(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119789786 A
(43)申请公布日 2025.04.08

(21)申请号 202380062958.0
(22)申请日 2023.08.29
(30)优先权数据
2022-136098 2022.08.29 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/031213 2023.08.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/048581 JA 2024.03.07
(71)申请人 日产自动车株式会社
地址 日本神奈川县
申请人 国立大学法人东北大学
(72)发明人 伊藤仁 青梅亚美 内村允宣 松本晃汰 曾根和树 平泽典保 岩渕好治 金野智浩 笹野裕介 濑川良佑
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 岳雪兰
(51)Int.Cl.
A01N 43/42(2006.01)
A01N 43/36(2006.01)
A01N 43/40(2006.01)
A01N 43/84(2006.01)
A01N 43/90(2006.01)
A01P 1/00(2006.01)
A01P 3/00(2006.01)
A61L 9/00(2006.01)
A61L 9/01(2006.01)
D06M 13/388(2006.01)

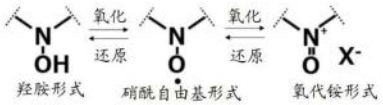
权利要求书4页 说明书19页 附图8页

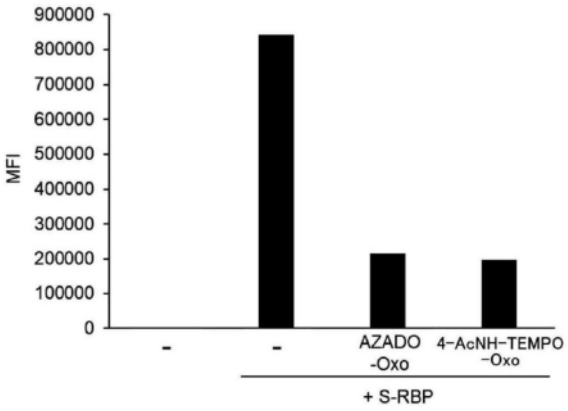
(54)发明名称

菌或病毒的灭活方法和灭活剂、以及使用了所述灭活剂的抗病毒性基材

(57)摘要

[问题]提供一种廉价的手段,其将对环境的负担抑制为最小限度,同时不以光的存在为前提而可以对微生物发挥灭活效果。[解决手段]通过使具有下述氧化还原机制的化合物与存在被菌或病毒污染的风险的对象接触,从而使菌或病毒灭活:式中,X^-为抗衡阴离子,虚线表示与其他原子的键合位置。





CN 119789786 A

1.一种菌或病毒的灭活方法,其包含:使具有下述氧化还原机制的化合物与存在被菌或病毒污染的风险的对象接触,

[化学式1]



式中,X^-为抗衡阴离子,虚线表示与其他原子的键合位置。

2.根据权利要求1所述的灭活方法,其中,

通过对构成所述病毒的刺突蛋白造成氧化性损伤而灭活所述病毒。

3.根据权利要求1所述的灭活方法,其是菌的灭活方法,

所述菌为细菌或真菌。

4.根据权利要求1或2所述的灭活方法,其中,

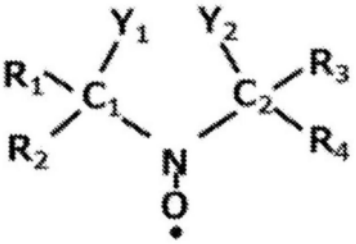
所述硝酰自由基形式和所述氧代铵形式之间的标准氧化还原电位(25℃)为+100mV～+1000mV[Ag/Ag^+]。

5.根据权利要求1所述的灭活方法,其中,

所述化合物的硝酰自由基形式如下述化合物式1所示:

[化学式2]

[化合物式1]



式中,R_1～R_4、Y_1和Y_2分别独立,并为氢原子或任选进行了取代的一价的有机基团,其中,

Y_1和Y_2任选彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮单环,并且

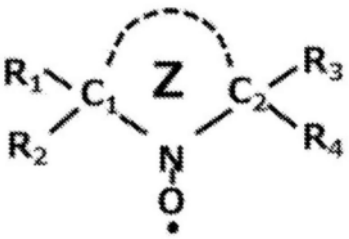
R_1和R_3任选彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮双环,或任选构成所述含氮双环的两个环进一步交联,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮三环。

6.根据权利要求5所述的灭活方法,其中,

所述化合物的硝酰自由基形式如下述化合物式2所示:

[化学式3]

[化合物式2]



式中,R_1～R_4分别独立,并为氢原子或任选进行了取代的一价的有机基团,Z为任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮单环,其中,进一步任选

R_1和R_3彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮双环,或

构成所述含氮双环的两个环进一步交联,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮三环。

7.根据权利要求5或6所述的灭活方法,其中,

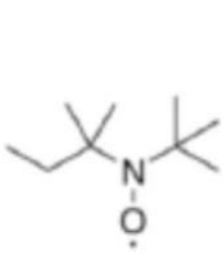
在所述化合物不包含所述单环、所述双环或所述三环或包含所述含氮单环的情况下,R_1～R_4分别独立,并为氢原子或碳原子数1～4的烷基,

在所述化合物包含所述含氮双环或所述含氮三环的情况下,R_2和R_4分别独立,并为氢原子或碳原子数1～4的烷基。

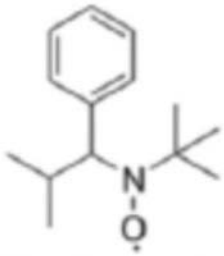
8.根据权利要求1或2所述的灭活方法,其中,

所述化合物的硝酰自由基形式为选自以下化合物中的1种或2种以上:

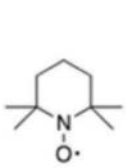
[化学式4-1]



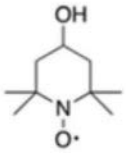
叔戊-叔丁基硝基氧



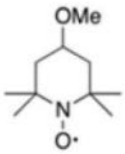
2,2,5-三甲基-4-苯基-3-氮杂己烷-3-硝基氧



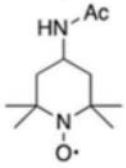
TEMPO



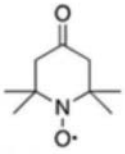
4-羟基TEMPO



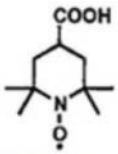
4-甲氧基TEMPO



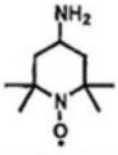
4-乙酰氨基TEMPO



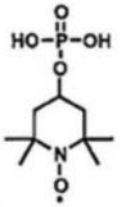
4-氧代TEMPO



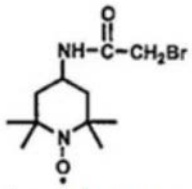
4-羧基TEMPO



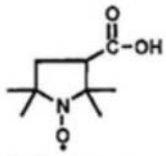
4-氨基TEMPO



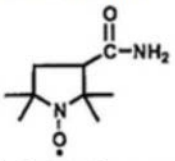
4-膦酰基TEMPO



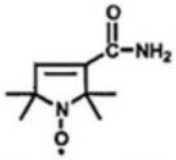
4-(2-溴乙酰胺)TEMPO



3-羧基PROXYL

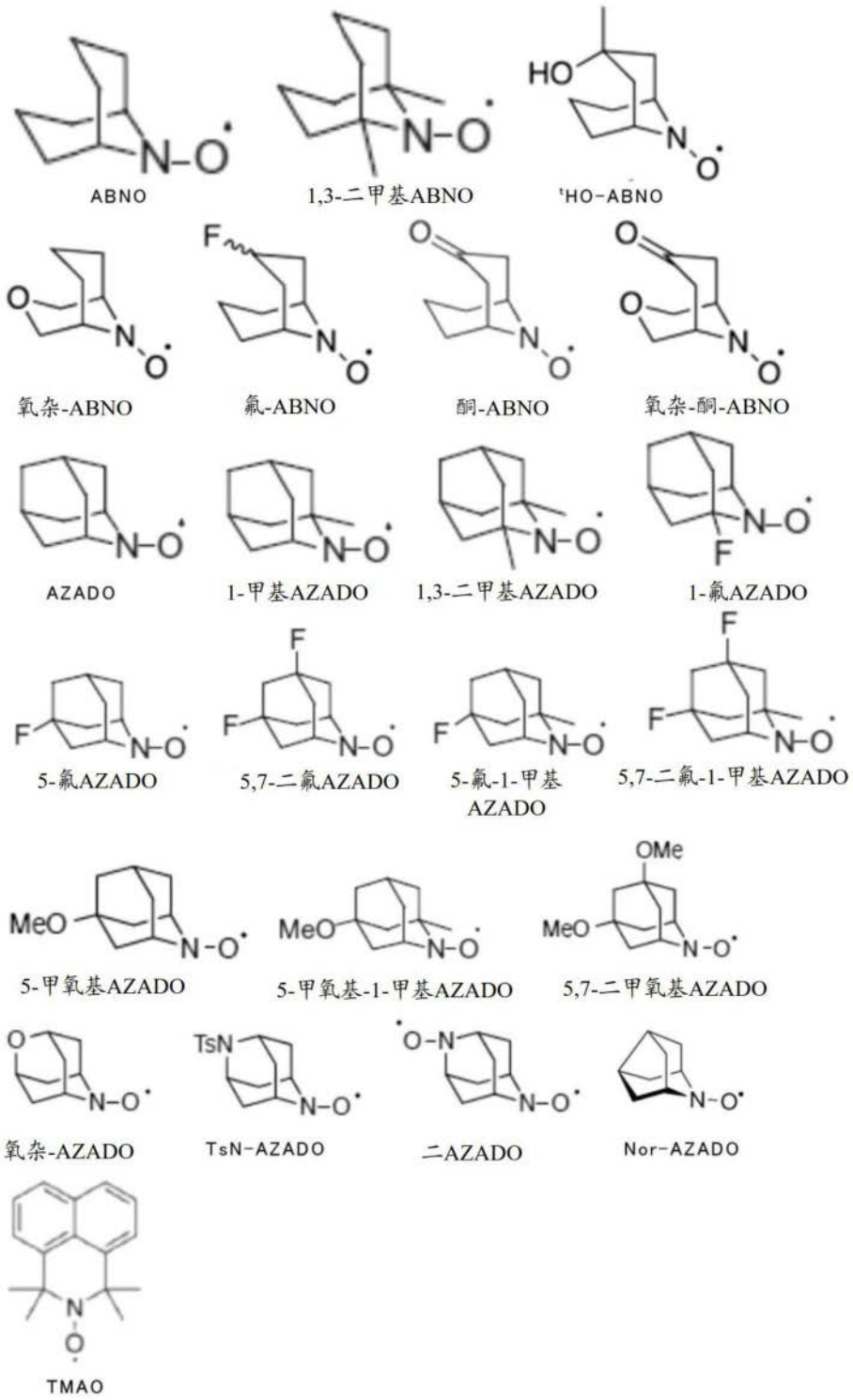


3-氨基甲酰基PROXYL



3-氨基甲酰基-2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-基氧基

[化学式4-2]



9.根据权利要求8所述的灭活方法,其中,

所述催化剂的硝酰自由基形式为2-氮杂金刚烷-N-氧基(AZADO)、2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基(TEMPO)或4-乙酰氨基TEMPO。

10.根据权利要求1或2所述的灭活方法,其中,

在包含过渡金属的助催化剂的存在下,使所述化合物与所述对象接触。

11.根据权利要求10所述的灭活方法,其中,

所述过渡金属包含选自Ag、Au、Pt、Pd、Ni、Mn、Fe、Ti、Al、Zn和Cu中的1种或2种以上。

12.根据权利要求1或2所述的灭活方法,其中,

通过将包含所述化合物的溶液喷雾至所述对象而使所述化合物与所述对象接触。

13.一种菌或病毒的灭活剂,其包含:具有下述氧化还原机制的化合物,

[化学式5]



式中,X^-为抗衡阴离子,虚线表示与其他原子的键合位置。

14.根据权利要求13所述的灭活剂,其是菌的灭活剂,

所述菌为细菌或真菌。

15.一种抗菌或抗病毒性基材,其通过将权利要求13或14所述的灭活剂担载或涂布至基础基材而得到。

16.根据权利要求15所述的抗菌或抗病毒性基材,其中,

所述基础基材进一步担载或涂布有包含过渡金属的助催化剂。

17.根据权利要求15或16所述的抗菌或抗病毒性基材,其中,

所述基础基材为梭织布、无纺布、过滤器或氨基甲酸酯泡沫。

18.根据权利要求17所述的抗菌或抗病毒性基材,其中,

基于JIS L 1922:2016(纤维制品的抗病毒性试验方法)而测定得到的针对流感病毒或猫杯状病毒的抗病毒活性值(Mv)为2.0以上。

19.根据权利要求15或16所述的抗菌或抗病毒性基材,其用于口罩、医疗用纤维制品、空调机、空气净化器、冷冻机、调温机、除湿机、加湿机或吸尘器用过滤器。

菌或病毒的灭活方法和灭活剂、以及使用了所述灭活剂的抗病毒性基材

技术领域

[0001] 本发明涉及菌或病毒的灭活方法和灭活剂,以及使用了所述灭活剂的抗病毒性基材。

背景技术

[0002] 最近的全球化增加了病毒的感染爆炸的危险性,甚至1990年之后,1997年的禽流感(A/H5N1)、2002年的SARS(SARS-Cov)、2009年的新型流感(A/4H1N1)、2015年的MERS(MERS-Cov)作为传染病而世界性流行。这相较于1990年以前的大流行的频率是极多的。并且,2019年引发大流行的新型冠状病毒的出现,作为急性呼吸道传染病的COVID-19(SARS-Cov-2)不仅关系到人命,而且对经济造成了巨大的打击,对保护人类的安心·安全的生活环境构成巨大的威胁。

[0003] 建议进行用于除去病毒的换气、外部空气引入。然而,换气、外部空气引入扰乱由空调调节的温度、湿度环境,因此从节能的观点出发希望可以通过内部空气循环而迅速使病毒灭活。可以期待通过使用具有抗菌、抗病毒性的过滤器、内饰材料而灭活内部空气循环中的菌、病毒。此处,作为以往的赋予抗菌、抗病毒性的技术,根据日本专利第4584339号公报、日本特开2017-133137号公报,提出了使用金属离子而发挥抗菌、抗病毒效果的技术。此外,也提出了作为无机类的氧化物类,作为光催化剂而发挥功能的类别。

发明内容

[0004] 发明所解决的技术问题

[0005] 如日本专利第4584339号公报、日本特开2017-133137号公报所公开的无机类的金属类通过以金属离子的缓释为前提的蛋白质变性而发挥作用,存在可能对环境有不良影响这样的问题。此外,作为效果特别好的银、铜不仅作为贵金属是有用的,而且价格较高。此外,金属离子的缓释中需要溶解、扩散金属离子,存在需要时间才能获得抗菌、抗病毒效果这样的问题。并且,无机类的氧化物类(光催化剂)在不存在光时不发挥功能,因此存在照射太阳光等光的情况下使用或在暗处使用的情况下另外需要光照射设备这样的问题。

[0006] 因此本发明的目的在于提供一种廉价的手段,其将对环境的负担抑制为最小限度,同时不以光的存在为前提而可以对微生物发挥灭活效果。

[0007] 解决问题的技术手段

[0008] 本发明人为解决上述问题而进行了深入研究。其结果发现了,通过使具有给定的氧化还原机制的化合物与可能受到微生物的污染的对象接触而灭活微生物,从而完成了本发明。

[0009] 即,本发明的一种方式为菌或病毒的灭活方法,其包含:使具有下述氧化还原机制的化合物与存在被菌或病毒污染的风险的对象接触,

[0010] [化学式1]

[0011] 

[0012] 式中,X^-为抗衡阴离子,虚线表示与其他原子的键合位置。

附图说明

[0013] [图1]图1是对(a)TEMPO、(b)AZADO、(c)1-甲基AZADO和(d)1,3-二甲基AZADO这4种化合物,通过使用了循环伏安法的方法,测定硝酰自由基形式和氧代铵形式之间的标准氧化还原电位(E^0@25℃)而得到的循环伏安图。

[0014] [图2]是表示在确认AZADO的抗病毒效果的目的下,使用AZADO-Oxo或硝酸银对感染了CoV的CRFK细胞的培养上清的稀释系列进行处理,通过WST-8法评价抗病毒效果的结果(细胞存活率)的图表。

[0015] [图3]是在确认AZADO的抗病毒效果的目的下,对于使用AZADO-Oxo处理感染了CoV的CRFK细胞的培养上清而得到的样品,将使用显微镜观察孔而得到的照片与未添加病毒的细胞(无病毒)以及添加了病毒但未添加AZADO-Oxo的细胞(有病毒)的照片一并表示的图。

[0016] [图4]是表示在确认AZADO的抗病毒效果的目的下,对于使用AZADO-Oxo处理感染了CoV的CRFK细胞的培养上清而得到的样品,通过WST-8法评价抗病毒效果的结果(细胞存活率)的图表。

[0017] [图5]是表示在确认是否AZADO-Oxo通过氧化刺突蛋白而使其变性从而阻碍刺突蛋白与ACE2的结合而表现出抗病毒活性的目的下,将S-RBD-His(野生型)或S-RBD-His(奥密克戎株)与最终浓度不同的AZADO-Oxo进行混合,通过流式细胞技术(flowcytometry)进行评价的结果的图表。对于野生株(S-RBD-His(WT))的结果如图5(a)所示,对于奥密克戎株(S-RBD-His(Omicron))的结果如图5(b)所示。

[0018] [图6]是表示以比较化合物之间的抗病毒效果为目的,使用$AZADO^+BF_4^-$,$TEMPO^+BF_4^-$和$4\text{-AcNH-TEMPO}^+BF_4^-$,将S-RBD-His(野生型)与最终浓度不同的化合物进行混合,通过流式细胞技术进行评价的结果的图表。对于$AZADO^+BF_4^-$的结果如图6(a)所示,对于$TEMPO^+BF_4^-$的结果如图6(b)所示,对于$4\text{-AcNH-TEMPO}^+BF_4^-$的结果如图6(c)所示。需要说明的是,本说明书中,“AcNH”、“乙酰氨基”、“乙酰胺”、“NHAc”表示相同的官能团。

[0019] [图7]是表示将图6表示的各峰中的荧光强度的平均值(Mean Fluorescence Intensity)进行图表化而得到的结果的图。

[0020] [图8]是表示对于在图6和图7表示的实验中表现出较高的抗病毒效果的$AZADO^+BF_4^-$和$4\text{-AcNH-TEMPO}^+BF_4^-$,将添加至S-RBD-His(野生型)时的处理时间从30分钟延长至6小时并进行同样的操作而得到的MFI的图表的图。

[0021] [图9]是表示对于使用实施例中制备得到的AZADO/DB、AZADO-Cu(bpy)/DB、Cu(bpy)/DB和DENKABLACK(DB)处理卵白蛋白(OVA)而得到的样品,进行了上清的CBB染色的结果的电泳照片。

[0022] [图10]是表示对于使用实施例中制备得到的AZADO/DB、AZADO-Cu(bpy)/DB、Cu(bpy)/DB和DENKA BLACK(DB)处理卵白蛋白(OVA)而得到的样品,进行了上清和残渣的CBB

染色的结果的电泳照片。

[0023] [图11]是表示对于使用非担载的AZADO处理卵白蛋白(OVA)而得到的样品,进行了上清的CBB染色的结果的电泳照片。图11表示使用了AZADO-Oxo的结果。

[0024] [图12A]是表示对于本发明的化合物($TEMPO^+NO_3^-$、$AZADO^+NO_3^-$和4-AcNH-$TEMPO^+NO_3^-$),在评价针对大肠杆菌的灭活活性的目的下,将与所述化合物进行了接触的菌液进行平板培养,计算出活菌率的结果的图表。

[0025] [图12B]是表示对于本发明的化合物($TEMPO^+NO_3^-$、$AZADO^+NO_3^-$和4-AcNH-$TEMPO^+NO_3^-$),在评价针对金黄色葡萄球菌的灭活活性的目的下,将与所述化合物进行了接触的菌液进行平板培养,计算出活菌率的结果的图表。

[0026] [图12C]是表示对于本发明的化合物($TEMPO^+NO_3^-$、$AZADO^+NO_3^-$和4-AcNH-$TEMPO^+NO_3^-$),在评价针对青霉菌的灭活活性的目的下,将与所述化合物进行了接触的菌液进行平板培养,计算出活菌率的结果的图表。

[0027] [图13]是对于本发明的化合物($AZADO^+NO_3^-$),测定针对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)时,使用$AZADO^+NO_3^-$的最终浓度为1mM的样品进行培养后的琼脂培养基的照片。

[0028] [图14]是表示对于本发明的抗病毒性基材(AZADO-Cu(bpy)/DB),在评价针对雾状状态下的蛋白质的灭活效果之前,在液相中使所述基材与S-RBD反应,通过SDS-PAGE法和CBB染色法对反应后的S-RBD的量进行评价的结果的电泳照片。

[0029] [图15]是表示对于本发明的抗病毒性基材(AZADO-Cu(bpy)/DB),在评价针对雾状状态下的蛋白质的灭活效果的目的下,将含有S-RBD的水溶液喷雾至包含所述基材的过滤器,在孵育后通过SDS-PAGE法和银染色法对过滤器上残存的S-RBD的量进行评价的结果的电泳照片。

具体实施方式

[0030] 下文中,对于本发明的具体实施方式进行说明。

[0031] <<菌或病毒的灭活方法>>

[0032] 本发明的一种方式为菌或病毒的灭活方法,其包含:使具有所述的氧化还原机制的化合物(下文中,也称为“本方式的化合物”)与存在被菌或病毒污染的风险的对象接触。根据本发明,提供一种廉价的手段,其将对环境的负担抑制为最小限度,同时不以光的存在为前提而可以对微生物发挥灭活效果。

[0033] <本方式的化合物>

[0034] 本方式的化合物已知以往作为“有机硝酰自由基”。硝酰自由基为稳定的有机自由基分子,在有机合成的领域中作为氧化催化剂而广泛使用。尤其是有机硝酰自由基表现出氧化和还原两个方向的反应性,如所述反应式所示,发生一个电子还原而产生羟胺的反应和一个电子氧化而产生氧代铵离子的反应。通过硝酰自由基的氧化而生成的氧代铵离子具有较强的氧化能力,将底物双电子氧化后得到羟胺。本方式的化合物针对菌、病毒的蛋白质而作为氧化剂发挥作用并氧化所述蛋白质而使其功能降低或消失。由此,发挥使菌、病毒灭活的作用。此处,参与所述氧化还原机制的物质移动仅为H·、质子(H^+)、电子(e^-),发生比以往提出的Ag、Cu等金属离子的氧化还原更快的反应,进而可以实现更迅速的菌、病毒类的灭活。此外,本方式的微生物的灭活方法特征在于以氧化反应为基础,菌、病毒类由蛋白质构

成,因此具有无论细菌种、真菌(霉菌)种、并且无论病毒种的包膜的有无等,都可以发挥灭活作用这样的优点。需要说明的是,在氧代铵离子作为氧化活性物质发挥作用的氧化反应中,可以通过添加促进所述羟胺的再氧化的反应剂,使氧代铵离子再生而完成循环并以催化剂的方式发挥作用。

[0035] 本方式的化合物具有所述的氧化还原机制即可,对于其具体结构没有任何限制。此外,本方式的化合物可以是所述的氧化还原机制中的羟胺形式,可以是硝酰自由基形式,可以是氧代铵形式。其中,优选为羟胺形式或硝酰自由基形式,特别优选为硝酰自由基形式。

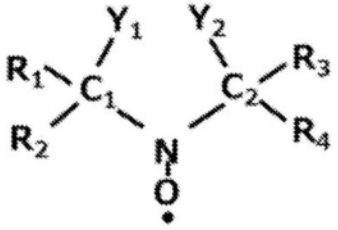
[0036] 此外,从针对微生物表现出优异的灭活活性这样的观点出发,对于本方式的化合物的、所述硝酰自由基形式和所述氧代铵形式之间的标准氧化还原电位(25℃)优选为+100mV～+1000mV[Ag/Ag^+],更优选为+130mV～+600mV[Ag/Ag^+]。需要说明的是,所述标准氧化还原电位的测定通过25℃的温度条件下的循环伏安法(CV)进行。此时,以使用了作为作用电极的玻碳电极(内径3mm),参比电极(Ag/Ag^+)和对电极(铂线)的三极方式进行,电位的扫描速率为50mV/s。需要说明的是,本发明的化合物的羟胺形式通常不稳定,迅速氧化为硝酰自由基形式。因此,通过所述的方法测定的标准氧化还原电位的值为硝酰自由基形式和氧代铵形式之间的值。

[0037] 此处,本方式的化合物中,对于(a)TEMPO、(b)AZADO、(c)1-甲基AZADO和(d)1,3-二甲基AZADO这4种化合物,通过使用了所述循环伏安法的方法,测定硝酰自由基形式和氧代铵形式之间的标准氧化还原电位(E^0@25℃)而得到的循环伏安图如图1所示。如图1表示那样,这些化合物的E^0的值分别为(d)136mV<(c)186mV<(b)236mV<(a)294mV。需要说明的是,对于图1表示的循环伏安图可知,即使重复100循环以上的测定也能稳定地保持,因此本方式的化合物作为氧化剂而具有非常高的耐久性。

[0038] 从针对微生物的灭活活性的观点出发,本方式的化合物优选其硝酰自由基形式如下述化合物式1所示。

[0039] [化学式2]

[0040] [化合物式1]

[0041] 

[0042] 化合物式1中,R_1～R_4、Y_1和Y_2分别独立,并为氢原子或任选进行了取代的一价的有机基团。此处,作为一价的有机基团,没有特别限定,例如,可举出取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基等。需要说明的是,R_1～R_4、Y_1和Y_2可以相同或不同。

[0043] 作为一价的有机基团的烷基、烯基和炔基分别可以是直链状、支链状或环状中的任一种,优选为直链状。烷基的碳原子数没有特别限定,优选为1以上且20以下,更优选为1以上且10以下,进一步优选为1以上且4以下。烯基、炔基的碳原子数没有特别限定,分别优选为2以上且20以下,更优选为2以上且10以下,进一步优选为2以上且4以下。

[0044] 作为一价的有机基团的芳基为来源于作为一部分或整体而具有芳香性的烃环的基团。芳基包含2个以上的、作为一部分或整体而具有芳香性的烃环的情况下,这些环可以彼此以单键键合或稠合。此外,芳基包含2个以上的、作为一部分或整体而具有芳香性的烃环的情况下,一个原子可以兼作任意两个这些环的成环原子而形成螺环。芳基的碳原子数没有特别限定,优选为6以上且30以下。芳基的碳原子数更优选为6以上且12以下,进一步优选为6。特别是,芳基优选为由成环原子数6以上的芳香族烃环衍生得到的一价的基团。

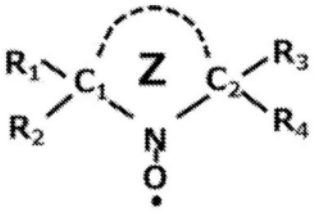
[0045] 作为一价的有机基团的杂芳基为来源于作为一部分或整体而具有芳香性的杂环的基团。杂芳基包含2个以上的、作为一部分或整体而具有芳香性的杂环的情况下,这些环的一部分或全部可以彼此以单键键合。杂芳基包含2个以上的、作为一部分或整体而具有芳香性的杂环或其他环的情况下,这些环可以彼此稠合。此外,杂芳基包含2个以上的、作为一部分或整体而具有芳香性的杂环或其他环的情况下,一个原子可以兼作这些环的成环原子。作为杂芳基具有的杂原子没有特别限定,例如,作为成环原子,可举出1个以上的杂原子(例如,氮原子(N)、氧原子(O)、磷原子(P)、硫原子(S)、硅原子(Si)、硒原子(Se)、锗原子(Ge))等。杂芳基的碳原子数优选为3以上且30以下。此外,杂芳基的成环原子数没有特别限定,优选为5以上且30以下。此外,杂芳基的成环原子数更优选为5以上且14以下,进一步优选为5以上且13以下。杂芳基的杂原子数没有特别限定,优选为1以上且3以下。此外,杂芳基的杂原子数更优选为1以上且2以下,进一步优选为1。特别是,优选杂芳基为由成环原子数5以上的芳香族杂环衍生得到的一价的基团。

[0046] 作为一价的有机基团的烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基分别可以为进行了取代的基团。作为取代基没有特别限定,例如,可举出烷基、烷氧基、烯基、炔基、卤素原子、羟基、羧基、氰基、氨基、氨基甲酰基等。其中,作为取代基,优选为烷基或卤素原子,更优选为甲基、乙基或氟原子。并且,作为取代基,进一步优选为甲基或氟原子。需要说明的是,所述取代基不会取代同种基团。例如,取代烷基的取代基中不包含烷基。

[0047] 此外,在化合物式1中,从优异的抗微生物活性这样的观点出发,优选Y_1和Y_2彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮单环,并且R_1和R_3彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮双环,或者构成所述含氮双环的两个环进一步交联,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮三环。即,本方式的优选的实施方式中,本方式的化合物的硝酰自由基形式如下述化合物式2所示。

[0048] [化学式3]

[0049] [化合物式2]

[0050] 

[0051] 在化合物式2中,R_1~R_4分别独立,并为氢原子或任选进行了取代的一价的有机基团,Z为任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮单环,此时,进一步任选R_1和R_3彼此键合,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮双环,或者构成所述含氮双环的两个环进一步交联,并形成任选进行了取代的含5元环或6元环的含氮三环。

[0052] 作为Z的含氮单环,例如,可举出四氢吡咯环、哌啶环、吗啉环、吡咯啉环等脂肪族杂环、吡咯环、咪唑环等芳香族杂环。此外,作为由R_1和R_3彼此进一步键合而形成的含氮双环,例如,可举出9-氮杂双环[3.3.1]壬烷环、9-氮杂-3-氧杂双环[3.3.1]壬烷环。并且,作为由构成所述含氮双环的两个环进一步交联而形成的含氮三环,例如,可举出2-氮杂金刚烷环、2,6-二氮杂金刚烷环、6-氮杂-2-氧杂金刚烷环、9-氮杂-6-降金刚烷环。其中,从优异的针对微生物的灭活活性这样的观点出发,本方式的化合物优选具有含氮单环、含氮双环或含氮三环,更优选具有含氮单环或含氮三环,特别优选具有含氮三环。此外,本方式的化合物优选具有作为含氮单环的脂肪族杂环或作为含氮三环的2-氮杂金刚烷环或9-氮杂-6-降金刚烷环,更优选具有作为含氮单环的哌啶环或作为含氮三环的2-氮杂金刚烷环。

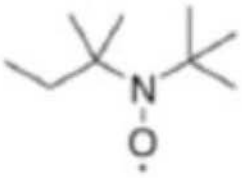
[0053] 化合物式2中形成的含氮单环或化合物式2中可形成的含氮双环或含氮三环为任选进行了取代的环结构。作为可对这些环结构进行取代的取代基没有特别限定,例如,可举出烷基、烷氧基、烯基、炔基、卤素原子、羟基、羧基、羰基、氰基、氨基、氨基甲酰基、甲苯磺酰基、(卤化)酰基氨基、磷酸基等。其中,作为取代基,更优选为甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、氟原子、羟基、羧基或甲苯磺酰基。

[0054] 此处,在本方式的化合物不包含所述环结构或包含含氮单环的情况下,R_1～R_4分别独立,优选为氢原子或任选进行了取代的烷基,更优选为氢原子或未取代的烷基,进一步优选为氢原子或碳原子数1～4的烷基,特别优选为氢原子、甲基或乙基。此外,从抗微生物活性的观点出发,在本方式的化合物包含所述含氮双环或含氮三环的情况下,R_2和R_4分别独立,优选为氢原子或任选进行了取代的烷基,更优选为氢原子或未取代的烷基,进一步优选为氢原子或碳原子数1～4的烷基,特别优选为氢原子、甲基或乙基。

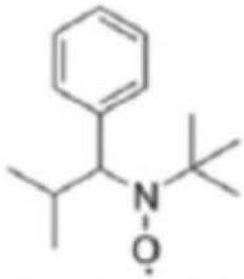
[0055] 举出本方式的化合物的一个实例时,如下所示(以硝酰自由基形式表示)。需要说明的是,对于某些化合物,一并记载所述硝酰自由基形式和氧代铵形式之间的标准氧化还原电位(E^0@25℃)的值。鉴于本方式的化合物表现出优异的抗微生物活性的机理,可以说如下所示的化合物均表现出较高的抗微生物活性。

[0056] [化学式4-1]

(不具有含氮环结构的化合物)

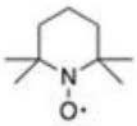


叔戊-叔丁基硝基氧

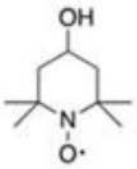


2,2,5-三甲基-4-苯基-3-氮杂己烷-3-硝基氧

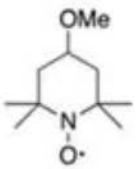
(具有含氮单环的化合物)



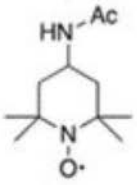
TEMPO
(+294mV)



4-羟基TEMPO
(+345mV)

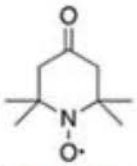


4-甲氧基TEMPO
(+354mV)

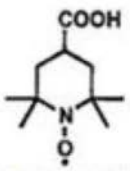


4-乙酰氨基TEMPO

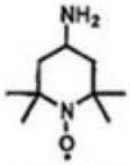
[0057]



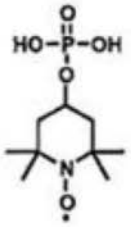
4-氧代TEMPO
(+474mV)



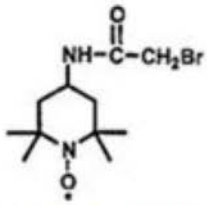
4-羧基TEMPO



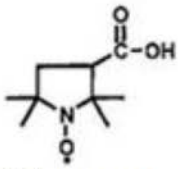
4-氨基TEMPO



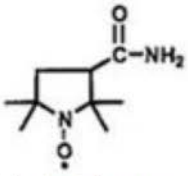
4-膦酰基TEMPO



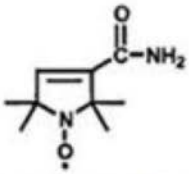
4-(2-溴乙酰胺)TEMPO



3-羧基PROXYL
(+435mV)



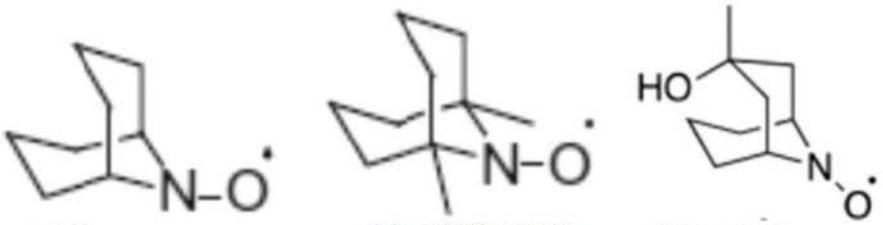
3-氨基甲酰基PROXYL
(+430mV)



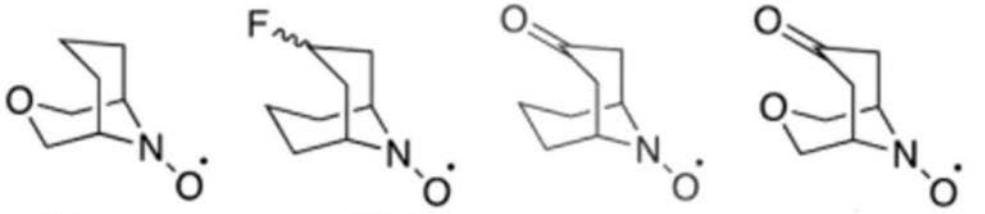
3-氨基甲酰基-2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-基氧基
(+510mV)

[0058] [化学式4-2]

(具有含氮双环的化合物)



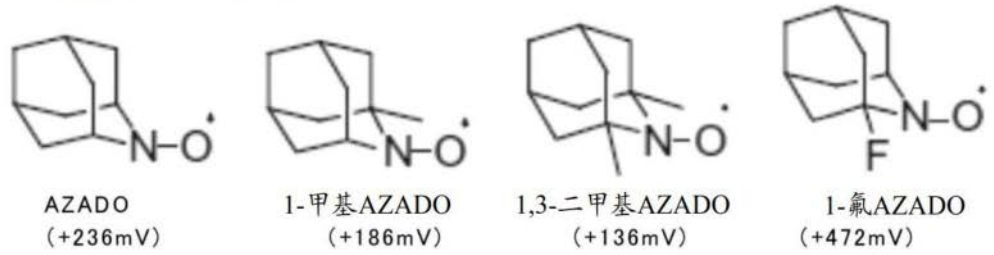
ABNO (+252mV)　1,3-二甲基ABNO (+152mV)　'HO-ABNO



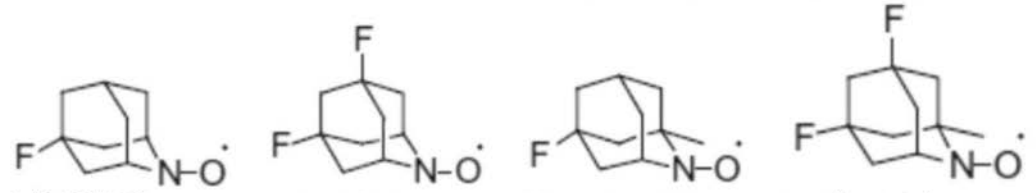
氧杂-ABNO　氟-ABNO　酮-ABNO　氧杂-酮-ABNO

(具有含氮三环的化合物)

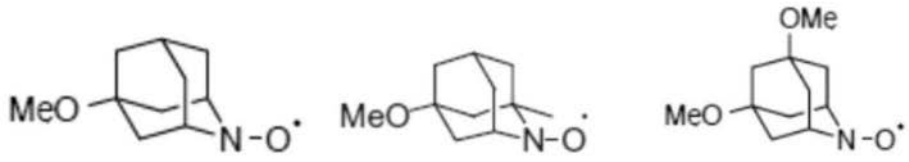
[0059]



AZADO (+236mV)　1-甲基AZADO (+186mV)　1,3-二甲基AZADO (+136mV)　1-氟AZADO (+472mV)

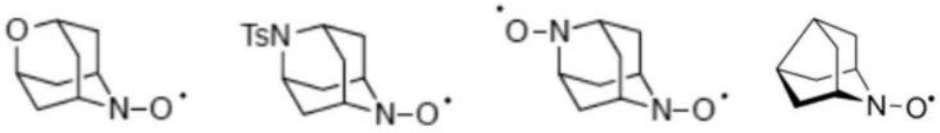


5-氟AZADO (+413mV)　5,7-二氟AZADO (+534mV)　5-氟-1-甲基AZADO　5,7-二氟-1-甲基AZADO



5-甲氧基AZADO (+342mV)　5-甲氧基-1-甲基AZADO (+294mV)　5,7-二甲氧基AZADO (+437mV)

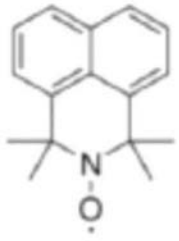
[0060] [化学式4-3]



氧杂-AZADO (+358mV)　TsN-AZADO (+422mV)　二AZADO (+437mV, +793mV)　Nor-AZADO (+262mV)

(具有其他环的化合物)

[0061]



TMAO

[0062] 鉴于所述E^0的值,将杂原子导入构成化合物的骨架的TEMPO、ABNO、AZADO等结构时,本方式的化合物的氧化还原特性向高电位侧偏移。由此认为,作为分别对应的氧代铵形式的电位的氧化能力提高。

[0063] 所述化合物之中,从抗微生物活性的观点出发,优选为TEMPO、4-羟基TEMPO、4-甲氧基TEMPO、4-乙酰氨基TEMPO、4-氧代TEMPO、4-羧基TEMPO、4-氨基TEMPO、4-膦酰基TEMPO、4-(2-溴乙酰胺)TEMPO、AZADO、1-甲基AZADO、1,3-二甲基AZADO、1-氟AZADO、5-氟AZADO、5,7-二氟AZADO、5-氟-1-甲基AZADO、5,7-二氟-1-甲基AZADO、5-甲氧基AZADO、5-甲氧基-1-甲基AZADO、5,7-二甲氧基AZADO、氧杂-AZADO、TsN-AZADO、二AZADO或Nor-AZADO,更优选为AZADO、1-甲基AZADO、1,3-二甲基AZADO、1-氟AZADO、5-氟AZADO、5,7-二氟AZADO、5-氟-1-甲基AZADO、5,7-二氟-1-甲基AZADO、5-甲氧基AZADO、5-甲氧基-1-甲基AZADO、5,7-二甲氧基AZADO、氧杂-AZADO、TsN-AZADO、二AZADO、Nor-AZADO、TEMPO或4-乙酰氨基TEMPO,进一步优选为AZADO、1-甲基AZADO、1,3-二甲基AZADO、1-氟AZADO、5-氟AZADO、5,7-二氟AZADO、5-氟-1-甲基AZADO、5,7-二氟-1-甲基AZADO、5-甲氧基AZADO、5-甲氧基-1-甲基AZADO、5,7-二甲氧基AZADO、TEMPO或4-乙酰氨基TEMPO,特别优选为2-氮杂金刚烷-N-氧基(AZADO)、2,2,6,6-四甲基哌啶-N-氧基(TEMPO)或4-乙酰氨基TEMPO。

[0064] <助催化剂>

[0065] 就本方式的灭活方法而言,从抗微生物活性的观点出发,优选在包含过渡金属的助催化剂的存在下,使本方式的化合物与对象接触。此处,本方式的助催化剂包含过渡金属的离子(即,包含过渡金属的盐),或包含过渡金属的单体。作为本方式的助催化剂中可包含的过渡金属,是分类为元素周期表的第3族元素至第12族元素的金属元素即可,没有特别限定。其中,从优异的抗微生物活性这样的观点出发,过渡金属优选包含选自Ag、Au、Pt、Pd、Ni、Mn、Fe、Ti、Al、Zn和Cu中的1种或2种以上,更优选包含其离子(盐)。此外,过渡金属进一步优选包含Ag或Cu,特别优选包含Ag或Cu的离子(盐),最优选包含Ag离子或2价的Cu离子(Cu(II)离子)。

[0066] 助催化剂包含过渡金属的离子(盐)的情况下,所述离子的抗衡阴离子没有特别限定。作为助催化剂的包含过渡金属的盐,例如,可举出硫酸盐、亚硫酸盐、次硫酸盐、过硫酸盐、硫代硫酸盐、碳酸盐、磷酸盐、焦磷酸、盐酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、卤化物(例如,氟化物、

氯化物、溴化物、碘化物)、三氟甲磺酸盐等。

[0067] 在本方式的灭活方法中在助催化剂并存的情况下,对于所述化合物和所述过渡金属的使用量没有特别限定,从优异的微生物的灭活活性这样的观点出发,这些成分的使用量的摩尔比例优选为1:2～4:1(化合物:过渡金属),更优选为2:3～3:2。

[0068] <对象>

[0069] 本方式的菌或病毒的灭活方法包含:使本方式的化合物与存在被菌或病毒污染的风险的对象接触。即,根据本发明的其他方式,还提供包含所述化合物的菌或病毒的灭活剂。就使用了本方式的化合物、灭活剂的微生物的灭活而言,对于存在被菌或病毒污染的风险的对象,例如,厨房(厨房地板、墙壁等厨房空间等)、水槽、冰箱等处理食品的位置、刀、锅等烹饪器具、盘子等餐具类、冰箱、卫生间、浴室、盥洗室、客厅、寝室等居住空间、沙发、靠垫、床上用品、窗帘等纤维制品等,可以通过与这些接触而使用。此处,对于作为灭活的对象的菌、病毒没有特别限定,表现出针对各种细菌、真菌和病毒的灭活作用。作为细菌,例如,可举出大肠杆菌等埃希氏菌属;铜绿假单胞菌等假单胞菌;猪霍乱沙门氏菌等沙门氏菌属;卡他莫拉菌等莫拉菌属;嗜肺军团菌等军团菌属等革兰氏阴性菌、金黄色葡萄球菌等葡萄球菌属;肉毒杆菌、产气荚膜梭菌等梭菌属等革兰氏阳性菌等。作为霉菌类,例如,可举出黑曲霉属、帚状曲霉等曲霉属;宛氏拟青霉(Paecilomyces variotii)等拟青霉属;嗜松青霉(Penicillium pinophilum)、桔青霉(Penicillium citrinum)等青霉属;绿木霉(Trichoderma virens)等木霉属;球毛壳(Chaetomium globosum)等毛壳属;高渗散囊菌(Eurotium tonophilum)等散囊菌属;米根霉(Rhizopusoryzae)等根霉属;芽枝状枝孢(Cladosporium cladosporioides)等枝孢属;出芽短梗霉菌(Aureobasidium pullulans)等短梗霉属;疣孢漆斑菌(Myrothecium verrucaria)等漆斑菌属等。此外,作为霉菌类以外的真菌,例如可举出酿酒酵母等酵母属、白色念珠菌等念珠菌属、深红酵母等红酵母属等。此外,作为病毒,可以为包膜病毒,也可以为无包膜病毒。作为包膜病毒,可举出冠状病毒(包含SARS-CoV-2)、流感病毒、疱疹病毒、风疹病毒等。作为无包膜病毒,可举出诺如病毒、轮状病毒等。作为对象的病毒优选为包膜病毒,更优选为冠状病毒,特别优选为SARS-CoV-2。其中,在可以有效地抑制病毒向人的细胞的侵入这样的方面,本方式的灭活方法优选通过对构成病毒的刺突蛋白造成氧化性损伤而灭活所述病毒。此外,其他优选的实施方式中,灭活的对象为菌,作为所述菌,可举出细菌或真菌。

[0070] 此外,接触没有特别限定,可举出将本方式的化合物或包含它的组合物(例如,液体组合物)向所述对象直接喷雾或填充至触发器、喷雾器等喷雾装置而喷雾的方式。通过这样的构成,可以使本方式的化合物分布在较大范围内。本方式的化合物与对象的接触时间没有限定,例如可举出优选放置5秒以上,更优选为1分钟以上,进一步优选为30分钟以上。对于接触时间的上限没有特别限定,优选为24小时以下,更优选为12小时以下,进一步优选为6小时以下。此外,本方式的化合物与对象接触时的使用方式没有特别限定。例如,可以为液态、凝胶状或糊状。需要说明的是,在溶液中进行所述的接触的情况下,可以根据溶液的颜色变化监测氧化反应(例如,蛋白质的变性)的进行。

[0071] 在液态的情况下,特别是可以用作喷雾剂、洗剂等。例如,可举出可以填充至触发式喷雾容器(直压或蓄压型)、分配器式泵喷雾容器等公知的喷雾容器,并调节喷雾量,以向存在或认为存在菌或病毒的位置进行喷雾的方式进行的液体等。

[0072] <<抗菌或抗病毒性基材>>

[0073] 此外,根据本发明的其他方式,提供一种所述本发明的一种方式的灭活剂和根据需要的助催化剂担载或涂布至基础基材而成的抗菌或抗病毒性基材。可以通过这样的抗微生物性的基材,将所述灭活剂简便地用于各种用途。

[0074] 作为构成抗微生物性的基材的基础基材,作为价格较低且可容易地担载/涂布灭活剂的材料,例如,可举出梭织布、无纺布、过滤器或氨基甲酸酯泡沫等。对于将所述化合物和根据需要的助催化剂担载或涂布至这些基础基材的方法没有特别限定。此处,对于所述方式的基材,作为优异的抗微生物活性的指标,基于JIS L 1922:2016(纤维制品的抗病毒性试验方法)而测定得到的针对流感病毒或猫杯状病毒的抗病毒活性值(Mv)优选为2.0以上,更优选为2.2以上,进一步优选为2.5以上。并且,这样的抗微生物性的基材可以适宜用于例如口罩、医疗用纤维制品、空调机、空气净化器、冷冻机、调温机、除湿机、加湿机或吸尘器用过滤器等用途。当然也可以用于其他用途。

[0075] 需要说明的是,以下实施方式也包含于本发明的范围中:具有权利要求2的特征的权利要求1所述的灭活方法;具有权利要求3的特征的权利要求1所述的灭活方法;具有权利要求4的特征的权利要求1~3中任一项所述的灭活方法;具有权利要求5的特征的权利要求1~4中任一项所述的灭活方法;具有权利要求6的特征的权利要求1~5中任一项所述的灭活方法;具有权利要求7的特征的权利要求5或6所述的灭活方法;具有权利要求8的特征的权利要求1~7中任一项所述的灭活方法;具有权利要求9的特征的权利要求1~8中任一项所述的灭活方法;具有权利要求10的特征的权利要求1~9中任一项所述的灭活方法;具有权利要求11的特征的权利要求10所述的灭活方法;具有权利要求12的特征的权利要求1~11中任一项所述的灭活方法;具有权利要求14的特征的权利要求13所述的灭活剂;使用了权利要求13或14所述的灭活剂的权利要求15所述的基材;具有权利要求16的特征的权利要求15所述的基材;具有权利要求17的特征的权利要求15或16所述的基材;具有权利要求18的特征的权利要求15~17中任一项所述的基材;具有权利要求19的特征的权利要求15~18中任一项所述的基材。

[0076] 实施例

[0077] 下文中,使用实施例并对本发明的实施方式详细地进行说明,本发明的技术的范围没有仅限定于以下实施例。

[0078] <<病毒的稀释倍数的研究>>

[0079] 首先,以研究猫冠状病毒(FCov(VR-989))对猫肾脏来源永生化细胞(CRFK)的存活率(Viability)的影响为目的,对于病毒的稀释倍数的条件进行了研究。

[0080] 具体而言,首先,制备将感染了FCoV的CRFK细胞培养了3天后的培养上清用PBS稀释20倍而得到的上清,将其作为FCoV溶液的原液。此外,将所述原液用PBS以每10倍的方式直至稀释10^{10}倍而进行阶段稀释,制备得到各稀释倍数的FCoV溶液。

[0081] 另一方面,将使用含10%(v/v)FBS的DMEM培养基进行了悬浮的CRFK细胞以每100μL/孔接种至96孔板,并使其为1×10^{4}细胞/孔,培养了4天。在培养4天后用含2%(v/v)FBS的DMEM培养基以100μL/孔的方式更换培养基,将上述制备得到的各稀释倍数的FCoV溶液以100μL/孔的方式进行追加后,进而培养了24小时。然后,将培养基更换为含2%(v/v)FBS的DMEM培养基200μL/孔,进而培养了2天或3天。并且,对于所述培养后的细胞,评价了细胞病

变效应(Cytopahic Effect;CPE)。对于细胞病变效应(CPE),使用光学显微镜观察各孔,将50％以上的细胞病变的孔评价为CPE阳性。所述CPE的评价结果,对于2天或3天培养后的任一种情况,直至稀释10^5倍为止都确认到依赖于稀释倍数的细胞存活率的变化。参考所述结果,确定了以下实验中采用的病毒的添加量。

[0082] <<AZADO的抗病毒效果的确认(WST-8法)>>

[0083] 以确认作为硝酰自由基的1种的AZADO是否表现出抗病毒效果为目的,进行以下实验,通过WST-8法评价抗病毒效果。

[0084] 具体而言,首先,制备将感染了FCoV的CRFK细胞培养了3天后的培养上清用PBS稀释20倍而得到的上清,将其作为FCoV溶液的原液。此外,制备得到:将所述原液用PBS以每2倍的方式直至稀释160倍而进行阶段稀释的各稀释倍数的FCov溶液。并且,向各阶段稀释后的FCoV溶液中以使其最终浓度成为100mM的方式添加AZADO的氧代铵形式(抗衡阴离子为硝酸根离子;AZADO-Oxo)或硝酸银(比较例),在室温下孵育2小时,制备得到样品溶液。

[0085] 另一方面,将使用含10％(v/v)FBS的DMEM培养基进行了悬浮的CRFK细胞以每100μL/孔接种至96孔板,并使其为1×10^4细胞/孔,培养了4天。在培养4天后用含2％(v/v)FBS的DMEM培养基以100μL/孔的方式更换培养基,将各样品溶液以100μL/孔的方式进行追加后,培养了2天。然后,通过WST-8法,测定各样品中的细胞存活率。需要说明的是,WST-8法是一种利用某种四唑盐(WST-8)通过活细胞的细胞内的电子载体进行还原而生成高水溶性的橙色的甲瓒色素从而评价活细胞的存在的方法。结果如图2所示。如图2表示那样,通过添加AZADO-Oxo,观察到因病毒添加而降低的细胞存活率的恢复。与之相对,比较例(添加硝酸银)中未观察到这样的现象。由这些结果表示,AZADO-Oxo发挥优异的抗病毒效果。

[0086] <<AZADO的抗病毒效果的确认(CPE法;37℃孵育)>>

[0087] 以确认作为硝酰自由基的1种的AZADO是否表现出抗病毒效果为目的,进行以下实验,通过CPE法评价了抗病毒效果。

[0088] 具体而言,首先,制备将感染了FCoV的CRFK细胞培养了3天后的培养上清用PBS稀释20倍而得到的上清,将其作为FCoV溶液的原液。此外,制备得到:将所述原液用PBS以每10倍的方式直至稀释10^5倍而进行阶段稀释的各稀释倍数的FCov溶液。并且,向各阶段稀释后的FCoV溶液中以使得最终浓度成为2mM的方式添加AZADO-Oxo,在37℃下孵育2小时,进而用PBS稀释20倍而制备得到样品溶液。需要说明的是,也制备得到未添加AZADO-Oxo的比较例的样品溶液。

[0089] 另一方面,将使用含10％(v/v)FBS的DMEM培养基进行了悬浮的CRFK细胞以每100μL/孔接种至96孔板,并使其为1×10^4细胞/孔,培养了4天。在培养4天后用含2％(v/v)FBS的DMEM培养基以100μL/孔的方式更换培养基,将上述制备得到的各样品溶液以100μL/孔的方式进行追加后,进而培养了24小时。接着,将培养基与含2％(v/v)FBS的DMEM培养基以200μL/孔的方式更换,进而培养了2天。并且,对于所述培养后的细胞,通过与上述相同的方法评价了细胞病变效应(CPE)。结果如下表1所示。需要说明的是,表1所述的“$TCID_{50}$”是指,50％组织培养细胞感染率(Tissue Culture Infectious Dose)的缩写,是宿主细胞中的50％因病毒感染而死亡的病毒量。

[0090] [表1]

[0091]

病毒量(相对值)	添加AZADO-Oxo			未添加AZADO-Oxo		
	总孔数	CPE阳性孔数	阳性率[%]	总孔数	CPE阳性孔数	阳性率[%]
1	7	0	0	7	7	100
10^{-1}	8	0	0	8	8	100
10^{-2}	8	0	0	8	4	50
10^{-3}	8	0	0	8	2	25
10^{-4}	8	0	0	8	0	0
10^{-5}	7	0	0	7	0	0
$TCID_{50}$	253			142262		
$logTCID_{50}$	2.4			5.2		

[0092] 如表1表示那样,确认了AZADO-Oxo表现出优异的抗病毒活性。此外,作为抗病毒活性的指标的$\Delta logTCID_{50}$的值为2.8(=5.2-2.4),所述值是指,AZADO-Oxo将病毒量降低至$1/10^{2.8}$(=约1/1000)。因此,此处确认了AZADO-Oxo表现出充分的抗病毒活性。

[0093] <<AZADO的抗病毒效果的确认(CPE法;25℃孵育)>>

[0094] 以符合JIS L 1922:2016(纤维制品的抗病毒性试验方法)的条件为目的,除了将孵育时的温度从37℃变更为25℃,并且将样品溶液的添加、培养基更换后的培养天数从2天变更为3天以外,通过与上述相同的方法,评价了基于CPE法的抗病毒效果。结果如下表2所示。

[0095] [表2]

[0096]

病毒量(相对值)	添加AZADO-Oxo			未添加AZADO-Oxo		
	总孔数	CPE阳性孔数	阳性率[%]	总孔数	CPE阳性孔数	阳性率[%]
1	7	0	0	7	7	100
10^{-1}	8	0	0	8	8	100
10^{-2}	8	0	0	8	5	62.5
10^{-3}	8	0	0	8	1	12.5
10^{-4}	8	0	0	8	0	0
10^{-5}	7	0	0	7	0	0
$TCID_{50}$	253			142262		
$logTCID_{50}$	2.4			5.2		

[0097] 由表2表示的结果确认了,在25℃下进行孵育的本实验体系中,AZADO-Oxo表现出充分的抗病毒活性。

[0098] 此外,本实验中,从添加AZADO-Oxo的添加(病毒+AZADO-Oxo)或未添加(有病毒)的样品溶液起48小时后使用显微镜观察孔,将得到的照片与未添加病毒的细胞(无病毒)的照片一并表示在图3中。如图3表示那样,通过病毒的添加而细胞的形态变化为圆形,通过AZADO-Oxo的添加而抑制所述形态变化,这也显示AZADO-Oxo的抗病毒效果。

[0099] 此外,本实验中,对于样品溶液的添加、培养基更换后经过3天培养的细胞,使用WST-8法而测定细胞存活率。结果如图4所示。如图4表示那样,通过病毒的添加而细胞存活率降低至约50%,通过(FCoV)、AZADO-Oxo的添加(FCoV+AZADO-Oxo),细胞存活率恢复至与空白(Non virus(无病毒))同等。

[0100] <<AZADO对SARS-Cov-2的抗病毒效果的确认>>

[0101] 本实验中,确认了AZADO-Oxo是否针对现在流行的SARS-Cov-2而表现出抗病毒活

性。此处,SARS-CoV-2通过使存在于病毒粒子的表面的刺突蛋白与作为人细胞表面的感染受体的ACE2进行结合从而侵入人细胞内。因此,确认了AZADO-Oxo是否通过氧化刺突蛋白而使其变性,从而阻碍刺突蛋白与ACE2的结合而表现出抗病毒活性。在本实验中使用的病毒刺突蛋白(野生株和奥密克戎株这2种)、细胞、检测用荧光标记抗体如下:

[0102] • 刺突蛋白(野生株):SARS-CoV-2Spike Protein(RBD)(aa319-541),His Tag Recombinant Protein(Thermo,RP-87678)(下文中也记为"S-RBD-His(WT)")

[0103] • 刺突蛋白(奥密克戎株):SARS-CoV-2B.1.1.529(Omicron)Spike RBD Protein(His Tag)(Sino Biological,40592-V08H121)(下文中也记为"S-RBD-His(Omicron)")

[0104] • 细胞:ACE2表达HEK293T(下文中也记为"ACE2-HEK293T")

[0105] • 荧光标记抗体:6x-His Tag Monoclonal Antibody(AD1.1.10),FITC(Thermo,MA1-81891)(下文中也记为"FITC-anti-6xHis-Tag antibody")。

[0106] 在本实验中,首先,S-RBD-His(WT)或S-RBD-His(Omicron)的1μg(对于WT为2μL的0.5mg/mL浓度的水溶液,对于Omicron为4μL的0.25mg/mL浓度的水溶液)分别与最终浓度10μM、100μM或1000μM的AZADO-Oxo进行混合,在25℃下实施30分钟氧化处理而制备得到样品溶液。此外,不添加AZADO-Oxo而制备得到比较例的样品溶液。接着,在包含100μL的含1%BSA的PBS的微管中,以使其为5×10^5细胞/mL的方式悬浮ACE2-HEK293T。然后,添加4μL的上述制备得到的样品溶液,在4℃下静置30分钟,进行了刺突蛋白与ACE2-HEK293T细胞表面的ACE2受体的结合反应。

[0107] 向所述的反应后的细胞悬浮液中添加含1%BSA的PBS 800μL,在4℃下以4分钟、400×g进行了离心分离。弃去上清后,添加含1%BSA的PBS100μL而再悬浮。因此,添加FITC-anti-6xHis-Tag antibody 1μg(10μL),在4℃下遮光静置30分钟。然后,进一步添加含1%BSA的PBS1mL,在4℃下以4分钟、400×g进行了离心分离。弃去上清后,添加含1%BSA的PBS 300μL而再悬浮。通过流式细胞技术对由此得到的溶液进行评价。需要说明的是,使用未表达ACE2的HEK293T而进行本实验时,其结果S-RBD-His的结合量显著减少,因此判断为能够检测ACE2特异性结合。对于野生株(S-RBD-His(WT))的结果如图5(a)所示,对于奥密克戎株(S-RBD-His(Omicron))的结果如图5(b)所示。此处,刺突蛋白与ACE2的结合量越少(即,越通过AZADO-Oxo阻碍这些结合),峰越向荧光强度较小一侧(图的左侧)偏移。

[0108] 由图5表示的结果,在不存在AZADO-Oxo的情况(S)下峰较大地向右偏移(表示与ACE2的结合量较多)。此外,确认了所述向右偏移的峰依赖于AZADO-Oxo的添加量而向左偏移(添加量越多,越大地向左偏移)。需要说明的是,与野生株相比,在奥密克戎株中,基于AZADO-Oxo的添加的峰向左偏移更缓慢,判断为针对奥密克戎株也得到一定的灭活效果。

[0109] <<针对SARS-Cov-2的化合物之间的抗病毒效果的比较>>

[0110] 以比较化合物之间的抗病毒效果为目的,使用AZADO的氧代铵形式(抗衡阴离子为BF_4^-离子;$AZADO^+BF_4^-$)、TEMPO的氧代铵形式(抗衡阴离子为BF_4^-离子;$TEMPO^+BF_4^-$)和4-乙酰氨基TEMPO的氧代铵形式(抗衡阴离子为BF_4^-离子;4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$),通过与上述同样的方法而确认了抗病毒效果。

[0111] 具体而言,首先,将S-RBD-His(WT)1μg(0.5mg/mL浓度的水溶液2μL)与最终浓度10μM、100μM或1000μM的$AZADO^+BF_4^-$、$TEMPO^+BF_4^-$或4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$进行混合,在25℃下实施30分钟氧化处理而制备得到样品溶液。此外,不添加所述化合物而制备得到比较例的样品

溶液。接着,在包含100μL的含1%BSA的PBS(含有2mM EDTA)的微管中,以使其为1×10^6细胞/mL的方式悬浮ACE2-HEK293T。然后,添加上述制备得到的样品溶液4μL,在4℃下静置30分钟,进行了刺突蛋白与ACE2-HEK293T细胞表面的ACE2受体的结合反应。

[0112] 向所述的反应后的细胞悬浮液中添加含1%BSA的PBS(含有2mM EDTA)800μL,在4℃下以4分钟、400×g进行了离心分离。弃去上清后,添加含1%BSA的PBS(含有2mM EDTA)100μL而再悬浮。因此,添加FITC-anti-6xHis-Tag antibody 1μg(10μL),在4℃下遮光静置30分钟。然后,进一步添加含1%BSA的PBS(含有2mM EDTA)1mL,在4℃下以4分钟、400×g进行了离心分离。弃去上清后,添加含1%BSA的PBS(含有2mM EDTA)300μL而再悬浮。通过流式细胞技术对由此得到的溶液进行评价。对于$AZADO^+BF_4^-$的结果(AZADO-Oxo)如图6(a)所示(S为刺突蛋白,A为化合物),对于$TEMPO^+BF_4^-$的结果(TEMPO-Oxo)如图6(b)所示(S为刺突蛋白,T为化合物),对于4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$的结果(Ac-TEMPO-Oxo)如图6(c)所示(S为刺突蛋白,AcT为化合物)。此外,将图6表示的各峰中的荧光强度的平均值(Mean Fluorescence Intensity)进行图表化而得到的结果如图7所示。

[0113] 根据图6表示的结果,在不存在AZADO-Oxo的情况(S)下峰较大地向右偏移。此外,所述向右偏移的峰依赖于化合物的添加量而向左偏移。需要说明的是,比较化合物之间的活性时,$AZADO^+BF_4^-$和4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$的活性大致相同程度地强,$TEMPO^+BF_4^-$的活性相较略弱。此外,如图7的MFI的图表也显示出同样的结果。

[0114] 此外,对于所述的实验中表现出较高的抗病毒效果的$AZADO^+BF_4^-$和4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$(最终浓度10μM),将添加至S-RBD-His(WT)时的处理时间从30分钟延长至6小时并进行同样的操作。由此得到的MFI的图表如图8所示。如图8表示那样,通过延长处理时间,$AZADO^+BF_4^-$和4-AcNH-$TEMPO^+BF_4^-$表现出更高的抗病毒活性。

[0115] 由以上表示的结果显示出,根据本发明,可以提供一种将对环境的负担抑制为最小限度,同时不以光的存在为前提而可以对微生物发挥灭活效果的廉价的手段。

[0116] <<针对卵白蛋白(OVA)的AZADO的分解活性的评价>>

[0117] (催化剂担载体(AZADO/DB)的制备例)

[0118] 通过以下方法,制备得到AZADO担载于催化剂载体(碳载体)而成的催化剂担载体。

[0119] 将AZADO 5mg(0.13mmol)和二氯甲烷100mL添加至300mL茄形烧瓶并用超声波溶解AZADO,添加作为碳载体的DENKA BLACK(注册商标)(Denka Black,DB)100mg并用超声波分散30分钟后,在室温下搅拌30分钟。然后,使用旋蒸仪在40℃、600hPa下蒸发干固,进一步真空干燥10小时,从而得到催化剂担载体(AZADO/DB)。

[0120] (催化剂担载体(AZADO-Cu(bpy)/DB)的制备例)

[0121] 将$Cu(OTf)_2$ 0.03mmol(10.9mg)、bpy 0.03mmol(4.7mg)和AZADO 0.03mmol(4.6mg)分别添加至5mL的小瓶而溶解于3mL的乙腈,并添加至添加有乙腈90mL的300mL茄形烧瓶。添加了各试剂后,用乙腈清洗小瓶壁面并将此添加至烧瓶。接着,将作为碳载体的DENKA BLACK(DB)100mg添加至烧瓶并用超声波分散30分钟后,在室温下搅拌30分钟。然后,通过使用旋蒸仪在60℃、250hPa下蒸发干固,进一步真空干燥10小时,从而得到同时担载有AZADO和助催化剂的催化剂担载体(AZADO-Cu(bpy)/DB)。需要说明的是,通过不使用AZADO而进行相同方法,制备得到仅担载有助催化剂的催化剂担载体(Cu(bpy)/DB)。

[0122] (基于催化剂担载体的卵白蛋白(OVA)的处理(1))

[0123] 将上述制备得到的AZADO/DB、AZADO-Cu(bpy)/DB、Cu(bpy)/DB和DENKA BLACK(DB)各1mg称量至微管,分别与10mg/mL卵白蛋白(OVA)水溶液20μL和纯水980μL进行混合而制备得到样品。此外,代替催化剂担载体,使用AZADO-Oxo的水溶液(浓度100mM)3μL而同样地制备得到样品(纯水的量为977μL)。需要说明的是,仅将OVA与纯水混合而制备得到对照样品。

[0124] 将各样品在室温下静置24小时后,在室温下以3分钟、15000×g进行了离心分离。接着,将各样品的上清各80μL移至另一管,添加5×样品缓冲液(SB)20μL。然后,在95℃下静置5分钟,与分子量标志物一起进行电泳,进行了CBB染色。结果如图9所示。如图9表示那样,使用AZADO-Oxo处理得到的样品(图9的“OVA+AZADO-Oxo”)中,OVA的条带大致消失。由此,证实了上述确认的AZADO-Oxo的抗病毒活性是通过作用于病毒的刺突蛋白并将其氧化从而分解。此外,在将AZADO与助催化剂一起担载于催化剂载体并对OVA进行了处理的样品(图9的“OVA+AZADO-Cu(bpy)/DB”)中,OVA的条带完全消失,表现出比AZADO-Oxo更优异的OVA分解活性。认为这是表示通过AZADO与助催化剂的协同作用而发生氧化还原反应的催化循环,从而更强地氧化OVA的结果。需要说明的是,在图9中,在添加有碳载体(DB)的样品(OVA+DB)、添加有Cu(bpy)/DB的样品(OVA+Cu(bpy)/DB)中OVA的条带几乎没有消失,确认到与对照(OVA)同等的条带。

[0125] (基于催化剂担载体的卵白蛋白(OVA)的处理(2))

[0126] 通过与上述相同的方法,制备得到各样品。其中,AZADO-Oxo的水溶液(浓度100mM)的添加量为2.5μL。

[0127] 将各样品在室温下18小时静置后,在室温下以3分钟、15000×g进行了离心分离。接着,将各样品的上清各80μL移至另一管,添加了5×SB 20μL后,在95℃下静置5分钟而制备得到上清样品。此外,对于包含催化剂载体(C)的样品,在所述离心分离后弃去残留的上清,用纯水1mL清洗2次,再悬浮于纯水80μL。并且,添加了5×SB 20μL后,在95℃下静置5分钟而制备得到残渣样品。将由此得到的上清样品和残渣样品与分子量标志物一起进行电泳,进行了CBB染色。结果如图10所示。如图10表示那样,对于上清样品确认了与图9相同的结果。另一方面,在残渣样品中,添加有Cu(bpy)/DB的样品(图10的“OVA+Cu(bpy)/DB”)中确认了OVA的非常强的条带。由此认为,Cu(bpy)/DB强吸附了OVA。此外,在将AZADO与助催化剂一起担载于催化剂载体并对OVA进行了处理的样品(图10的“OVA+AZADO-Cu(bpy)/DB”)中,确认了吸附有Cu(bpy)/DB的OVA的条带显著弥散化(宽化)。由此,作为图9和图10(上清样品)中AZADO-Cu(bpy)/DB使OVA的条带消失的(分解OVA)的机理,认为Cu(bpy)/DB吸附OVA而诱导了基于AZADO的氧化分解。根据所述机理,认为本发明的一种方式的微生物的灭活方法和灭活剂不仅针对病毒,而且针对具有蛋白质作为必须的构成要素的细菌、霉菌、真菌等也同样地表现出较高的灭活活性。

[0128] (基于非担载的AZADO的卵白蛋白(OVA)的处理)

[0129] 分别制备得到以下样品:

[0130] (a1)纯水1000μL的样品(None)

[0131] (a2)纯水980μL与10mg/mL卵白蛋白水溶液20μL混合得到的样品(OVA)

[0132] (a3)纯水980μL与10mg/mL卵白蛋白水溶液20μL和100mM AZADO-Oxo水溶液2.5μL混合得到的样品(OVA+AZADO-Oxo)

[0133] (a4)纯水980μL与10mg/mL卵白蛋白水溶液20μL、100mM AZADO-Oxo水溶液2.5μL和

100mM $Cu(NO_3)_2$水溶液2.5μL混合得到的样品(OVA+AZADO-Oxo+$Cu(NO_3)_2$)

[0134] (a5)纯水980μL与10mg/mL卵白蛋白水溶液20μL、100mM AZADO-Oxo水溶液2.5μL和100mM $Cu(OTf)_2$水溶液2.5μL混合得到的样品(OVA+AZADO-Oxo+$Cu(OTf)_2$)。

[0135] 将各样品在室温下静置24小时后,在室温下以3分钟、15000×g进行了离心分离。接着,将各样品的上清各80μL移至另一管,添加了5×SB 20μL。然后,在95℃下静置5分钟而与分子量标志物一起进行电泳,进行了CBB染色。结果如图11所示。如图11表示那样,在OVA中添加有AZADO-Oxo的样品中,确认了与上述同样的OVA的条带的消失(蛋白质的分解活性),通过助催化剂($Cu(NO_3)_2$、$Cu(OTf)_2$)的添加未增强所述效果。

[0136] <<针对细菌和真菌(霉菌)的灭活活性的评价>>

[0137] 对于作为本发明的化合物的TEMPO的氧代铵形式(抗衡阴离子为NO_3^-离子;$TEMPO^+NO_3^-$)、AZADO的氧代铵形式(抗衡阴离子为NO_3^-离子;$AZADO^+NO_3^-$)和4-乙酰氨基TEMPO的氧代铵形式(抗衡阴离子为NO_3^-离子;4-AcNH-$TEMPO^+NO_3^-$),评价了针对细菌和真菌(霉菌)的灭活活性。需要说明的是,比较例中使用了硝酸铜(II)。

[0138] 具体而言,首先,作为灭活的对象,准备了大肠杆菌(Escherichia coli ATCC 43895、血清型0157:H7、维罗(verotoxin)毒素I和II型产生株)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus subsp.Aureus NBRC 12732)和青霉菌(Penicilliun citrinum NBRC 6352)。这些对象的预培养对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在普通琼脂培养基(荣研化学株式会社制)中,在35℃±1℃下进行了18~24小时。此外,对于青霉菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar)(Difco公司制)中,在25℃±1℃下进行了7~10天。并且,对于大肠杆菌使用纯化水,对于金黄色葡萄球菌使用生理盐水,对于青霉菌使用0.005%磺基琥珀酸二辛基钠溶液而制备菌液。

[0139] 接着,向分别含有所述化合物的水溶液5mL中,追加以上述方式调节为1×10^7~1×10^8/mL的菌数的菌液0.05mL,轻轻搅拌。此处,所述水溶液中的化合物的浓度在大肠杆菌的试验中为10mM或20mM,在金黄色葡萄球菌的试验中为0.1mM或1mM,在青霉菌的试验中为0.1mM或10mM。

[0140] 从菌液的添加起1分钟后、5分钟后和15分钟后,将溶液以对已生长发育的菌数能够计数的程度进行取样并用SCDLP培养基(SHIOTANI MS株式会社制)稀释从而中和所述化合物。然后,对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌将已中和的样品涂布至SCDLP琼脂培养基(SHIOTANI MS株式会社制),对于青霉菌将已中和的样品涂布至GPLP琼脂培养基(SHIOTANI MS株式会社制),通过倾注平板培养法而对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在35℃±1℃下进行平板培养,对于青霉菌在25℃±1℃下进行平板培养,对培养基上的活菌数进行计数,将以比较例的活菌数为100%的情况下的活菌数的比例[%]作为活菌率而计算。需要说明的是,此外,就平板培养的期间而言,对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为2天,对于青霉菌为7天。由此对于大肠杆菌的对于各化合物计算出的活菌率进行图表化而得到的结果如图12A所示,对于金黄色葡萄球菌其结果如图12B所示,对于青霉菌其结果如图12C所示。

[0141] 对于大肠杆菌,如图12A表示那样,在添加了本发明的化合物的样品中,在添加的15分钟后活菌率大致为0%,在比较例(硝酸铜II))中活菌率未降低至0%。对于金黄色葡萄球菌,如图12B表示那样,本发明的化合物的灭活效果较高,在极低浓度下也在添加后活菌率迅速降低。另一方面,在比较例(硝酸铜II))中,在添加起5分钟以后,得到活菌率未降低

的结果。对于青霉菌,如图12C表示那样,在添加了本发明的化合物的样品中,观察到从添加起随时间经过而活菌率减少的倾向,在比较例(硝酸铜II))中,在添加起5分钟以后,转变为活菌率增加。

[0142] <<针对细菌(大肠杆菌)的最小抑菌浓度(MIC)的测定>>

[0143] 对于作为本发明的化合物的AZADO的氧代铵形式(抗衡阴离子为NO_3^-离子;$AZADO^+$ NO_3^-),通过以下方法,对针对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)进行了测定。

[0144] 首先,作为预培养,将大肠杆菌(DH5α株;AMP+)在LB培养基中振荡培养20小时,将得到的培养液作为大肠杆菌原液。接着,使用PBS将所述大肠杆菌原液稀释为1000倍而得到稀释液。需要说明的是,将所述稀释液作为比较例而使用。

[0145] 另一方面,向上述得到的稀释液中以使其最终浓度为1μM、10μM、100μM、1mM或10mM的方式分别添加$AZADO^+NO_3^-$,在室温下静置15分钟。然后,以使$AZADO^+NO_3^-$失活为目的,将LB培养基用作反应停止液而进一步将稀释液稀释为10倍。最后,将由此得到的反应液各25μL涂布至LB琼脂培养基,在37℃下培养1天。并且,对培养后的琼脂培养基上的菌落数进行计数,计算出每1mL的菌落形成单位(CFU/mL)。结果如下表3所示。需要说明的是,表3所述的"CFU相对值"是将比较例的菌落形成单位的值作为100的情况下的相对值。此外,使用了$AZADO^+NO_3^-$的最终浓度为1mM的样品的培养后的琼脂培养基的照片如图13所示。

[0146] [表3]

[0147]

$AZADO^+NO_3^-$ 最终浓度 [mM]	菌落数	大肠杆菌 稀释倍数	LB培养基 稀释倍数	涂布容量 [mL]	CFU/mL	CFU 相对值
0	303	1000	10	0.025	1.21×10^8	100
0.001	319	1000	10	0.025	1.28×10^8	105
0.01	313	1000	10	0.025	1.25×10^8	103
0.1	151	1000	10	0.025	6.04×10^7	50
1	0	1000	10	0.025	0	0
10	0	1000	10	0.025	0	0

[0148] 由表3表示的结果可知,在$AZADO^+NO_3^-$的最终浓度为100μM以上时观察到显著的灭活效果。此外,在$AZADO^+NO_3^-$的最终浓度为1mM以上的情况下确认了99%以上的较高的除菌效果。需要说明的是,所述1mM这样的浓度与在针对CRFK细胞的FCoV感染实验中确认到发挥显著的抗病毒作用的浓度为相同的程度。因此,表示本发明的化合物针对大肠杆菌的除菌作用浓度具有与抗病毒作用的浓度相同的程度。

[0149] <<针对雾状状态下的蛋白质的分解性的评价>>

[0150] 为了模拟硝酰自由基在生活环境中存在的过滤器上发挥抗病毒作用、除菌作用的状态,通过使用了喷雾器的以下方法,对于担载有硝酰自由基(AZADO)和助催化剂(Cu)的碳材料(AZADO-Cu(bpy)/DB)的抗病毒作用,以S-RBD的分解作用为指标进行了评价。

[0151] (液相体系中的反应性的确认)

[0152] 首先,将S-RBD 100pmol和AZADO-Cu(bpy)/DB 0.1mg在110μL的水溶剂中进行了混合(S-RBD:Cu:AZADO=1:250:250(摩尔比))。接着,在室温下孵育2小时或6小时。需要说明的是,进行使用了未担载AZADO的Cu(bpy)/DB的实验,作为比较例。

[0153] 然后,添加1×SB至由离心分离得到的残渣,对残渣中的蛋白质进行取样,通过SDS-PAGE法和CBB染色法对所述残渣中包含的S-RBD的量进行了评价。结果(电泳照片)如图

14所示。

[0154] 由图14表示的结果确认了,添加有AZADO-Cu(bpy)/DB的体系中,S-RBD的条带孵育时间依赖性地消失。根据所述结果,进行了使用了喷雾器的以下实验。

[0155] (针对雾状状态下的蛋白质的反应性的确认)

[0156] 使包含AZADO-Cu(bpy)/DB 0.1mg的水溶液100μL渗透膜过滤器(8mm冲孔)而制备得到抗病毒性过滤器。将所述过滤器设置于200μL的微芯片的开口部,使用封口膜进行了固定。需要说明的是,使用Cu(bpy)/DB而制备得到比较例的过滤器。

[0157] 对于上述制备得到的过滤器,从微芯片的尖端,使用微量喷雾器(Micro FPS,TORAY PRECISION株式会社制)而将含125pmol或250pmol的量的S-RBD的水溶液25μL进行喷雾,在室温下孵育24小时。然后,通过SDS-PAGE法和银染色法对过滤器上残存的S-RBD的量进行评价。结果(电泳照片)如图15所示。

[0158] 由图15表示的结果确认了,无论喷雾的S-RBD的量的多少,都在含有AZADO-Cu(bpy)/DB的过滤器中,S-RBD的条带消失或减少。

[0159] 本申请基于2022年8月29日所申请的日本专利申请第2022-136098号,通过参照而引用其公开内容作为整体。

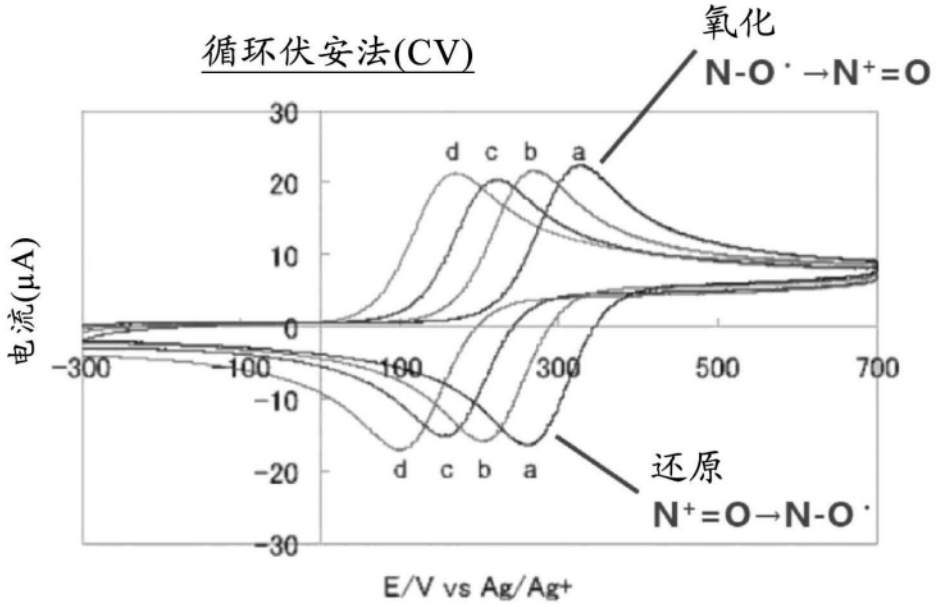

循环伏安法(CV)
氧化
N-O· →N+=O
还原
N+=O→N-O·
电流(μA)
E/V vs Ag/Ag+
30
20
10
0
-10
-20
-30
-300
-100
100
300
500
700
d c b a
d c b a

图1

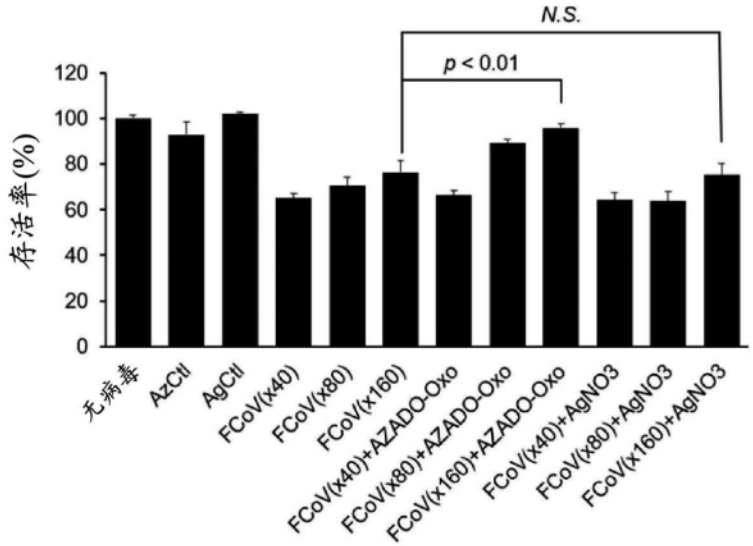

N.S.
p < 0.01
存活率(%)
120
100
80
60
40
20
0
无病毒
AzCtl
AgCtl
FCoV(x40)
FCoV(x80)
FCoV(x160)
FCoV(x40)+AZADO-Oxo
FCoV(x80)+AZADO-Oxo
FCoV(x160)+AZADO-Oxo
FCoV(x40)+AgNO3
FCoV(x80)+AgNO3
FCoV(x160)+AgNO3

图2

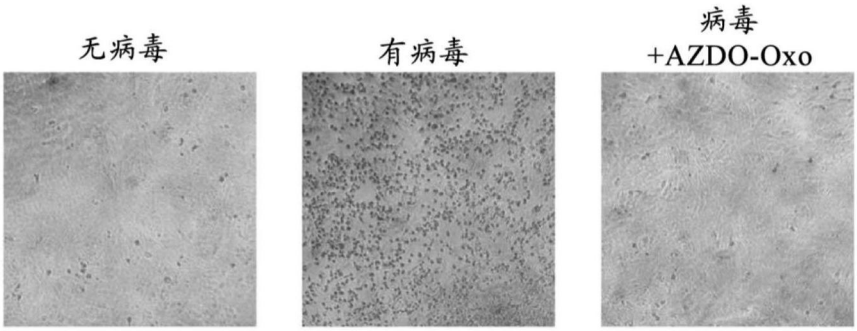

无病毒
有病毒
病毒
+AZDO-Oxo

图3

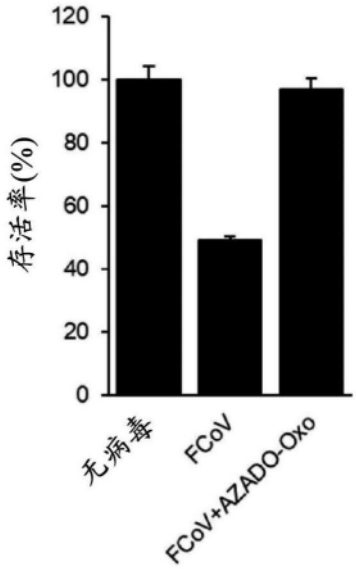

120
100
80
60
40
20
0
存活率(%)
无病毒
FCoV
FCoV+AZADO-Oxo

图4

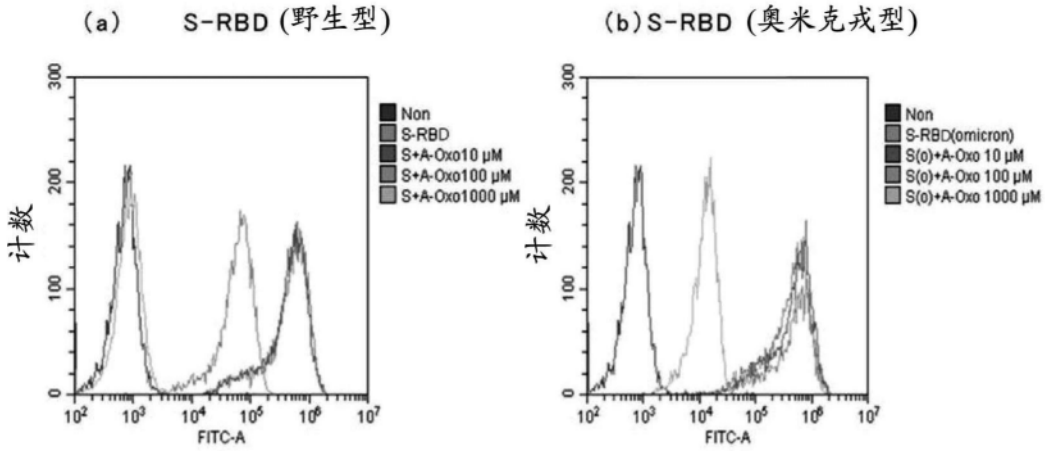

(a) S-RBD (野生型)
(b)S-RBD (奥米克戎型)
计数
FITC-A
Non
S-RBD
S+A-Oxo10 μM
S+A-Oxo100 μM
S+A-Oxo1000 μM
S-RBD(omicron)
S(o)+A-Oxo 10 μM
S(o)+A-Oxo 100 μM
S(o)+A-Oxo 1000 μM

图5

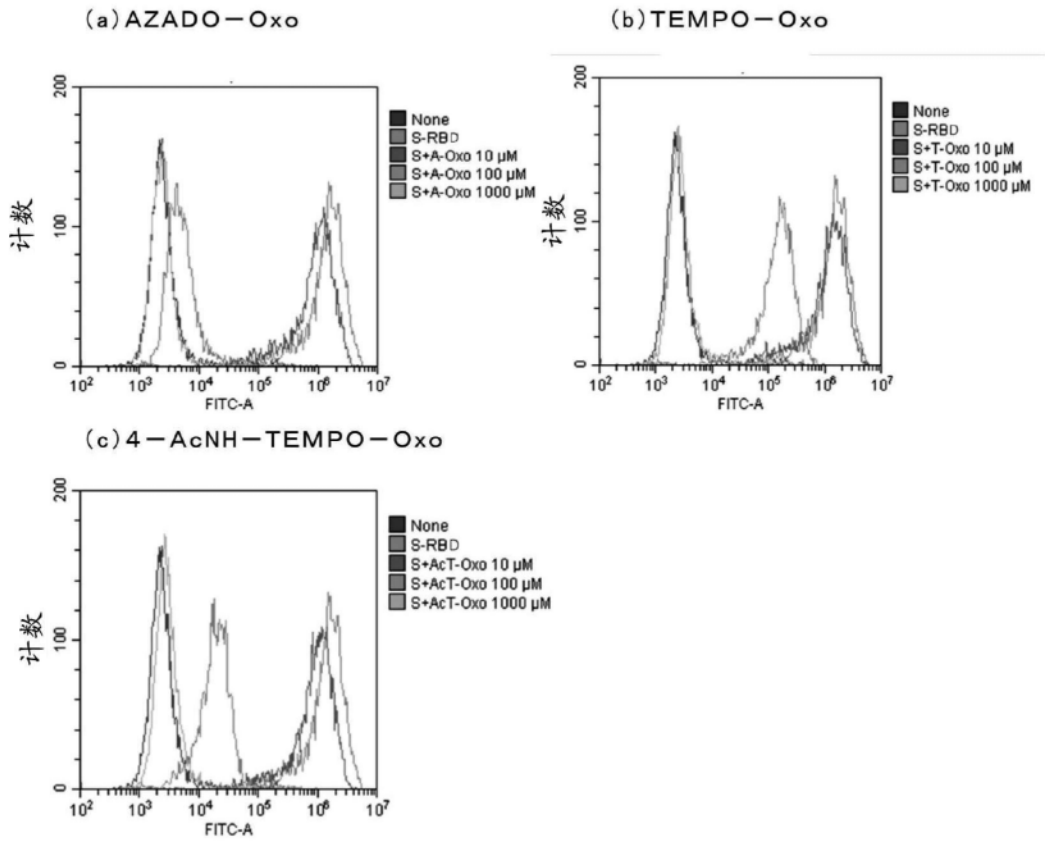

(a)AZADO－Oxo
(b)TEMPO－Oxo
(c)4－AcNH－TEMPO－Oxo
计数
FITC-A
None
S-RBD
S+A-Oxo 10 μM
S+A-Oxo 100 μM
S+A-Oxo 1000 μM
S+T-Oxo 10 μM
S+T-Oxo 100 μM
S+T-Oxo 1000 μM
S+AcT-Oxo 10 μM
S+AcT-Oxo 100 μM
S+AcT-Oxo 1000 μM

图6

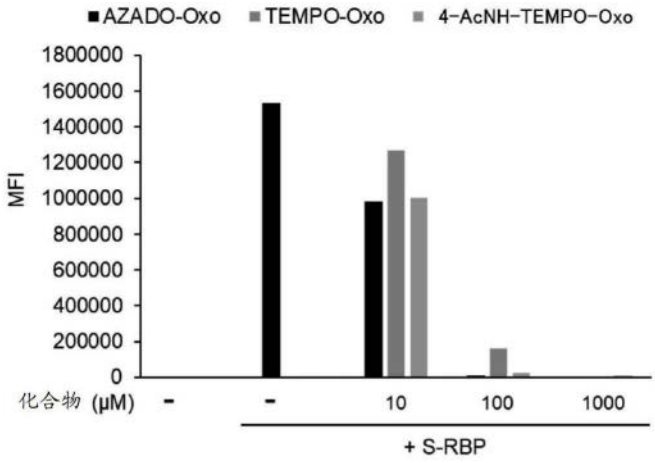

AZADO-Oxo
TEMPO-Oxo
4-AcNH-TEMPO-Oxo
MFI
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
化合物 (μM)
-
-
10
100
1000
+ S-RBP

图7

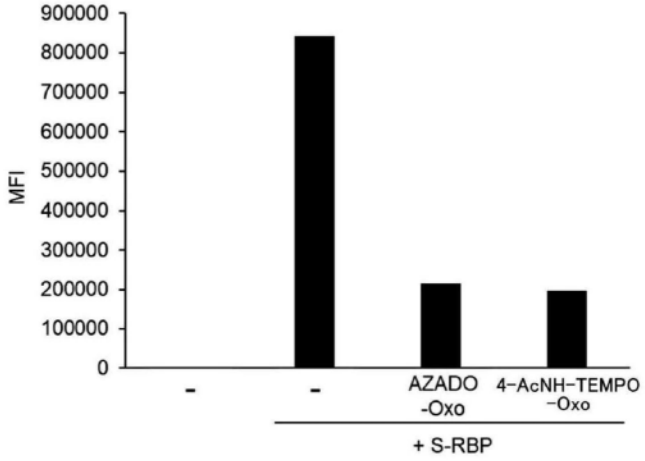

900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
MFI
-
-
AZADO -Oxo
4-AcNH-TEMPO -Oxo
+ S-RBP

图8

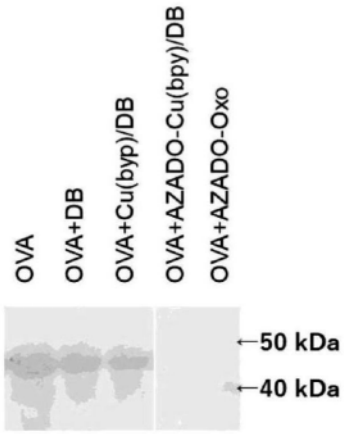

OVA
OVA+DB
OVA+Cu(byp)/DB
OVA+AZADO-Cu(bpy)/DB
OVA+AZADO-Oxo
←50 kDa
←40 kDa

图9

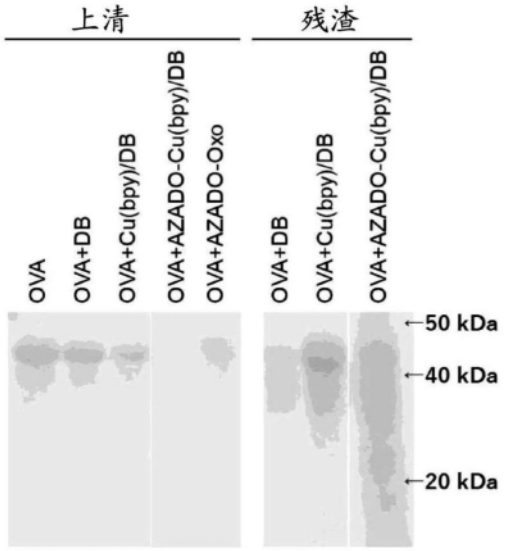

上清
残渣
OVA
OVA+DB
OVA+Cu(bpy)/DB
OVA+AZADO-Cu(bpy)/DB
OVA+AZADO-Oxo
OVA+DB
OVA+Cu(bpy)/DB
OVA+AZADO-Cu(bpy)/DB
←50 kDa
←40 kDa
←20 kDa

图10

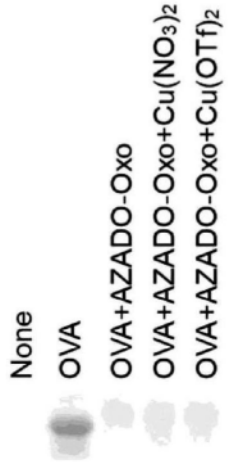

None
OVA
OVA+AZADO-Oxo
OVA+AZADO-Oxo+Cu(NO3)2
OVA+AZADO-Oxo+Cu(OTf)2

图11

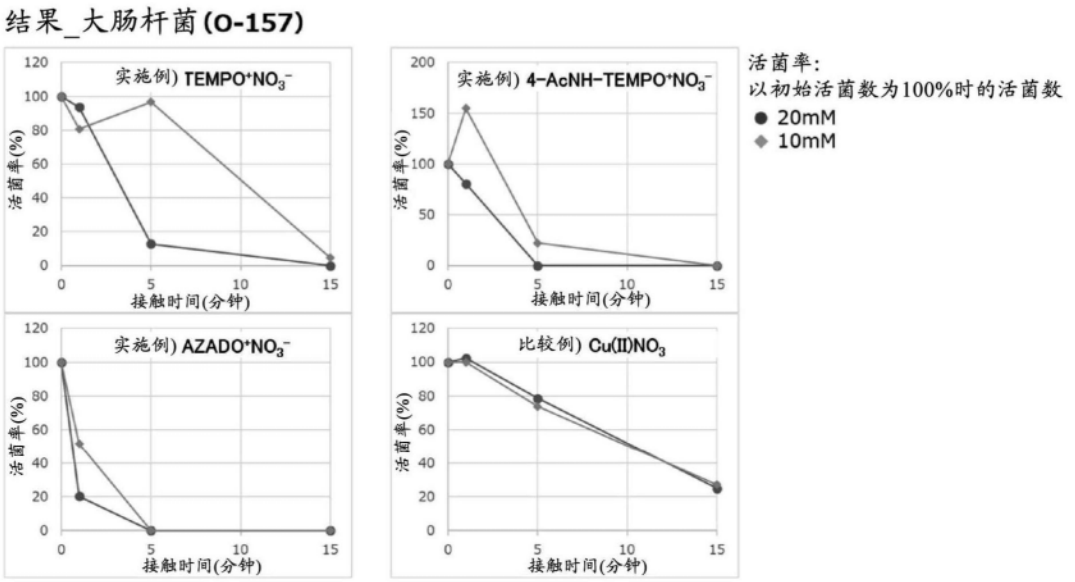

结果_大肠杆菌(O-157)
实施例) TEMPO⁺NO₃⁻
实施例) 4-AcNH-TEMPO⁺NO₃⁻
实施例) AZADO⁺NO₃⁻
比较例) Cu(II)NO₃
活菌率(%)
接触时间(分钟)
活菌率:
以初始活菌数为100%时的活菌数
20mM
10mM

图12A

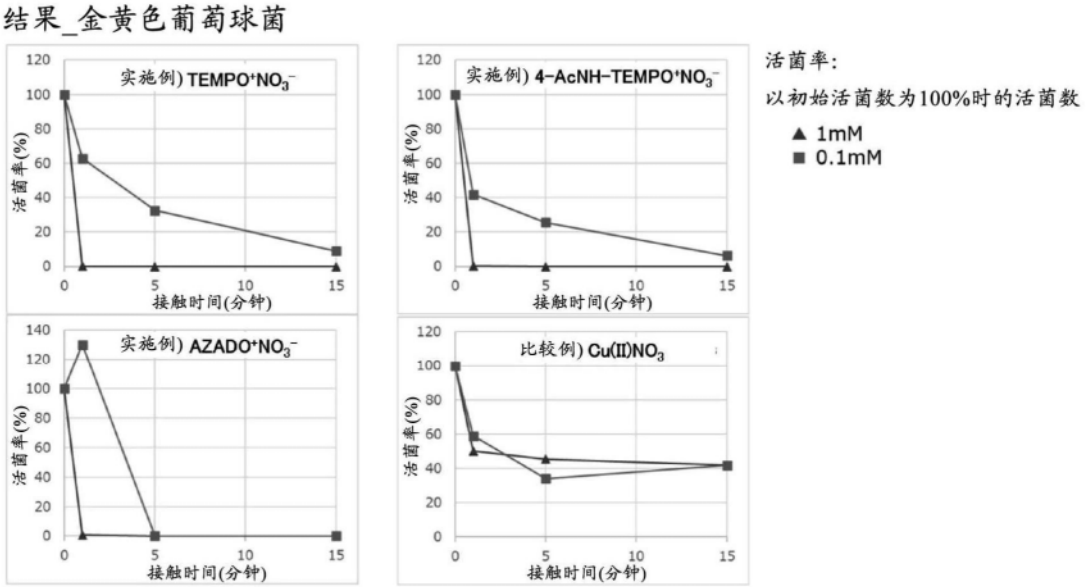

结果_金黄色葡萄球菌
实施例) TEMPO⁺NO₃⁻
实施例) 4-AcNH-TEMPO⁺NO₃⁻
实施例) AZADO⁺NO₃⁻
比较例) Cu(II)NO₃
活菌率(%)
接触时间(分钟)
活菌率:
以初始活菌数为100%时的活菌数
1mM
0.1mM

图12B

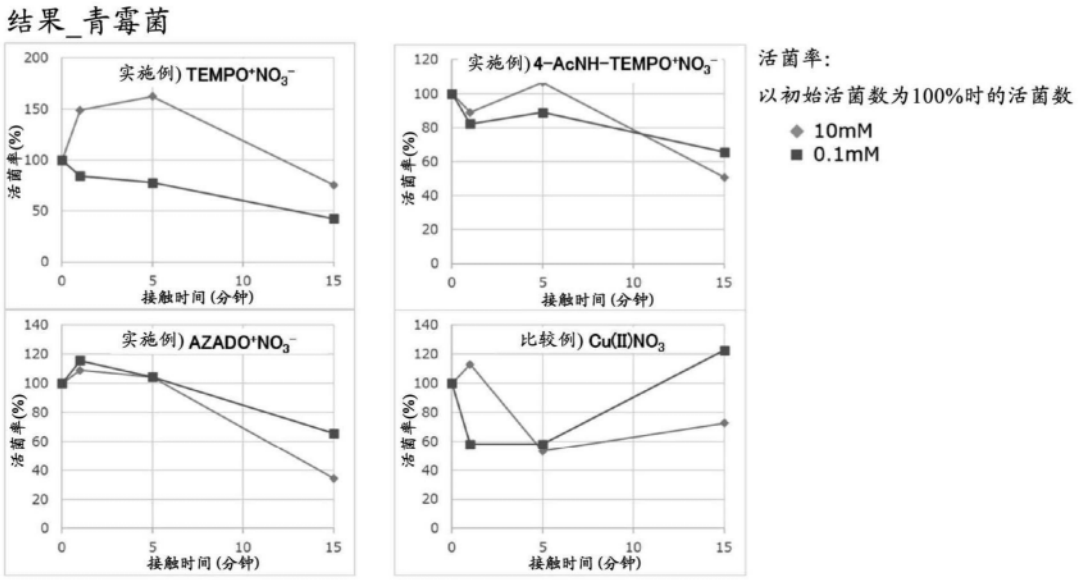

结果_青霉菌
实施例) TEMPO+NO3-
实施例) 4-AcNH-TEMPO+NO3-
实施例) AZADO+NO3-
比较例) Cu(II)NO3
活菌率(%)
接触时间(分钟)
活菌率:
以初始活菌数为100%时的活菌数
10mM
0.1mM

图12C

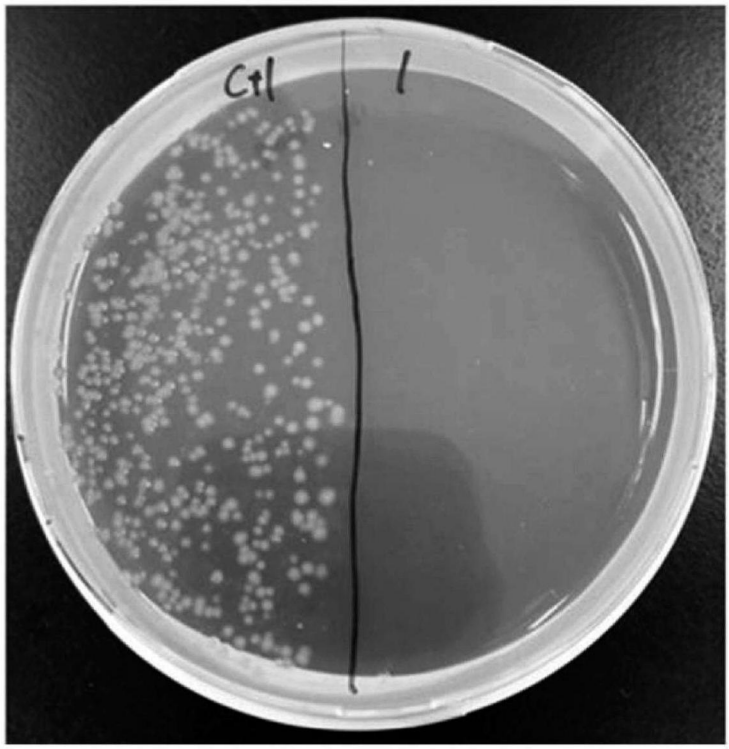

Ctl
1

图13

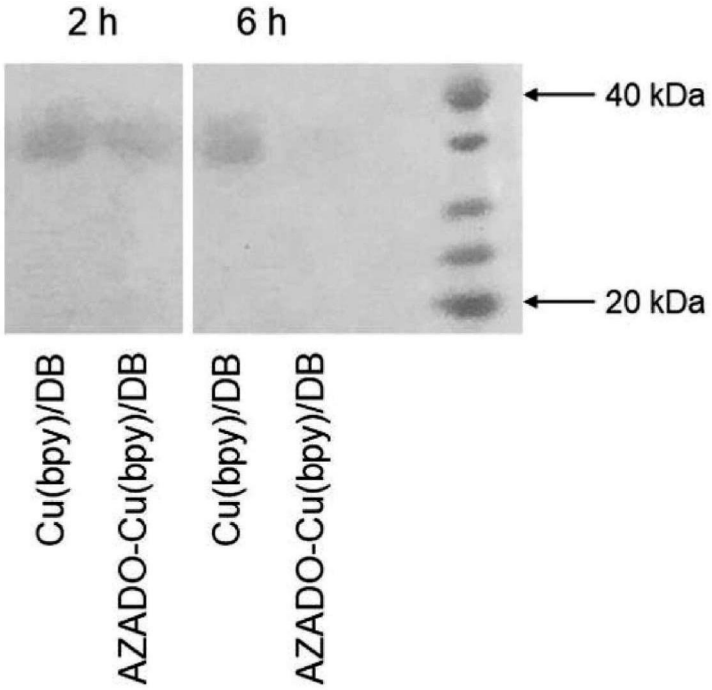

2 h
6 h
40 kDa
20 kDa
Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB
Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB

图14

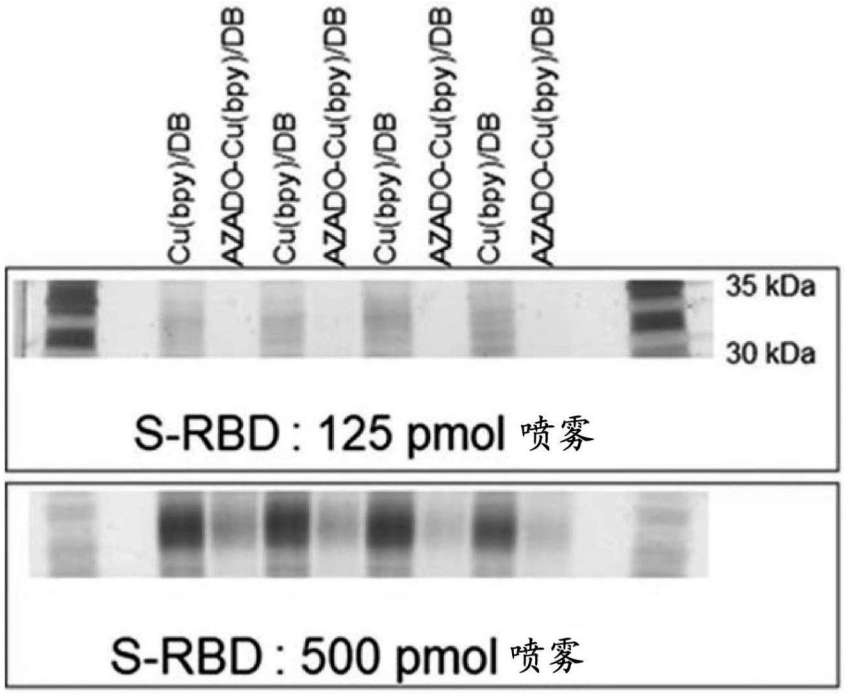

Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB
Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB
Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB
Cu(bpy)/DB
AZADO-Cu(bpy)/DB
35 kDa
30 kDa
S-RBD : 125 pmol 喷雾
S-RBD : 500 pmol 喷雾

图15