生真菌: 表皮癣菌属 (<i>Epidermophyton sp.</i>) , 微孢子菌属 (<i>Microsporum sp.</i>) , 毛癣菌属 (<i>Trichophyton sp.</i>)	化妆品, 个人护理产品, 皮肤护理产品
	酸败真菌: 曲霉属 (<i>Aspergillus sp.</i>) , 假丝酵母属 (<i>Candida sp.</i>) , 青霉属 (<i>Penicillium sp.</i>) , 脂环酸杆菌属 (<i>Alicyclobacillus sp.</i>)	化妆品
	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>) , 其他假丝酵母属 (<i>Candida sp.</i>) , <i>Pullulaeria pullelelus</i> , 红酵母属 (<i>Rhodotorula sp.</i>) , 和糖酵母属 (<i>Saccharomyces sp.</i>) , 卵状糠疹癣菌 (<i>Pityrosporum ovale</i>)	消费产品, 个人护理产品
	细菌	
	直立枝顶孢 (<i>Acremonium strictum</i>) , 芽孢杆菌属 (<i>Bacillus sp.</i>) , 弗式柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>) , 大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>) , 茄病镰孢 (<i>Fusarium solani</i>) , 白地霉 (<i>Geotrichum candidum</i>) , 青霉属 (<i>Penicillium sp.</i>) , 奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>) , 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas sp.</i>) , 施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	消费产品
	革兰氏阳性细菌: 棒杆菌属 (<i>Corynebacterium</i>) , 葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>) , 链球菌属 (<i>Streptococcus</i>) , 芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	个人护理产品, 皮肤护理产品
	革兰氏阴性细菌: 大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>) , 产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogene</i>) , 黄杆菌属 (<i>Flavobacteria</i>) , 克雷伯菌属 (<i>Klebsiella</i>) , 变形杆菌属 (<i>Proteus</i>) , 假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) , 沙门氏菌属 (<i>Salmonella</i>) , 粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescen</i>)	个人护理产品, 皮肤护理产品

[0078] 如本文所用,“抗微生物剂”是广义术语,其包括杀灭微生物(例如,杀细菌或杀真菌的)和抑制微生物的生长(例如,抑细菌或抑真菌的)。通常,在生物系统中,抑微生物剂足以阻止人体通过自然手段使其自身脱离传染性生物体而生长。如本文所用,术语“消毒”是指消除环境(例如,表面)中的许多或所有不希望的(例如,致病的)微生物。如本文所用,术语“灭菌”是指根据公共卫生法令将无生命环境中的污染物减少到安全水平,或将细菌数量减少很多。

[0079] 鉴于BM3103和相关的经取代的二苯乙炔抗微生物剂的特性,该化合物可用作活性成分或助剂,可与溶剂混合以达到所需的浓度,从而为最终产品提供所需的抗微生物,消毒或清洁活性。同样地,这些化合物可以与消费产品中通常存在的组分,例如去污剂,肥皂,表面活性剂,润肤剂等结合。

[0080] 在某些方面,可以将描述为二苯乙炔的抗微生物剂组合成一种或多种抗微生物剂的组合物。然后可以将该组合物与其他成分组合以产生广谱抗微生物剂,消毒剂或清洁剂。此外,在某些方面,在多种制剂的组合处理中,被描述为二苯乙炔的抗微生物剂可以与相同制剂中的一种或多种抗生素组合。适合的抗生素可包括氨基糖苷,安沙霉素,碳头孢烯,

FLAGYL(甲硝唑),硫酸新霉素,碳青霉烯,头孢菌素,糖肽,大环内酯,单酰胺菌素,青霉素,多肽,多粘菌素,喹诺酮,磺酰胺,和四环素。适合的抗生素的例包括,但不限于:克林霉素,替加环素,万古霉素,环丙沙星,氧氟沙星,磺胺甲噁唑,甲氧苄啶/磺胺甲噁唑,阿莫西林,青霉素V,青霉素G,普鲁卡因青霉素,苄星青霉素,羧苄西林,美洛西林,氨苄西林,哌拉西林,哌凡纳明,氯霉素,克林霉素,林可霉素,乙胺丁醇,磷霉素,夫西地酸,呋喃唑酮,异烟肼,利奈唑胺,甲硝唑,莫匹罗星,呋喃妥因,平板霉素,吡嗪酰胺,奎奴普丁/达福普汀,利福平(US中的Rifampin),甲砒霉素,Timidazole,氨苯砒,氯法齐明,巴氨西林,替卡西林,替卡西林,哌拉西林/三唑巴坦,氨曲南,头孢替坦,氯碳头孢,MEFOXIN,MERREM,左氧氟沙星,洛美沙星,Primaxim,环丝氨酸,卡那霉素,双氯西林,地美环素,米诺环素,多西环素,土霉素,妥布霉素,庆大霉素,新霉素,阿米卡星,Craramycin,Nebcin,红霉素/磺胺异噁唑,奈替米星,链霉素,妥布霉素,头孢噻肟,头孢呋辛,头孢唑林,头孢布烯,头孢噻肟,头孢克洛,头孢哌酮,头孢丙烯,头孢羟氨苄一水合物,头孢他啶,甲氧苄啶/磺胺甲噁唑,头孢氨苄,头孢唑林,头孢孟多酯钠,头孢吡肟,头孢尼西,磺胺嘧啶,诺氟沙星,依诺沙星,头孢地尼,Seromycin,头孢曲松,头孢克肟,头孢他啶,克拉霉素,地红霉素,乌洛托品,乙硫异烟胺,曲伐沙星,司氟沙星,干扰素- α ,茚地那韦,更昔洛韦,膦甲酸,拉米夫定,泛昔洛韦,金刚乙胺,扎西他滨,干扰素- β ,沙奎那韦,利托那韦,利巴韦林,红霉素,醋竹桃霉素,阿奇霉素,克林霉素,粘菌素,两性霉素B,氟胞嘧啶,氟康唑,灰黄霉素,格帕沙星,超微尺寸灰黄霉素,特比萘芬,酮康唑,克霉唑,氨苯砒,地拉韦啶,齐多夫定,金刚烷胺,帕利珠单抗,伐昔洛韦,去羟肌苷,奈非那韦,奈韦拉平,利巴韦林,西多福韦,乙胺嘧啶,甲硝唑,呋喃唑酮,阿托伐醌,司他夫定,拉美夫定,阿昔洛韦,Miconazole,伊曲康唑,氯喹,乙胺嘧啶,甲氟喹,羟氯喹,卷曲霉素,扑灭司林,克罗米通,林丹,氟-尿嘧啶,乙胺丁醇,利福布汀,异烟肼,氨基水杨酸,利福喷汀,吡嗪酰胺,Coenzoyl过氧化物,葡萄糖酸氯己定,钠奥昔氯生,苯甲酰基过氧化物,利福平,利福平/异烟肼,利福平/异烟肼/吡嗪酰胺,呋喃妥因,利奈唑胺,呋喃妥因,磷霉素,萘啶酸,阿托品,土霉素/磺胺甲二唑/非那吡啶,氯霉素,新霉素/多粘菌素,甲氧苄啶/Polythyxin,妥布霉素/地塞米松,阿糖腺苷,环丙沙星,氧氟沙星,磺胺醋酰胺,Povidoneiodine,庆大霉素,制霉菌素,氯霉素,杆菌肽,硫康唑,特比萘芬,四氯水杨酰苯胺,甲硝唑,Metromidazole,环吡司胺,克霉唑,克霉唑/倍他米松,布替萘芬,克霉唑,萘替芬,奥昔康唑,硒,益康唑,喷昔洛韦,或其药学可接受的盐。联合处理可包括同时施用二苯乙炔化合物和抗生素,或可包括连续施用二苯乙炔化合物和抗生素。

[0081] 此外,本发明提供一种处理表面的方法,其中所述表面处理组合物是基本上不含苯酚的抗微生物剂,消毒剂或清洁剂,其中所述抗微生物剂以足以控制微生物生长的量存在。

[0082] 在一些方面,本文描述的抗微生物剂的广谱活性可以起到降低生物膜形成的可能性和/或在各种形成状态下破坏生物膜的作用。微生物在生物和非生物表面形成生物膜,从而为微生物提供强大的生态优势。通常,生物膜的形成成为微生物提供了另一种受保护的存在。在完全形成的生物膜中,细菌受到自我产生的细胞外基质的保护,该基质占生物质的90%。一旦形成,生物膜将提供水合的高抗张强度的遮蔽物,从而可以交换遗传物质。生物膜还提供了针对抗生素,消毒剂或消毒剂的干燥,捕食,氧化,辐射和渗透的保护。关于生物膜的综述,Kostakioti M.,et al.(2013) Bacterial biofilms:development,dispersal,

and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. Apr 1;3(4):a010306., 其全文并入本文。细菌如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 产生的细胞外基质通过聚合物与丝状 Pf 噬菌体之间的熵相互作用自组装成液晶基质, 而长丝的 Pf 噬菌体是带负电荷的长丝。这种液晶结构通过增加粘附性和对干燥剂和抗生素的耐受性来增强生物膜功能 (Secor, P.R. et al. (2015). Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. Cell Host Microbe. November 11;18(5):549-559.)。

[0083] 可以使用 Docherty & Tsai 的美国专利 6,599,945 B2 中描述的一般程序合成二苯乙炔, 出于所有目的通过引用将其并入本文。合成二苯乙炔化合物的其他方法是可能的, 并且完全涵盖在本公开内。

【实施例】

[0084] 【实施例 1 ~ 5: 剂量范围发现菌落形成测定】

[0085] 用 5 个细菌菌株鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) TA97a、TA98、TA100、TA1535 和大肠埃希氏菌 (*E. coli*) WP2 uvrA pKM101 进行了一系列剂量范围发现测定, 每剂量 3 个板有和无代谢活化。测试了以下剂量, 以及阳性和阴性对照: 5000、2500、1250、500、250、125、50、20、10、5、2、1 和 0.2 μg /板。评价板的毒性 (随着剂量的增加和/或背景菌苔的明显变薄而平板计数减少) 和测试物品的沉淀。通过添加苯巴比妥/苯并黄酮诱导的大鼠肝 S9 组分和辅因子 (S9 混合物), 在一些样品中包括了代谢活化。在使用前, 将新鲜解冻的大鼠肝脏 S9 等分试样与无菌辅因子混合物混合。S9 混合物的肝脏 S9 浓度为 10%, 冷藏或保存在冰上直至使用。在进行代谢活化测试时, 将 S9 混合物代替磷酸盐缓冲液用于测定管中。

[0086] 制备剂量制剂, 以 0.1 mL 的恒定体积递送所有剂量。从称量到最接近的 0.1 mg 的测试物品制备最高剂量, 并从高剂量储备制剂制备系列稀释的剩余制剂。使用永久性记号笔或计算机打印的标签, 在检测板上标记项目, 研究编号和日期。用唯一的标识符标记测定板和试管, 该标识符用于将测定管与正确识别的最小葡萄糖琼脂板进行匹配。

[0087] 使用预温育方法进行测定。该测定混合物由 0.1 mL 的测试制品制剂或对照制品, 0.5 mL 的 S9 混合物或磷酸盐缓冲液以及 0.1 mL 的细菌培养物组成。将测定管在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 缓慢搅拌下温育 20 ± 1 分钟, 然后将 2.0 ~ 2.5 mL 顶部琼脂添加到测定混合物中, 并将顶部琼脂/测定混合物倒入适当标记的最小葡萄糖琼脂平板上。一旦顶部琼脂变硬, 将板倒置并在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下温育 48 ± 2 小时。用来自 Perceptive Instruments (Suffolk, UK) 的 Sorcerer (2.2 版)/Ames Study Manager (1.2.4 版) 系统对板计数。使用该系统, 平板计数自动从板成像仪 (Sorcerer) 传输到 Study Manager 电子表格, 并且数据以安全的方式存储在 Oracle 数据库中。一些板是手工计数的, 例如, 如果样品沉淀物干扰自动计数或毒性导致形成微菌落, 在这种情况下, 将这些板的计数手动输入到电子表格中。还通过后缀码对平板的定植程度进行评分。数据在下表 1 ~ 5 中。整个表中使用的缩写为:

[0088]	阳性对照		板后缀码	
	NaN ₃	叠氮化钠	A	菌苔缺乏
	BAP_Moltox	苯并(a)芘_Moltox	Ē	增强的菌苔
	4NQO	4-硝基喹啉 N-氧化物	P	沉淀
	2A	2-氨基蒽	S	稀疏的菌苔
		乙醇	T	毒性
			#	(例如 0、6、56 等, 计数)

[0089] 【表1:具有代谢活化作用的菌株TA97a】

[0090]	株	化合物	剂量水平/板	菌落形成单位/平板	单个菌落计数
[0091]	TA97a	BM3103	5000μg	0.0	0 P
			2500μg	0.0	0 A P
			1250μg	0.0	0 A P
			500μg	0.0	0 A
			250μg	0.0	0 A
			125μg	0.0	0 A
			50μg	0.0	0
			20μg	0.0	0 A
			10μg	77.0	77.0
			5μg	78.0	78
			2μg	78.0	78
			1μg	122.0	122
			0.2μg	89.0	89
		乙醇		101.7	100、94、111
		2A	2.5μg	3241.3	3115、3093、3516

[0092] 【表2:具有代谢活化作用的菌株TA100】

[0093]	株	化合物	剂量水平/板	菌落形成单位/平板	单个菌落计数
	TA100	BM3103	5000μg	0.0	0A P
			2500μg	0.0	0A P
			1250μg	0.0	0A P
			500μg	0.0	0A
			250μg	0.0	0A
			125μg	0.0	0A
			50μg	0.0	0A
			20μg	54.0	54
			10μg	38.0	38S T
			5μg	74.0	74

		2μg	36.0	36T
		1μg	56.0	56
		0.2μg	78	78
	乙醇		75.7	69、84、74
	BAP_Moltox	2μg	806.0	703、721、994

[0094] 【表3:具有代谢活化作用的菌株TA98】

株	化合物	剂量水平/板	菌落形成单位/平板	单个菌落计数
TA98	BM3103	5000μg	0.0	0 A P
		2500μg	0.0	0 A P
		1250μg	0.0	0 A P
		500μg	0.0	0 A P
		250μg	0.0	0 A
		125μg	0.0	0 A
		50μg	0.0	0 A
		20μg	0.0	0 A
		10μg	16.0	16 E
		5μg	16.0	16
		2μg	18.0	18
		1μg	8.0	8
	乙醇		16.7	16,22,12
	2A	2μg	2315.0	2664、1955、2326

[0097] 【表4:无代谢活化的菌株TA1535】

株	化合物	剂量水平/板	菌落形成单位/平板	单个菌落计数
TA1535	BM3103	5000μg	0.0	0A P
		2500μg	0.0	0A P
		1250μg	0.0	0A P
		500μg	0.0	0A
		250μg	0.0	0A
		125μg	0.0	0A
		50μg	0.0	0A
		20μg	0.0	0A
		10μg	0.0	0AT
		5μg	6.0	6
		2μg	10.0	10
		1μg	11.0	11
		0.2μg	12.0	12
	乙醇		11.7	14、9、12

	硝酸钠	1μg	714.7	661、702、781	
[0099]	【表5:无代谢活化的菌株WP2 uvrA pkM101】				
[0100]	株	化合物	剂量水平/板	菌落形成单位/平板	单个菌落计数
	WP2 UVRA PKM101	BM3103	5000μg	0.0	0 A P
[0101]			2500μg	0.0	0 A P
			1250μg	0.0	0 A
			500μg	0.0	0 A P
			250μg	0.0	0 A P
			125μg	0.0	0
			50μg	14.0	14
			20μg	138.0	138
		乙醇		151.0	153、142、158
		4NQO	0.25μg	2950.3	2987、2951、2913

[0102] 【实施例6~9:细菌菌落形成测定】

[0103] 从冷冻培养物中回收到NEB5α感受态大肠埃希氏菌(E.coli),并在37℃的细菌培养箱中生长过夜。通过将过夜培养物中的25μL细菌添加到10mL新鲜的LB培养基中,将增殖的细菌培养物用于菌落形成试验(LB; Bertani, G. (2004). “Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems”. Journal of Bacteriology. 186(3): 595-600. PMC 321500. PMID 14729683. doi:10.1128/JB.186.3.595-600.2004)。如以下表C,相应附图的表中所述,将1mL这种稀释的细菌添加到经取代的二苯乙炔化合物的制剂的各种稀释液中。

[0104] 【表C:二苯乙炔化合物的制剂】

	例	二苯乙炔*化合物	公式	数据图
[0105]	6	BM3103	在水中加入 30%PEG-400 和最高 28%HPβCD(羟丙基-β-环糊精),并将化合物 BM3103 的系列稀释液混合到 70% 1 体积/体积的醇凝胶中	1
	7	BM3103	70%体积/体积醇凝胶	2
	8	BM3213	70%体积/体积醇凝胶	3
	9	BM3303	70%体积/体积醇凝胶	4

[0106] *有关化合物标识,请参阅表A

[0107] 将1mL每种制剂与1mL在LB中的稀释细菌混合,并置于琼脂平板上。使醇凝胶干燥并温育过夜16~18小时。对照板由2mL醇凝胶和1mL稀释细菌组成,导致菌落计数少于10个菌落;1mL醇凝胶和1mL稀释细菌组成,导致部分细菌菌苔(菌落太近,无法计数)适当地,仅用1mL稀释的细菌,形成完整的细菌菌苔(无可区分的菌落),将PEG-400和HPβCD适当稀释到1mL的醇凝胶中,再加上1mL稀释的细菌,形成细菌的菌苔。然后选择板区域,并使用Image J菌落计数器获得菌落计数(尺寸(像素平方)5-1000和圆形度0.5-1)。

[0108] 如图1所示,BM3103的280μM(62.5μg/mL)稀释液大大降低了大肠埃希氏菌(E.coli)菌落数,而557μM(125μg/mL)稀释液则进一步减少了定殖。图2表明,浓度为2.23mM(500μg/mL)和4.45mM(1000μg/mL)的BM3103的醇凝胶制剂均完全抑制了大肠埃希氏菌(E.coli)的生长。如图3所示,在醇凝胶中的BM3213在2.23mM的浓度下对大肠埃希氏菌

(*E.coli*) 具有非常强的抑制作用,但是在稀释10倍的浓度下对大肠埃希氏菌 (*E.coli*) 的抑制作用较小。最后,醇凝胶中的BM3303表现出剂量依赖性抑制作用。图4显示,醇凝胶中的BM3303在1.11mM的浓度下是大肠埃希氏菌 (*E.coli*) 的抑制剂,但在稀释10倍的浓度下则较少。最后,醇凝胶中的BM3303表现出剂量依赖性抑制作用。

[0109] 【实施例10~12:MRSA,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和白色假丝酵母 (*Candida albicans*)】

[0110] 【材料】

[0111] 在这些实施例中使用病原分离物的新鲜培养物。使用的细菌菌株是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (MRSA USA300),铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27312和白色假丝酵母 (*Candida albicans*) ATCC 64550。

[0112] 图5示出了在这些示例中使用的扩展板方法。总之,制成琼脂平板,将细菌稀释至 10^6 或 10^8 CFU/mL,将细菌和药物混合在一起,然后铺板。使用玻璃铺展的珠子是因为它们能更好地传播细菌。将板温育24小时,然后对形成的菌落进行计数。

[0113] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (MRSA,USA 300) 的增殖培养物用于菌落形成测定。通过擦拭直径为3cm的生长区域并将其重悬来回收MRSA的冻干细菌培养物,以获得约 10^8 CFU/mL的最终接种物悬浮液。使用历史光密度测量来确认浓度。在引入细菌之前,将总化合物BM3103悬浮在70v/v%醇凝胶制剂(制剂A)中,其中媒介物仅由70v/v%醇凝胶组成。用高,中,低剂量的BM3103,媒介物制剂,阳性对照(妥布霉素,600 μ g/mL)或未处理的对照(磷酸盐缓冲液)等份攻击 10^8 CFU/mL的MRSA。将接种物在37 $^{\circ}$ C的胰蛋白酶大豆肉汤平板上铺板24小时。拍摄板并计数。每个实验一式三份进行处理,并将实验重复3次,每组总共9个板。

[0114] 将每种处理的菌落计数制成表格,并确定菌落形成单位/mL的对数(Log CFU/mL)。计算每种处理的Log CFU/mL的平均值和标准偏差。在95%的置信区间上执行单因素方差分析。如图6A~6B所示,与未处理的对照相比,妥布霉素的阳性对照使MRSA USA 300计数减少了6倍。与媒介物(35v/v%,醇)和未处理的对照相比,低剂量的BM3103(0.05w/v%,2mM)使计数显著降低了6倍以上。与媒介物和未处理的对照相比,中等剂量(0.25w/v%,11mM)的计数显著降低了7倍,而高剂量的BM3103(0.5w/v%,22mM)完全降低了MRSA USA 300计数约8倍。与阳性对照相比,所有3个剂量的BM3103均显示MRSA USA 300计数明显降低,并表现出剂量依赖性抑制作用。

[0115] 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (PA,ATCC 27312) 和白色假丝酵母 (*Candida albicans*) (CA,ATCC 64550) 的增殖培养物用于菌落形成测定。通过擦拭直径3cm的生长区域并将其重悬来回收冷冻干燥的细菌培养物,以获得约 10^6 CFU/mL的最终接种物悬浮液。使用历史光密度测量来确认浓度。在细菌攻击之前,将二苯乙炔化合物BM3103悬浮在100%的二甘醇单乙醚(制剂C)中,其媒介物对照仅由二甘醇单乙醚组成。接种前,将100 μ L最终接种物(10^6 CFU/mL)与200 μ L LB肉汤和200 μ L BM3103剂量,媒介物,阳性对照(妥布霉素,PA为12 μ g/mL和CA为160 μ g/mL)或未处理的对照(磷酸盐缓冲液)混合。高,中和低BM3103剂量的最终平铺浓度分别为0.5%,0.25%和0.1w/v%(22mM,11mM和4mM)。将接种物接种在添加了西曲溴铵和萘啶酸(CN)的PA补液(也可以使用萘啶酸钠或萘啶酸)的琼脂上,并于37 $^{\circ}$ C在胰蛋白酶大豆肉汤板上进行CA实验24小时。拍摄板并计数。实验一式三份进行。

[0116] 将每种处理的菌落计数制成表格,并确定菌落形成单位/mL的对数(Log CFU/mL)。计算每种处理的Log CFU/mL的平均值和标准偏差。图7显示了PA的Log CFU/mL细菌计数。在高剂量BM3103(0.5w/v%,22mM)平板上未发现PA的细菌菌落。与媒介物,妥布霉素和未处理的对照组相比,中低剂量组的PA计数降低了约5倍。BM3103对PA细菌计数显示出剂量依赖性抑制作用。

[0117] 图8显示了CA的Log CFU/mL细菌计数。与低剂量,媒介物,妥布霉素和未处理的对照组相比,高剂量和中剂量组的CA计数降低了约4倍。

[0118] 【实例13:MRSA USA 400】

[0119] 【MRSA接种物】

[0120] 将耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (MRSA,USA 400)的增殖培养物用于菌落形成测定。将MRSA USA 400的冷冻原种培养物解冻,并在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中于37°C摇动过夜。将过夜培养物(0.5~1.0mL)添加到100mL TSB中,并在37°C摇动生长,并监测0.55~0.60的光密度,以获得约 10^8 CFU/mL的最终接种物悬浮液。

[0121] 【醇凝胶制剂】

[0122] 将BM3103悬浮在70v/v%的醇凝胶制剂中,以获得在实施例测试的期望的w/v%。将每种浓度彻底涡旋直至溶解。BM3103的初始测试浓度为1、0.5和0.1w/v%。将这些浓度和醇凝胶媒介物与等份的 10^8 CFU/mL接种物混合,以得到0.5、0.25和0.05% (22mM,11mM和2mM)终浓度的BM3103。妥布霉素(600 μ g/mL)作为阳性对照。媒介物和BM3103制剂包含匹配的最终浓度为35v/v%的醇。

[0123] 【Transcutol制剂】

[0124] 将BM3103以2.5w/v%溶解于Transcutol(二甘醇单乙醚)中并涡旋直至溶解。然后将该浓度连续稀释以达到测试的剩余浓度。接种前,将100 μ L最终接种物(10^8 CFU/mL)与20 μ L TSB肉汤和80 μ L BM3103剂量或媒介物混合。阳性对照为600 μ g/mL妥布霉素。BM3103的最终平铺浓度为1、0.5、0.25和0.1w/v% (44mM,22mM,11mM,4mM)的BM3103。媒介物和BM3103制剂包含匹配的最终浓度为40v/v%的Transcutol。

[0125] 【平铺和计数菌落】

[0126] 将上面列出的与MRSA接种物组合的制剂铺在TSB琼脂平板上。将板在37°C下生长24小时,进行成像,并计数细菌菌落。在上述每个浓度水平下,一式三份进行实验。将每种处理的菌落计数制成表格,并确定菌落形成单位/mL的对数(Log CFU/mL)。计算每种处理的平均值和平均值的标准误差。

[0127] 如图9所示,醇凝胶制剂中的0.5和0.25%的BM3103导致MRSA USA 400无细菌计数。与媒介物对照相比,阳性对照妥布霉素和最低剂量的BM3103(0.05w/v%,2mM)使计数显著降低4倍。对于Transcutol制剂,图10显示0.1%的BM3103减少超过5倍。在Transcutol制剂中测试的剩余BM3103浓度没有MRSA USA 400的细菌计数。

[0128] 【实施例14:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)接种物】

[0129] 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的增殖培养物用于菌落形成测定。将鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的冷冻原种培养物解冻,并在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中于37°C摇动过夜。将过夜培养物(0.5~1.0mL)加入到100mL TSB中,并在37°C下摇动生长,并监测0.20~0.38的光密度,以获得约 10^8 CFU/mL的最终接种物悬浮液。

[0130] 【Transcutol制剂】

[0131] 将BM3103以2.5w/v%溶解于Transcutol(二甘醇单乙醚)中并涡旋直至溶解。然后将该浓度连续稀释以达到测试的剩余浓度。接种前,将100 μ L最终接种物(10^8 CFU/mL)与20 μ L TSB肉汤和80 μ L的BM3103剂量或媒介物混合。阳性对照为600 μ g/mL妥布霉素。BM3103的最终平铺浓度为1、0.5、0.25和0.1w/v%(44mM, 22mM, 11mM, 4mM)的BM3103。媒介物和BM3103制剂包含匹配的最终浓度为40v/v%的Transcutol。

[0132] 【平铺和计数菌落】

[0133] 将与接种物组合的Transcutol制剂铺在TSB琼脂平板上。将板在37 $^{\circ}$ C下生长24小时,进行成像,并对细菌菌落进行计数。实验在上述每个浓度水平进行了4次。将每种处理的菌落计数制成表格,并确定菌落形成单位/mL的对数(Log CFU/mL)。计算每种处理的平均值和平均值的标准误差。

[0134] 如图11所示,0.1%的BM3103的最低测试浓度导致鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)没有减少。0.25%的BM3103细菌计数略有降低。浓度为0.5%的BM3103导致细菌计数减少4倍,而浓度为1%的BM3103导致鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)几乎完全减少(在1个测试板上只有1个菌落)。

[0135] 【实施例15:生物膜形成测定】

[0136] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (MRSA, USA 400)的增殖培养物用于菌落形成测定。将MRSA USA 400的冷冻原种培养物解冻,并在胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中于37 $^{\circ}$ C摇动过夜。将过夜培养物(0.5~1.0mL)添加到100mL TSB中,并在37 $^{\circ}$ C摇动生长,并监测0.55~0.60的光密度,以获得约 10^8 CFU/mL的最终接种物悬浮液。

[0137] 【防止生物膜形成】

[0138] 对于生物膜抑制测定,使用100 μ L MRSA USA 400接种物(10^8 CFU/mL)的每种BM3103药物浓度100 μ L接种在96孔板中。将0.1M的BM3103浓储溶液解在乙醇中,并在96孔板上连续稀释在TSB中,以获得1mM至0.002mM的最终浓度。经药物处理的接种物在37 $^{\circ}$ C下过夜生长,无需摇动。拍摄每种浓度的图像,代表性的图像显示在图12A~12D中。在0.625mM的浓度下,BM3103完全抑制MRSA USA 400的生物膜形成(图12A)。0.008mM的BM3103存在轻度的生物膜形成(图12B)。在约0.002mM的浓度下,BM3103对MRSA USA 400的生物膜形成没有影响,并且与未用BM3103处理的对照孔相当(图12C~12D)。总体而言,BM3103在浓度高于0时会完全抑制生物膜的形成。

[0139] 【细菌细胞死亡】

[0140] 为了确认用BM3103处理诱导了MRSA USA 400细菌细胞死亡,未处理的细胞和用BM3103处理的细胞都用DAPI(核染料)和碘化丙啶(PI,活死染料)的组合染色。在健康的细胞中,PI不能穿过细胞膜并且不产生荧光信号。如果细胞死亡或细胞膜受损,它将结合DNA并在535nm激发光和617nm发射光之间发出荧光。将MRSA USA 400以 10^8 CFU/mL平铺在孔板中,结合BM3103处理或不进行处理。将板在37 $^{\circ}$ C下放置24小时。细菌细胞分别与DAPI和PI在50 μ g/mL和500 μ g/mL的室温下共染色15分钟。孔用温热的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,并在整个成像采集过程中保持在PBS中。每个滤镜使用相同的曝光极限捕获图像。在该实验中,未处理的细胞显示出强的DAPI染色,仅有PI的光和稀疏染色,表明生物膜内的细菌是活的(图13)。用BM3103处理24小时后,PI染色从0.002mM到0.0625mM呈剂量依赖性增加,表明大

多数细菌是死亡的或正在死亡(图13)。高于0.0625mM的浓度给出了相似的结果。

[0141] 【现有生物膜的处理】

[0142] 对于MRSA USA 400生物膜的处理,使用与以上生物膜抑制部分中所述相同的96孔板测定程序。但是,MRSA USA 400接种物(10^8 CFU/mL)在不存在BM3103且没有摇动的情况下于37°C过夜生长。生物膜形成24小时后,将BM3103跨96孔板从1mM到0.002mM进行系列稀释。将该板再次在37°C下温育过夜而不摇动。在总共48小时之后,拍摄每种浓度的图像,并且代表性的图像显示在图14A~14D中。在0.125mM(图14A),0.0625mM(图14B)或更高的浓度下,BM3103显著减少了MRSA USA 400的生物膜。在0.008mM(图14C)下,生物膜仍略有减少,但是在低于0.002mM的浓度下或在未处理的对照中(图14D),未观察到生物膜的减少。

[0143] 【现有生物膜中的细胞死亡】

[0144] 为了处理MRSA USA 400生物膜,使用了与以上生物膜抑制部分所述相同的96孔板测定方法。但是,MRSA USA 400接种物(10^8 CFU/mL)在缺少BM3103且没有摇动的情况下,在37°C下生长过夜。生物膜形成24小时后,将BM3103跨96孔板从1mM到0.002mM进行系列稀释。将该板再次在37°C下温育过夜而不摇动。

[0145] 为了证实在现有生物膜中用BM3103诱导的MRSA USA 400细菌细胞死亡,未处理的细胞和用BM3103处理的细胞都用DAPI(核染料)和碘化丙啶(PI,活死)的组合染色如实施例15中所述)。将MRSA USA 400以 10^8 CFU/mL在孔板中铺板,组合BM3103处理或不进行处理。将板在37°C下放置24小时。细菌细胞分别与DAPI和PI在50 μ g/mL和500 μ g/mL的室温下共染色15分钟。孔用温热的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,并在整个成像采集过程中保持在PBS中。每个滤镜使用相同的曝光极限捕获图像。在该实验中,未处理的细胞显示出强的DAPI染色,仅有PI的光和稀疏染色,表明生物膜内的细菌是活的(图15)。用BM3103处理24小时后,PI染色从0.008mM到0.125mM呈剂量依赖性增加,表明大多数细菌在生物膜内是死亡的或正在死亡(图15)。高于0.125mM的浓度也得到了相似的结果。

[0146] 为了说明和描述的目的,已经给出了本发明的各个方面和实施例的前述描述。其并非旨在穷举所有实施例或将本发明限于所公开的特定方面。根据上述教导,明显的修改或变型是可能的,并且当根据其被公平,合法和公平地授予的广度来解释时,这些修改和变型完全可以落入由所附权利要求确定的本发明的范围内。

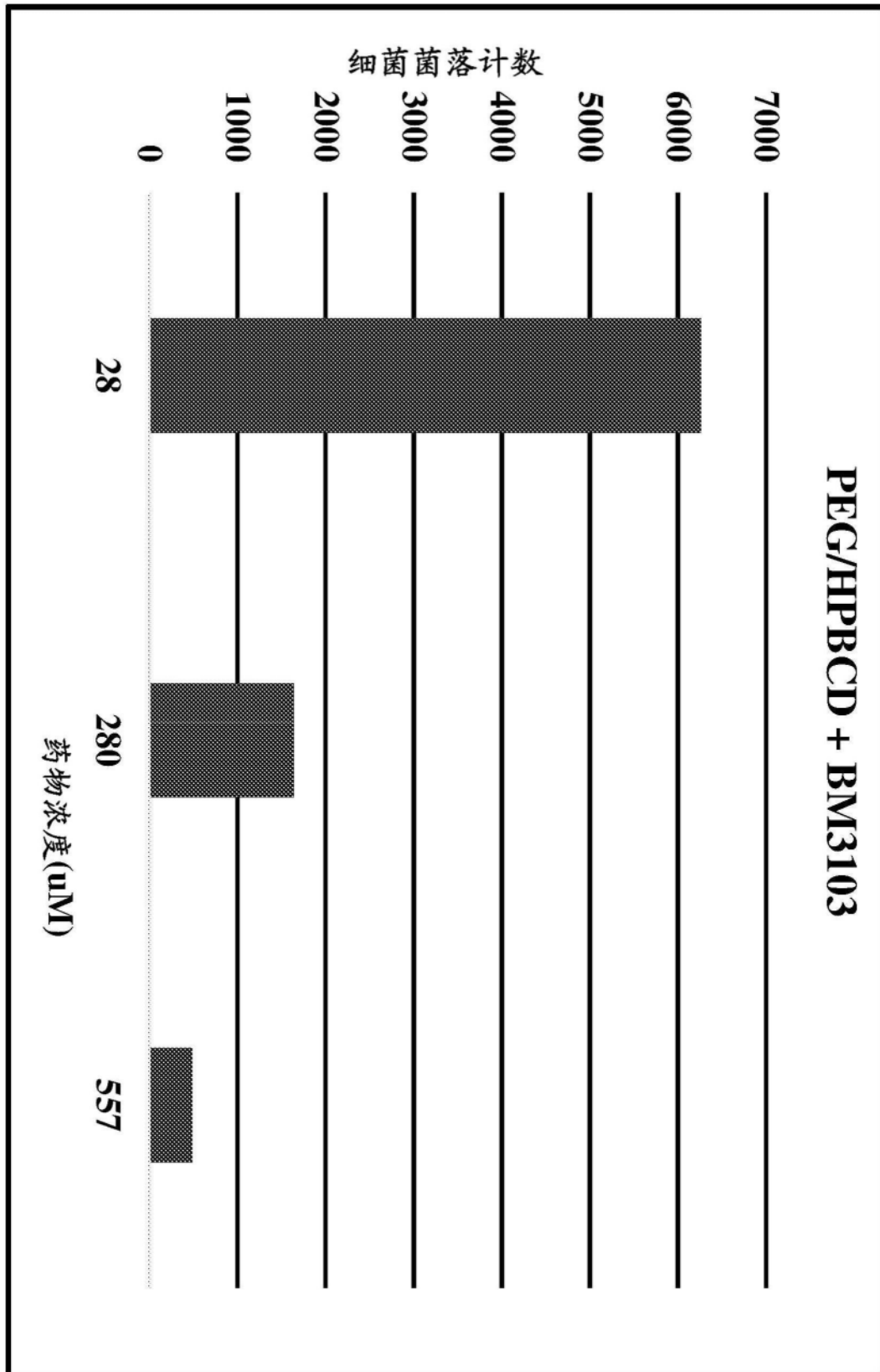


图1

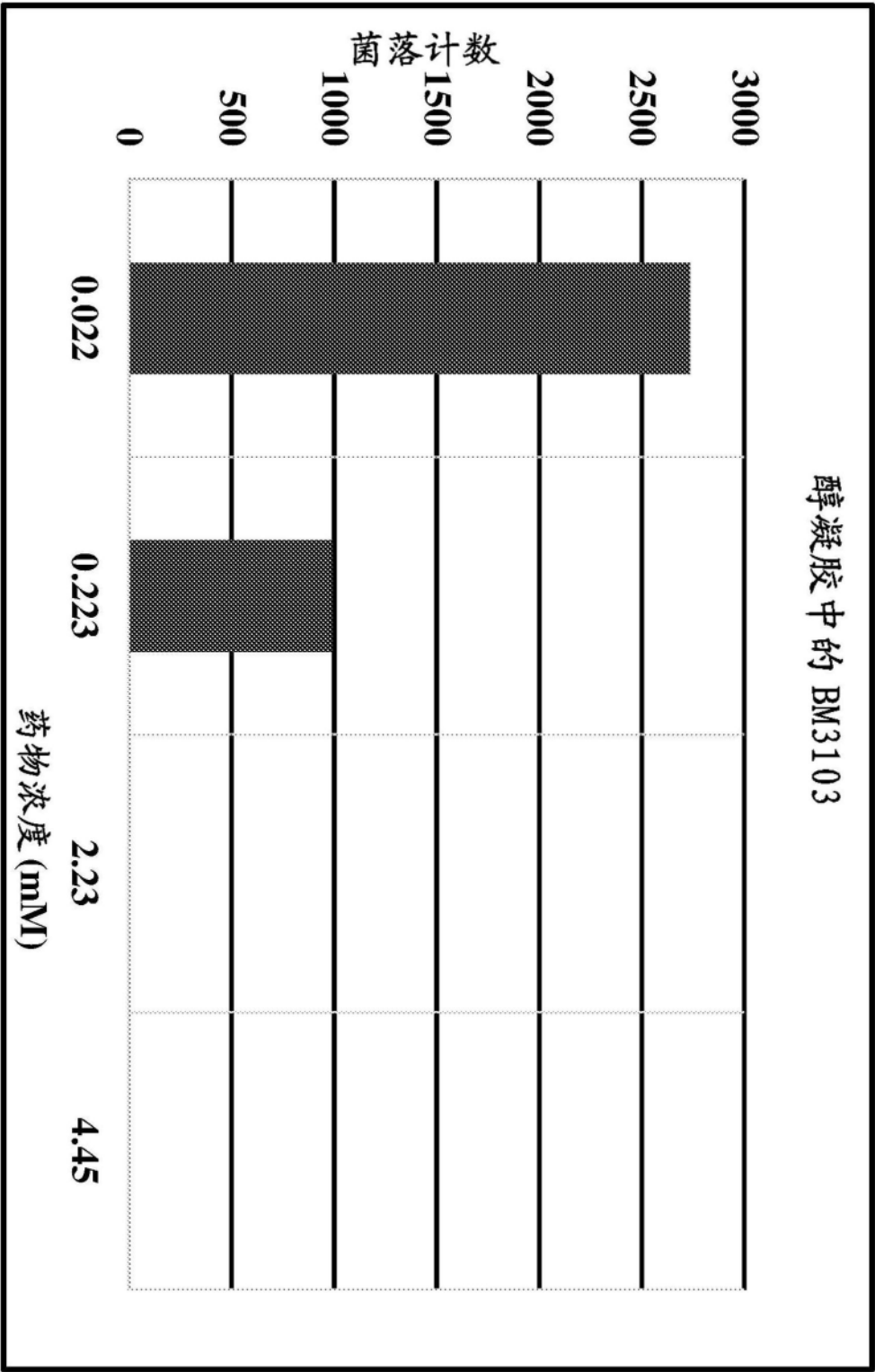


图2

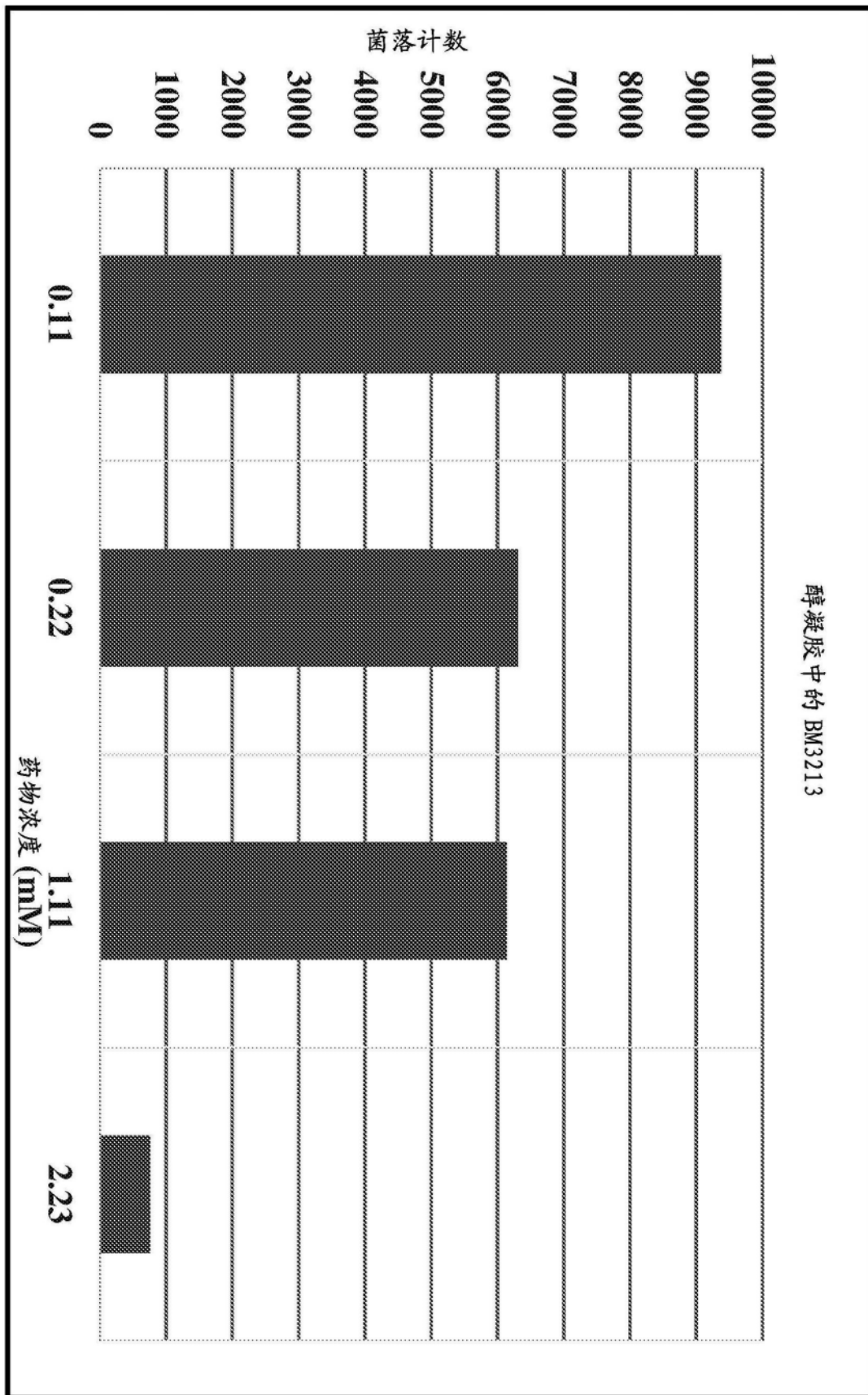


图3

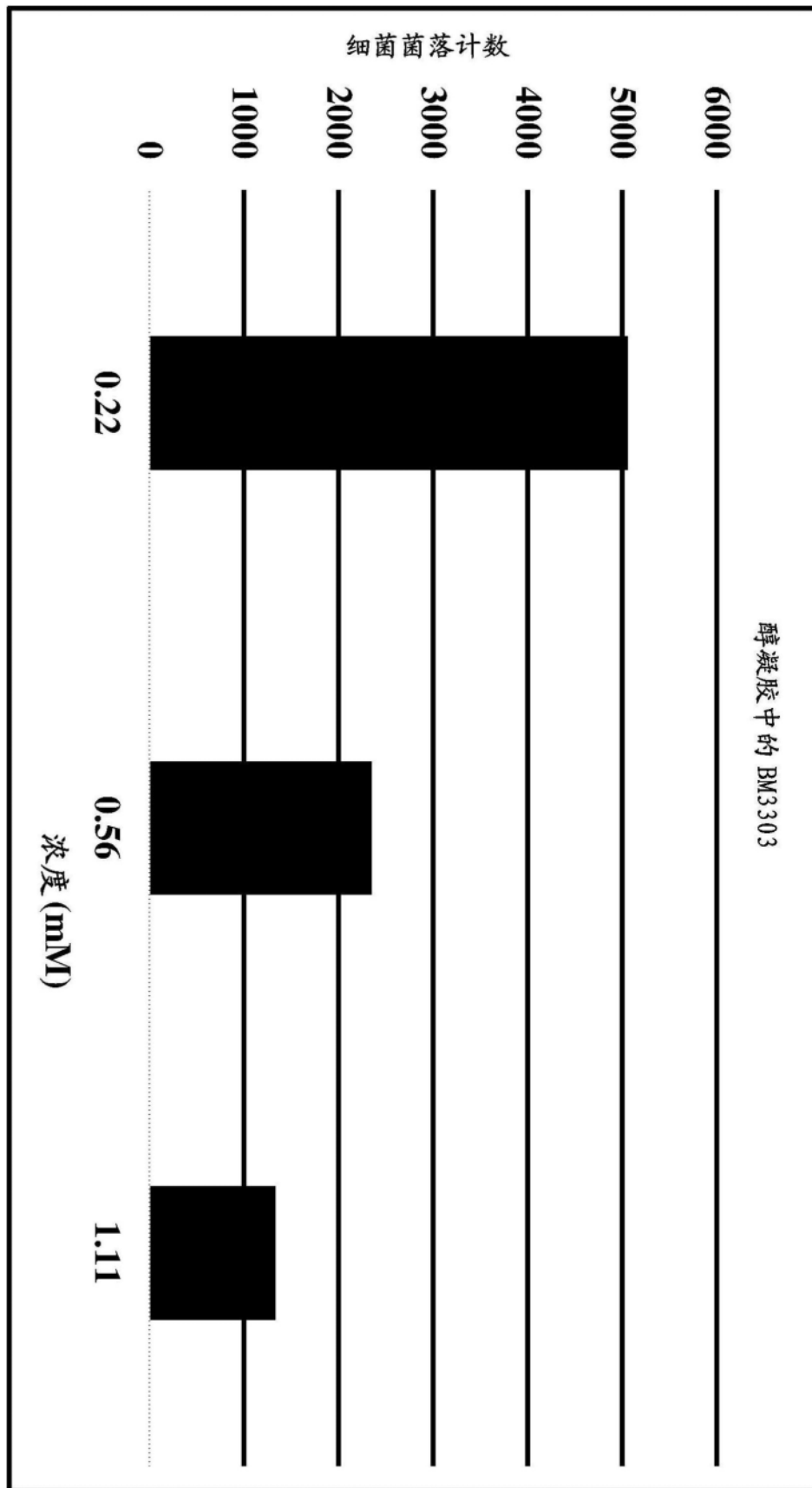


图4

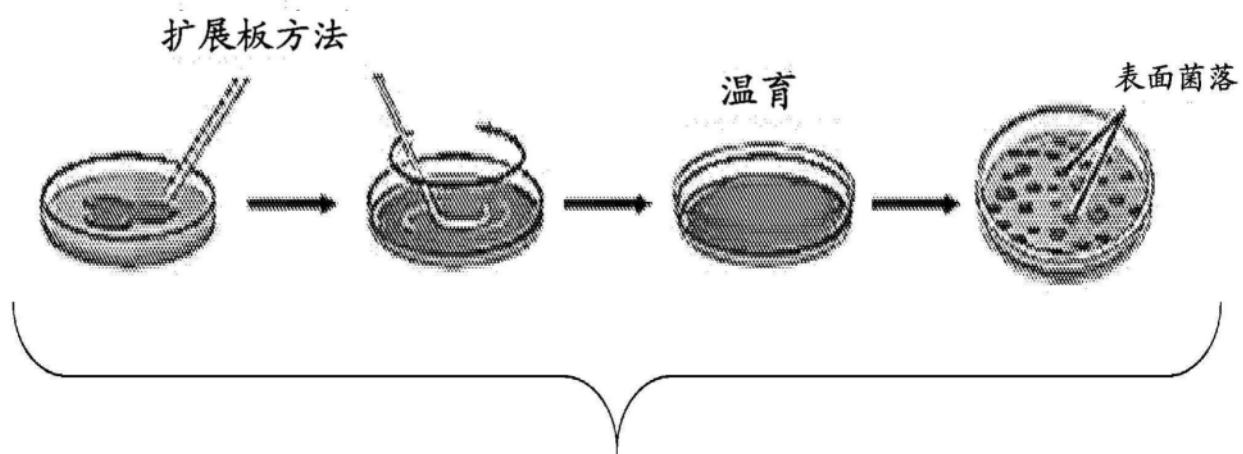


图 5

图5

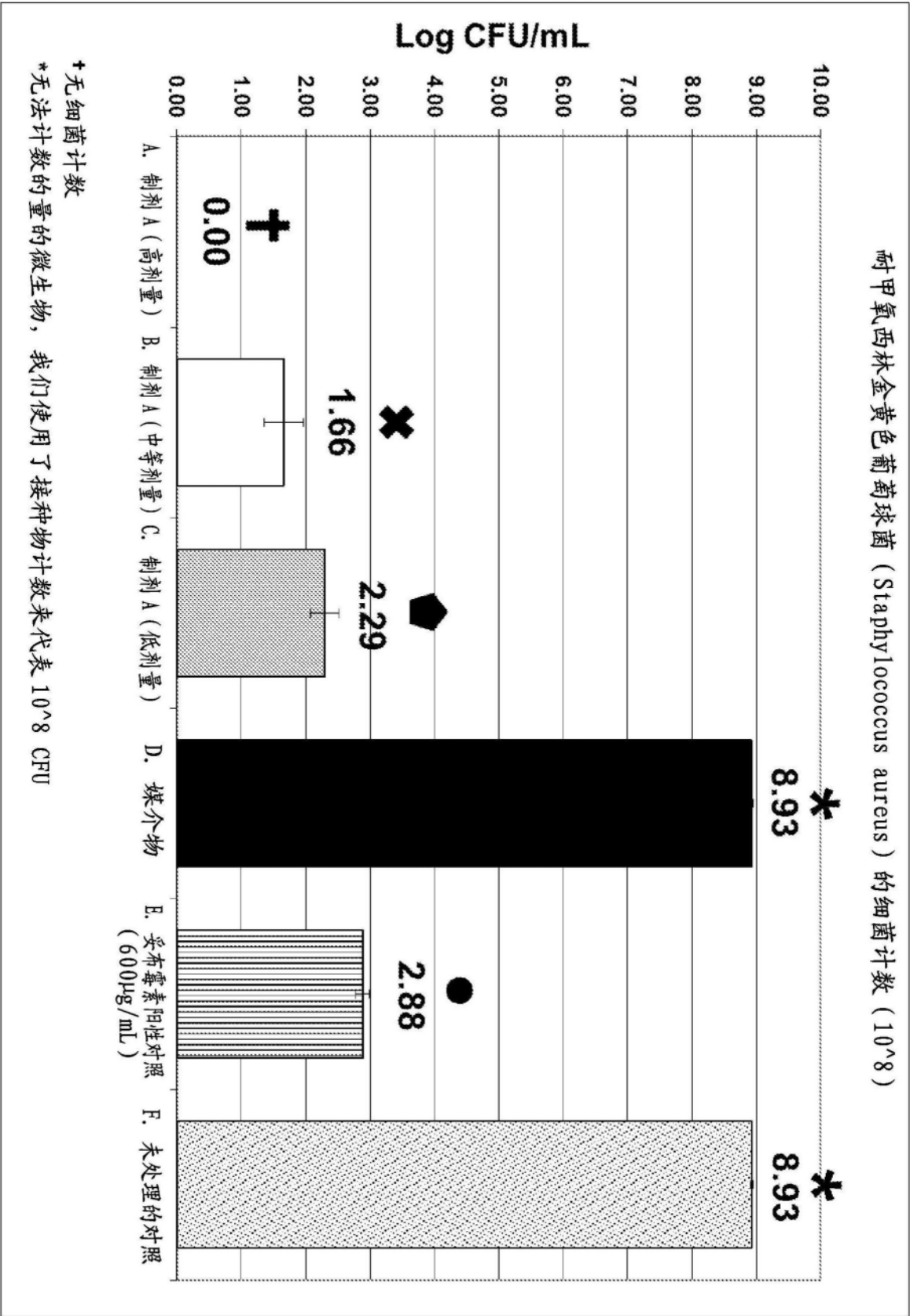


图6A

*p<0.05 统计学显著性						
处理	A. 制剂 A (高剂量)	B. 制剂 A (中等剂量)	C. 制剂 A (低剂量)	D. 媒介物	E. 妥布霉素 阳性对照 (600μg/mL)	F. 未处理 的对照
A. 制剂 A (高剂量)		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
B. 制剂 A (中等剂量)	0.000*		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
C. 制剂 A (低剂量)	0.000*	0.000*		0.000*	0.000*	0.001*
D. 媒介物	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*	1.000
E. 妥布霉素 阳性对照 (600μg/mL)	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
F. 未处理 的对照	0.000*	0.000*	0.000*	1.000	0.000*	

*p<0.05, 相比全部处理

*p<0.05, 相比 C. 制剂 A (低剂量)、D. 媒介物、

E. 妥布霉素阳性对照 (600μg/mL) 和 F. 未处理的对照

*p<0.05, 相比 D. 媒介物、E. 妥布霉素阳性对照 (600μg/mL)

和 F. 未处理的对照

*p<0.05, 相比 D. 媒介物和 F. 未处理的对照

图 6B

图6B

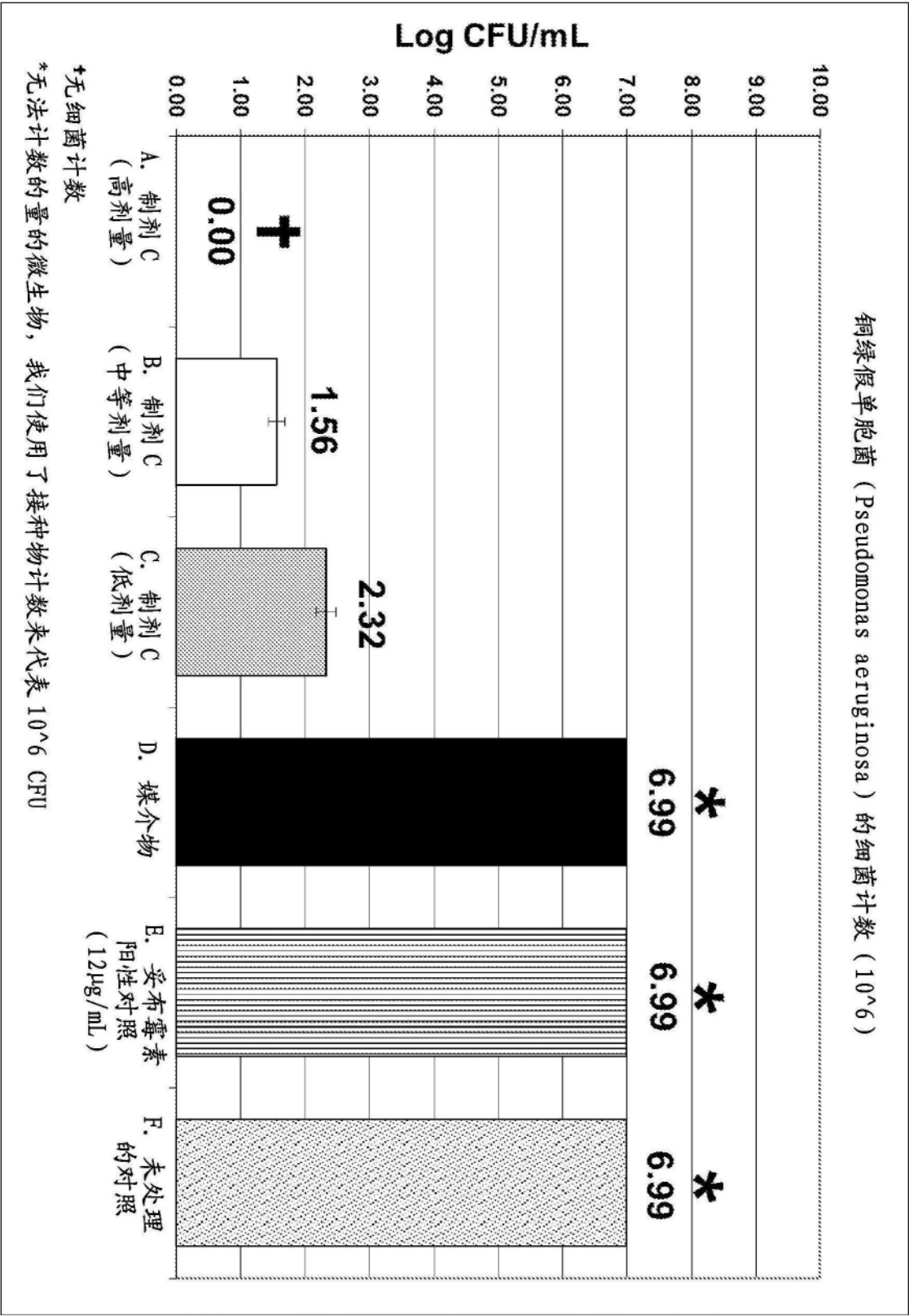


图7

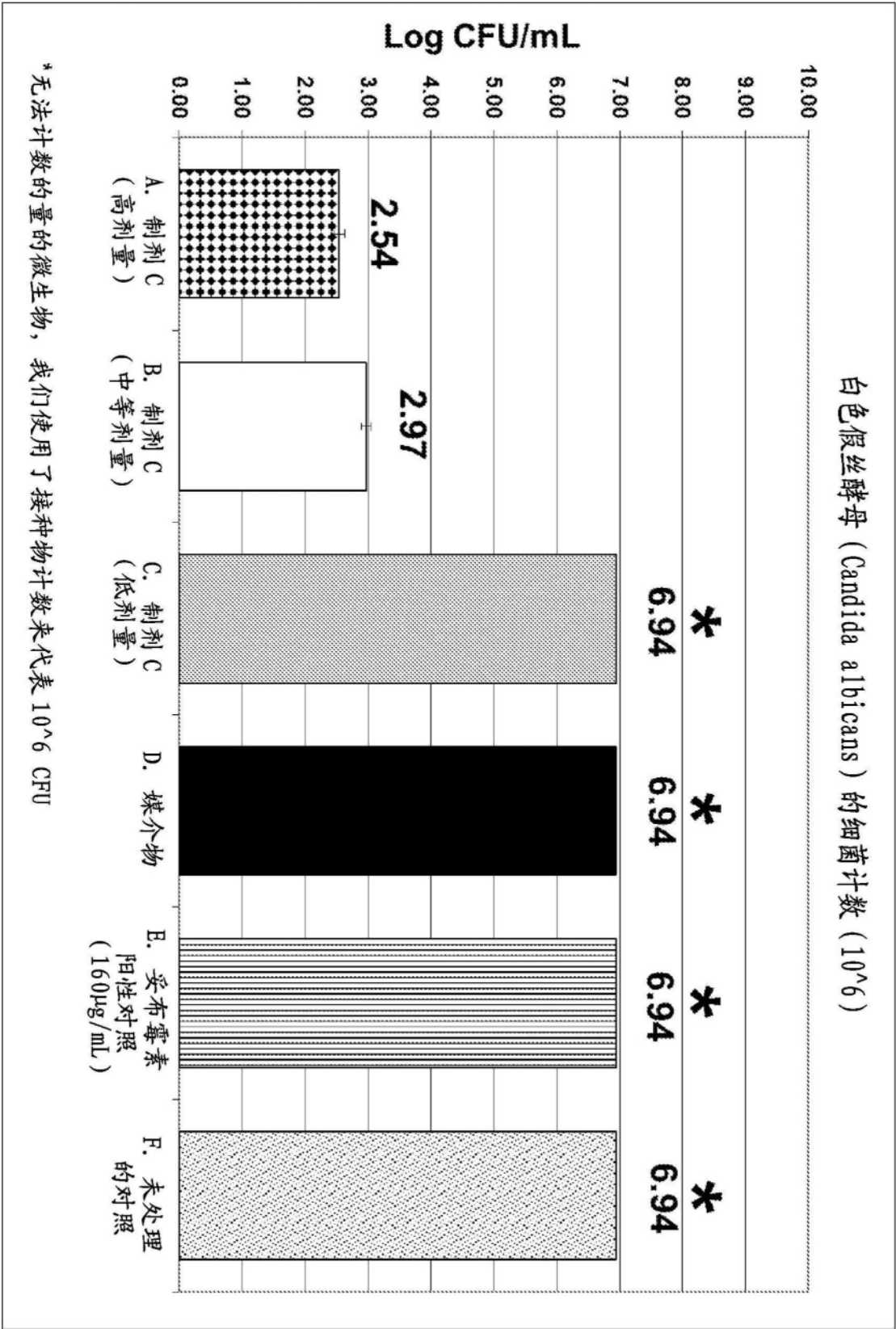


图8

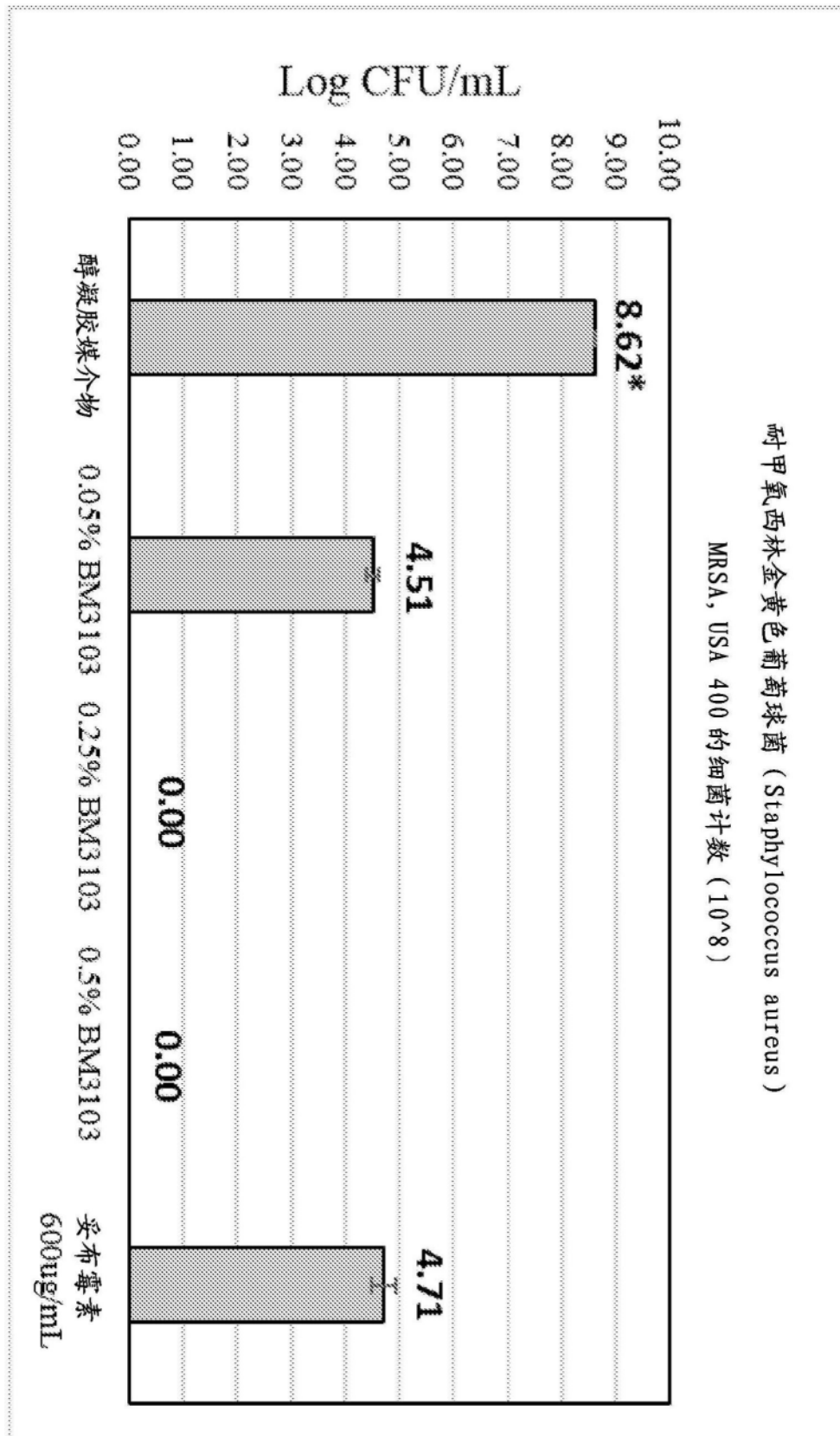


图9

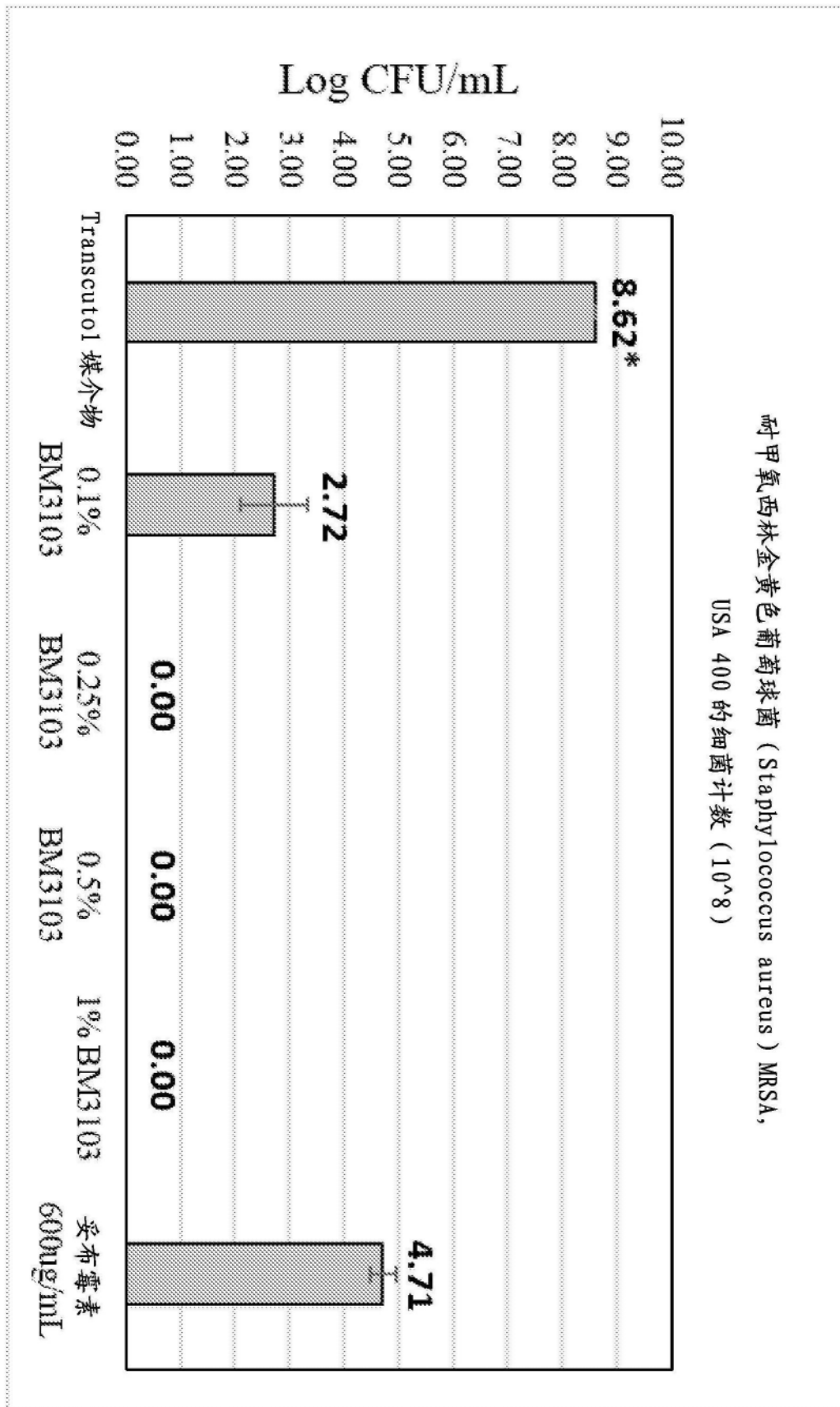


图10

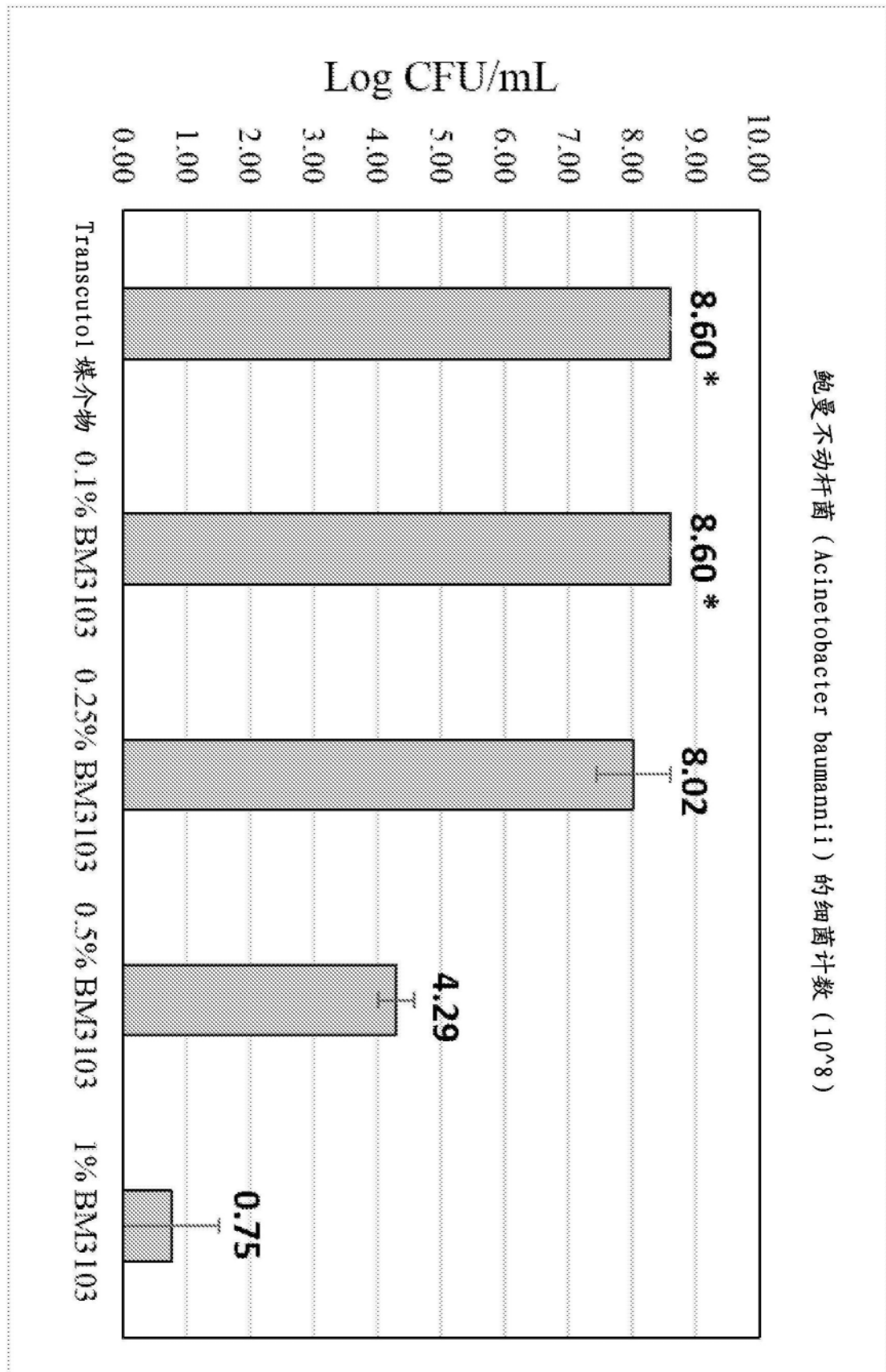


图11

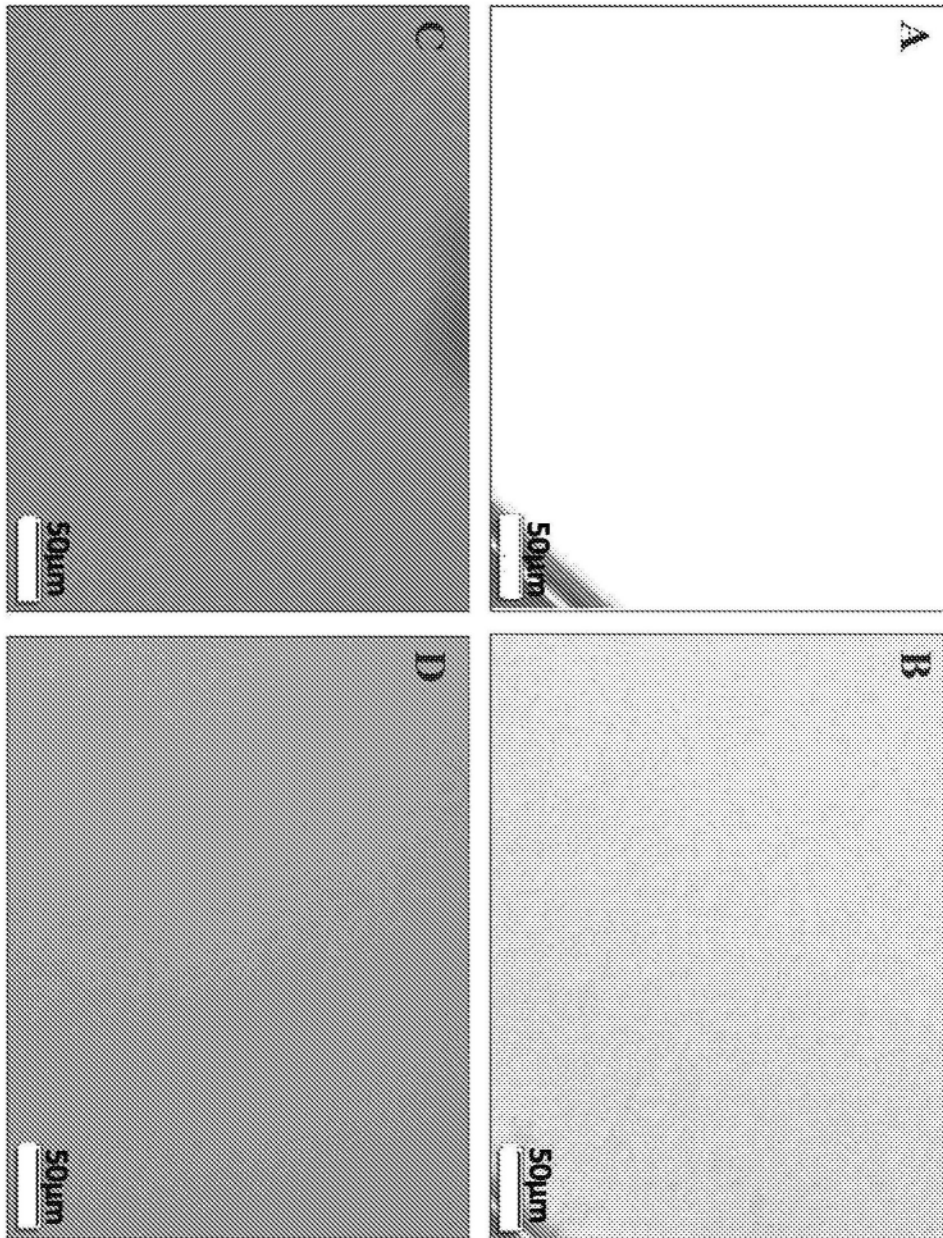


图12A-12D

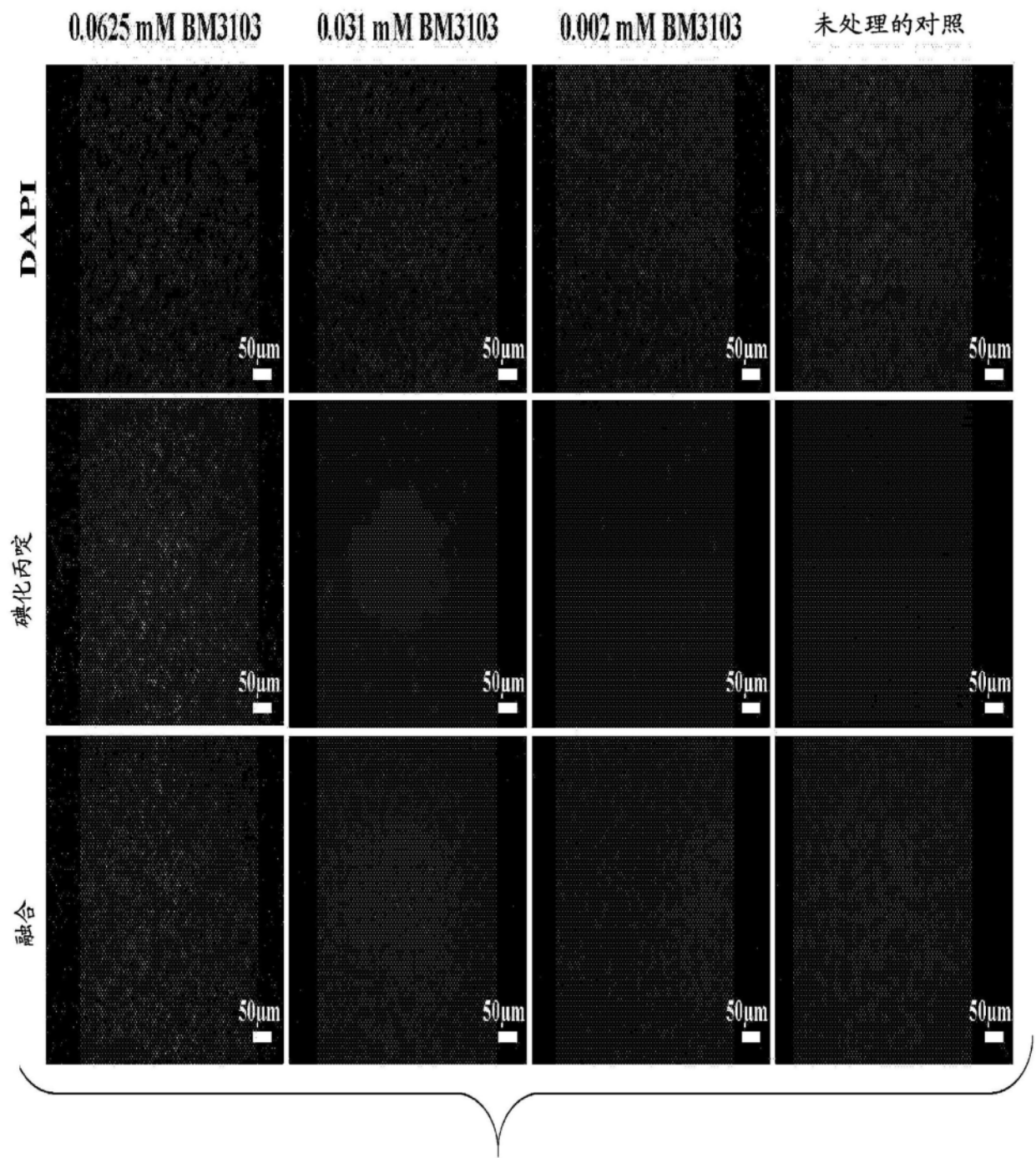


图 13

图13

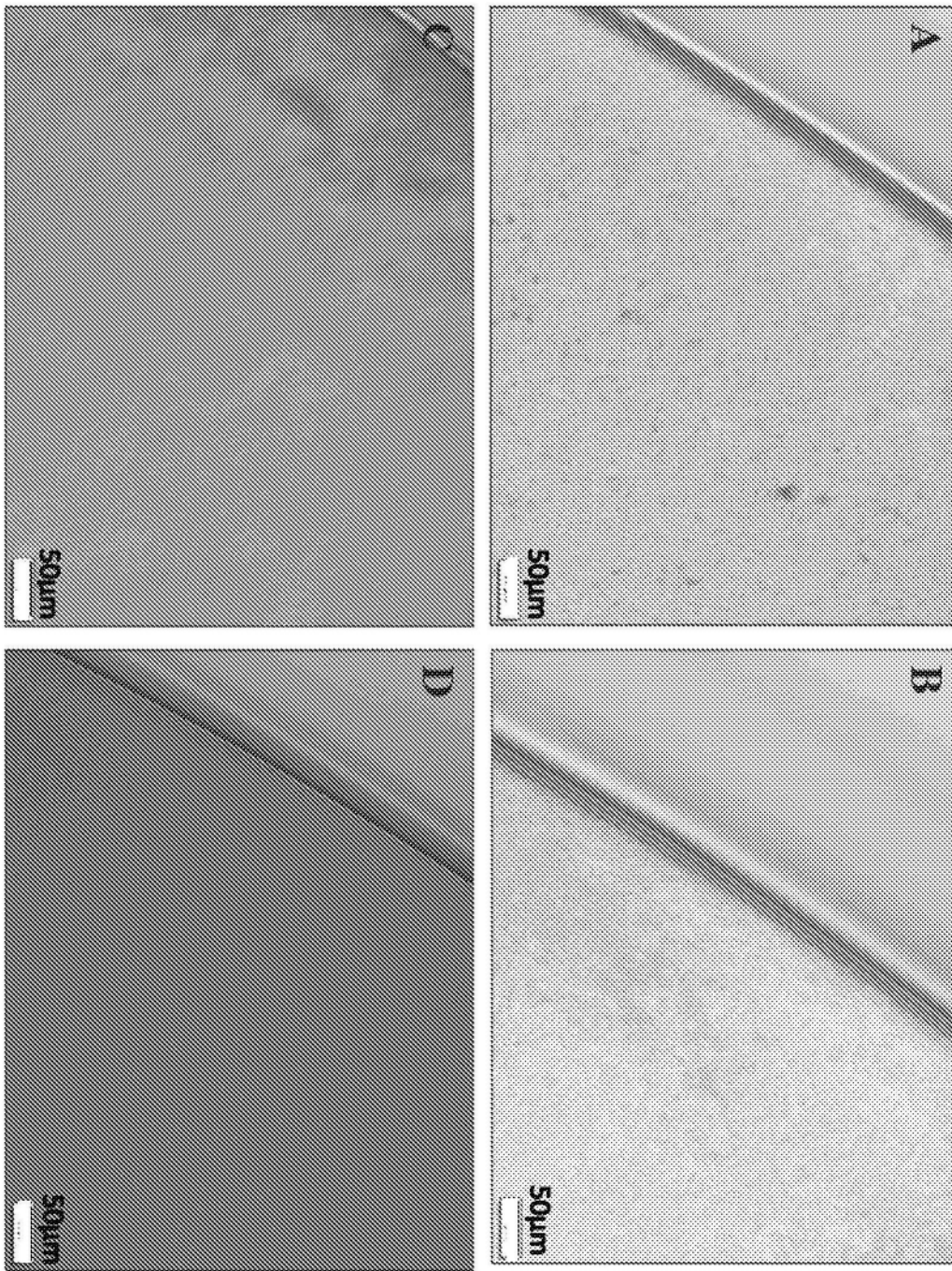


图14A-14D

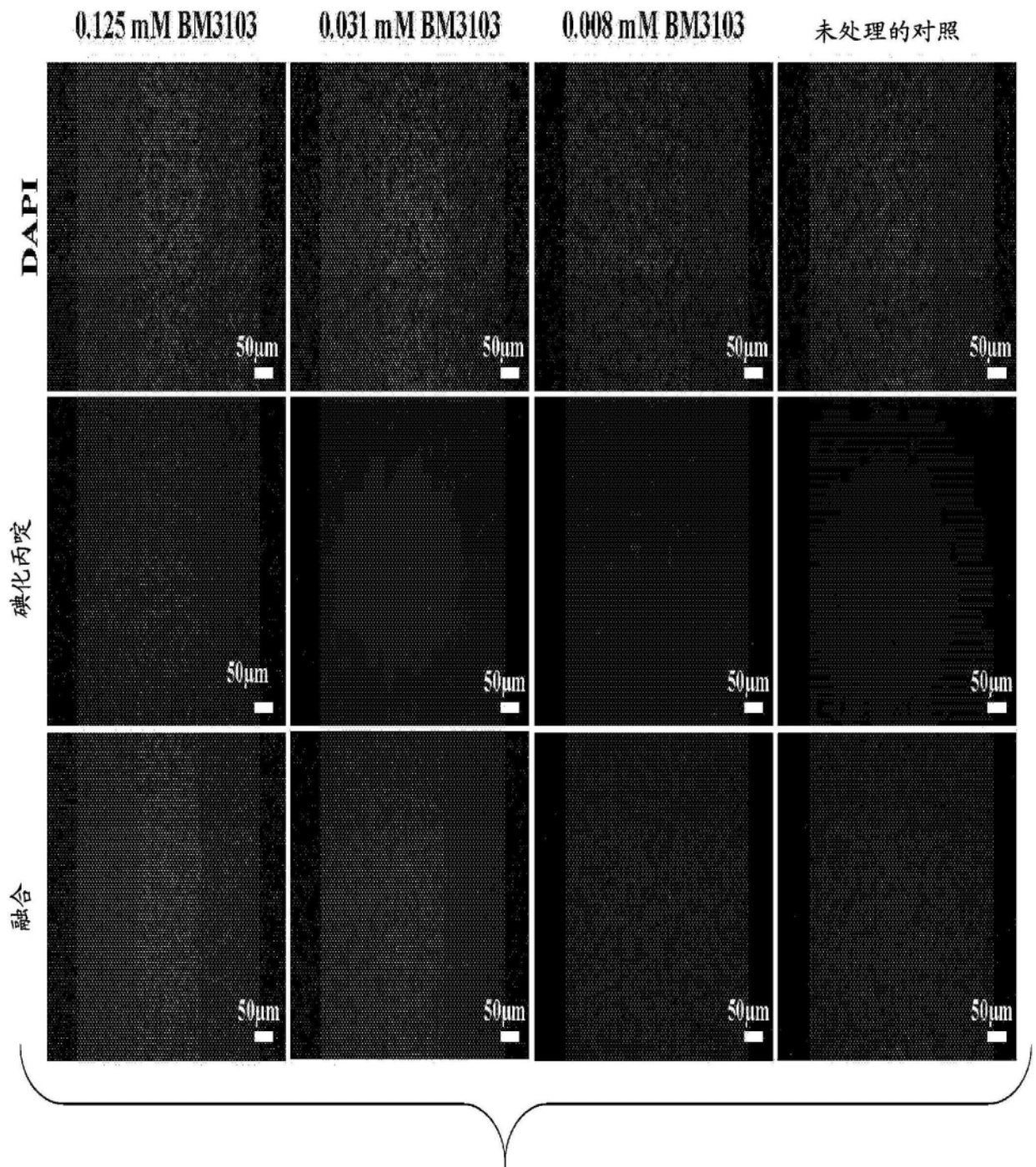


图 15

图15