



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118175994 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 11

(21) 申请号 202280073161.6

(22) 申请日 2022.09.08

(30) 优先权数据

2029166 2021.09.10 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2022/050507 2022.09.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/038522 EN 2023.03.16

(71) 申请人 AHV国际有限公司

地址 荷兰兹沃勒

(72) 发明人 L·德波尔 G·J·斯特里夫兰

A·K·容斯卡 A·M·舒特瓦

S·S·科卡

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 钱文字 陈扬扬

(51) Int.Cl.

A61K 31/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书36页 附图1页

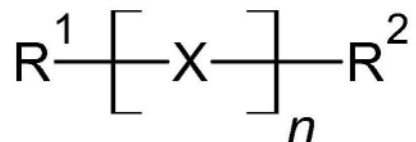
(54) 发明名称

用于治疗生物膜病症和感染的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及含有机硫的组合物,具体是硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯、硫代磺酸二苄酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二正丙酯和硫代磺酸二正丙酯。此类组合物可用于在体内和体外治疗感染并减少或降解生物膜。具体地,此类组合物可用于治疗生物膜相关病症,包括但不限于乳腺炎、指疣皮炎和慢性伤口感染。

1. 式I的化合物,或包含式I的化合物的组合物:



式I,

其中n是2,

其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S(O)-和-S(O)₂-;

并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基;

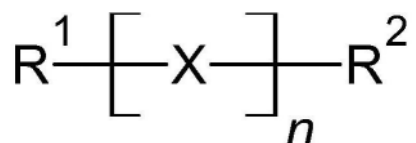
用于治疗生物膜相关病症。

2. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物,其中所述生物膜相关病症是慢性和/或持续性感染。

3. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物,其中所述生物膜相关病症是指疣性皮炎、乳房裂性皮炎或慢性伤口感染。

4. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物,其中所述生物膜包含细菌、酵母、真菌、微藻或其组合。

5. 式I的化合物,或包含式I的化合物的组合物:



式I,

其中n是2,

其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S(O)-和-S(O)₂-;

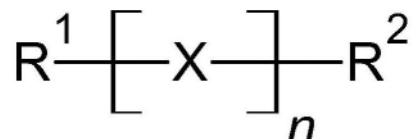
并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基;

用于治疗或预防微生物感染,优选细菌或真菌感染。

6. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物,其中所述应用进一步包括给予抗微生物剂,优选选自抗真菌剂或抗生素。

7. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物,其中所述应用进一步包括给予抗炎剂。

8. 包含式I的化合物的组合物:



式I,

其中n是2,

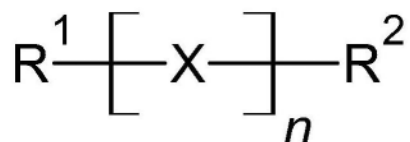
其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S(O)-和-S(O)₂-;

并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基;

其中所述组合物是药物组合物、功能性食品或清洁产品。

9. 一种用于预防或减少表面上的生物膜形成或生长或用于降解或减少表面上的生物膜的体外方法，

所述方法包括将组合物施用到表面，诸如以防止或减少表面上的生物膜形成或生长，或者诸如以降解或减少表面上的生物膜，其中所述组合物包含式I的化合物：



式I，

其中n是2，

其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S(O)-和-S(O)₂-；

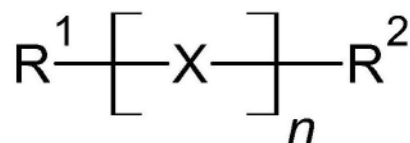
并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基。

10. 根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物或组合物、方法或组合物，其中所述组合物基本上不含硫代亚磺酸二烯丙酯。

11. 根据前述权利要求中任一项应用的化合物或组合物、方法或组合物，其中所述组合物进一步包含抗微生物剂，优选选自抗真菌剂或抗生素。

12. 根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物或组合物、方法或组合物，其中所述组合物进一步包含抗炎剂。

13. 一种制品，其具有至少部分被覆有式I的化合物的表面：



式I，

其中n是2，

其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S(O)-和-S(O)₂-；

并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基；

优选地，其中所述制品是医疗装置或手术装置。

14. 根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中所述R¹和R²独立地选自烷基、芳基、烷基芳基和芳基烷基。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中所述R¹和R²独立地选自C₁₋₆烷基和苯基。

16. 根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中所述式I的化合物不是硫代亚磺酸二正丙酯或硫代磺酸二正丙酯。

17. 根据权利要求1-14中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，

其中当另一个X为-S(O)-时，R¹和R²独立地选自以下组：异丙基、丁基、苄基和对甲苯基；并且其中当另一个X为-S(O)₂-时，R¹和R²独立地选自以下组：甲基、苯基、苄基、4-甲基苯和正丙基。

18. 根据权利要求1-14中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中所述式I的化合物选自以下组:硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯、硫代磺酸二苄酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二正丙酯和硫代磺酸二正丙酯。

19. 根据权利要求1-14中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中 R^1 和 R^2 相同。

20. 根据权利要求1-14中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中所述式I的化合物选自以下组:硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯和硫代磺酸二苄酯。

21. 根据权利要求20所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中所述式I的化合物选自以下组:硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯和硫代磺酸二苯基酯。

用于治疗生物膜病症和感染的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开涉及含有机硫的组合物,具体是硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯、硫代磺酸二苄酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二正丙酯和硫代磺酸二正丙酯。此类组合物可用于在体内和体外治疗感染并减少或降解生物膜。具体地,此类组合物可用于治疗生物膜相关病症,包括但不限于乳腺炎、指疣皮炎和慢性伤口感染。

背景技术

[0002] 无论从健康角度还是从经济角度来看,乳房的健康状况对乳业动物起着至关重要的作用。乳业动物(诸如奶牛)的乳腺感染,即乳腺炎,对全世界乳业产生重大经济影响。全球每年的总体损失估计为40亿至50亿欧元。在乳业动物乳腺炎中,乳房无法对入侵的微生物做出有效的防御反应。众所周知,有几种因素会破坏乳房层面的平衡,从而损害乳业动物杀死导致乳腺炎的微生物的能力。因此,宿主反应机制可能无法触发有效的防御反应来消灭入侵的病原体,从而导致乳房细菌定植和临床或亚临床乳腺炎的发生。

[0003] 奶牛乳房中的细菌定植,尤其是细菌库的形成通常很难防治,从而导致慢性感染,尽管有一定的治疗策略,无论是否使用抗生素,感染都可能持续存在。与奶牛乳房细菌感染持续存在相关的重要因素是上皮粘附、生物膜的产生以及细菌对吞噬作用的敏感性。

[0004] 已经采用了多种策略(诸如抗生素治疗和疫苗接种)以控制或预防奶牛乳腺炎,来减少该疾病的临床和经济后果。然而,大多数治疗方法和策略对改善病情的效果甚微或根本没有效果。造成疗效不佳的原因有几个。第一,尽管有许多毒力因子被认为是单一组分疫苗的潜在抗原,但实验证明,针对导致奶牛乳腺炎的细菌,诱导对单一因子的免疫不足以产生强大的保护作用。第二,细菌抗原的免疫原性低,需要充足的佐剂。第三,控制乳腺炎的主要挑战是使有效的抗生素能够到达乳房中的细菌池,例如细菌形成的生物膜。

[0005] 微生物(诸如细菌)并不一定需要形成生物膜,但如果它们能粘附在例如上皮细胞,就更有可能在宿主体内存活。粘附是一个主动过程,涉及一系列附着和脱离,并由此形成生物膜,并伴随着显著的微生物遗传和随后的生理变化,导致微生物对几乎所有类别的抗生素失去敏感性。因此,由于对抗生素具有抗药性的细菌病原体的出现和流行,细菌性乳房感染的治疗变得越来越困难。在一些情况下,低剂量的抗生素甚至会促进生物膜的形成,这表明细菌有天然的防御机制来避免抗生素的致命影响。由于这种复杂且有问题的情况,尽管近年来在改善总体乳房健康方面取得了进展,但乳腺炎仍然是奶牛最重要的疾病之一。

[0006] 此外,当牛经常或持续接受抗生素治疗时,粪便中也会发现抗生素和降解产物。包含抗生素和降解产物的粪便被撒在土壤上。抗生素的存在会影响土壤中细菌的多样性。这对环境造成了不良影响。治疗牛感染的替代性成分可防止抗生素通过环境传播,并恢复土壤的微生物群。

[0007] 尽管细菌生物膜的描述可以在更早的科学文献中找到,但生物膜的含义在1982年

才为人所知,当时Costerton观察到金黄色葡萄球菌在心脏起搏器导线上形成了生物膜。随后的研究和临床观察表明,细菌生物膜存在于植入物和导管、假肢装置和其它植入生物材料上。更相关的是,观察到微生物生物膜也可以在人类和动物组织的生物表面上形成,诸如口腔中的牙周粘膜(牙菌斑)、鼻窦(慢性鼻窦炎(chronic sinusitis))、内耳(中耳炎)、血管和心脏瓣膜(心内膜炎)、肺泡表面(多种肺部疾病)或胆道和膀胱。

[0008] 生物膜形成的第一阶段包括细胞附着到表面。在第二阶段,细胞开始繁殖,并伴随具有多层细胞的成熟结构的形成。粘液层也会形成以进一步保护细菌。参见,例如Melchior等.Veterinary Journal 2006 171:398-407。一旦达到临界质量,生物膜的最外层细胞层可能会释放“浮游生物”。这些生物体可能会进一步定殖于其它表面。生物膜可能形成在多种表面上,包括活体组织、留置医疗装置、工业或饮用水系统管道或自然水生系统。如本领域技术人员所理解的,并非所有感染都会导致生物膜的形成。

[0009] 过去20年的研究表明,集体生物膜的形成是由细菌通讯系统(被称为群体感应(QS))来促进的。QS是通过细菌永久分泌到环境中的小化学分子(所谓的自诱导物(auto-inducers),AI)来实现的。这些信号分子(例如寡肽(AIP)或N-乙酰基高丝氨酸内酯(AHL))可通过特定受体被邻近的其它细菌识别和监测。当AI达到特定密度(群体)时,细菌细胞会集体改变基因表达,并产生毒力因子攻击体细胞,或活化代谢途径以在组织表面形成生物膜。生物膜的形成涉及胞外基质的形成,该基质由大型聚合物组成,最初主要是多糖,成熟后由蛋白质和脂质稳定,形成三维结构。

[0010] 生物膜感染一旦形成,就很难根除。成熟的生物膜会间歇性地释放浮游细胞。这可能导致慢性感染和间歇性恶化。虽然抗生素或宿主的免疫反应可以解决浮游细胞引起的症状,但成熟的生物膜可能仍然存在。

[0011] 在生物膜保护下的微生物细胞通常对抗生素和人体的天然免疫反应更具抵抗力。休眠细菌的新陈代谢不活跃,因此不会表达许多抗生素的典型靶标,诸如合成细菌细胞壁成分(β -内酰胺类抗生素的靶标,诸如青霉素类、头孢菌素类和万古霉素)和快速蛋白(氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类和利奈唑胺的靶标)以及DNA合成(氟喹诺酮类和利福平(Rifampicin))或叶酸合成(磺胺类、氨基嘧啶类(诸如甲氧苄啶))。因此,单独使用抗生素治疗通常不足以根除生物膜感染(另请参见Wu等,Int J Oral Sci.2015年3月;7(1):1-7)。虽然抗生素可能对分散(浮游)细菌有效,但很难在生物膜内达到根除生物膜内微生物所需的最低抗生素浓度。各种体外实验已证明,与同一菌株的浮游细菌相比,在生物膜中生长的细菌对各种抗微生物剂的耐药性高出10至1,000倍(参见,例如,Amorena等,1999J.Antimicrob.Chemother.44:43-55;Ceri等,1999J.Clin.Microbiol.37:1771-1776;和Olson等,2002Can.J.Vet.Res.66:86-92)。Olsen等对生物膜诱导的抗生素耐药性和耐受性的各种机制(Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 34:877-886)进行了综述。

[0012] 对于牛乳腺炎,已在一项针对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)田间菌株的研究中报道(Melchior,Gaastra&Fink-Gremmels,J.Vet.Med.2006 53:326-332)。测定了从感染乳腺炎的奶牛中分离出的7株菌株的MIC₅₀、最低细菌浓度(BMIC)和MBEC(最小生物膜根除浓度)。测试的抗生素包括那些常用于治疗牛乳腺炎的抗生素,诸如青霉素、阿莫西林、氯唑西林、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢喹肟、氯唑西林/青霉素组合、氯唑西林/青霉素组合、林可霉素、吡利霉素、酪氨酸、新霉素、庆大霉素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、氟苯尼考

(Florfenicol) 和达氟沙星 (Danofloxacin)。对于所有测试的抗生素, MIC (浮游细菌) 和 MBEC (生物膜根除浓度) 之间的差异超过256倍, 通常超过2048倍。

[0013] 还有证据表明抗生素可能会刺激生物膜的形成。例如, 一些抗生素 (诸如四环素、喹诺新碱-达福普汀 (dalfopristins) 和红霉素) 会刺激细菌基因 (例如ica基因) 的表达, 从而促进细菌的粘附 (Melchior等, 同上)。有趣的是, 已经表明在金黄色葡萄球菌乳腺炎分离株中ica基因的流行率很高 (综述于Melchior等, 见上文)。这些结果支持了乳腺感染与生物膜形成相关的假设。

[0014] 生物膜还可以包含休眠细菌。生物膜采用多种机制来逃避宿主的免疫反应, 包括活化能影响免疫细胞活性的调节剂/抑制剂, 以及充当免疫细胞的物理屏障 (Gonzalez Pathog Dis. 2018年4月; 76 (3)), 但也可以摆脱休眠而变得活跃。一般来说, 免疫系统只针对活性细菌起作用, 因此休眠细菌可以逃避个体的免疫系统。休眠细菌能够从生物膜上脱离并迅速变得活跃并对宿主有害。

[0015] 还已知与浮游细胞相比, 真菌相关生物膜对抗真菌药物更具抵抗力 (参见, 例如 Fanning和Mitchell PLOS Pathog 2012 8:e1002585的综述)。因此, 具有抗微生物作用的化合物并不总是适合于治疗或预防生物膜。

[0016] 在成熟的生物膜中, 通过初级代谢的下调 (基因转移) 进入休眠阶段。休眠意味着生物膜细菌几乎完全抑制抗生素典型靶标的表达, 诸如蛋白质和DNA合成以及细胞壁重建。因此, 生物膜本质上对抗生素不敏感, 并且对抗生素的耐药性通常比浮游 (自由浮动) 细菌高1000倍。此外, 生物膜中较高的细胞密度大大增加了水平基因转移的可能性, 这使耐药性增加或毒力谱改变的菌株出现的可能性增加。临床结果是对常见 (甚至现代) 抗生素的表型耐药。

[0017] 在这种生物膜的保护环境下, 细菌的存活时间会增加。此外, 自构建的富含多糖的惰性基质是非免疫原性的, 可以保护生物膜嵌入的细菌免遭宿主免疫细胞的识别 (通过 PAMPS——病原体相关分子模式) 和吞噬。

[0018] 生物膜的形成会对医疗、工业和自然环境产生严重的负面影响。尤其是生物膜相关感染 (即生物膜相关病症) 对于人类和动物来说都是一个严重的问题。此类病症可以表征为具有反复急性发作的慢性炎症反应以及对抗菌疗法和/或宿主防御的抗性。伤口生物膜延缓了组织修复, 导致慢性伤口。有研究表明, 目前生物膜感染占人类所有微生物感染的80% (Bartell JA等, 细菌持续感染的20条进化途径 (20Evolutionary Highways to permanent bacterial infection). Nature Communications (2019) 10:629和Sharma等, 2019Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76)。Jamal等报道称, 美国国立卫生研究院 (National Institute of Health) 指出, 65%的微生物感染和80%的慢性感染与生物膜形成有关 (Journal of Chinese Medical Association 81:7-11)。生物膜和生物膜相关病症已在文献中进行了广泛讨论; 参见, 例如, Sharma等, 2019Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76; Roy等. 2018Virulence 9:522-554; 和Jamal等. 2018Journal of the Chinese Medical Association 81:7-11。Vestby等, 对细菌生物膜及其在疾病中的角色进行综述 (Antibiotics (巴塞尔). 2020年2月; 9 (2) :59)。欧洲微生物学和传染病临床学会 (European Clinical Society of Microbiology and Infectious Disease) 于2014年对生物膜感染进行了全面概述, 另请参阅David Lebeaux等

.Microbiol.Mol.Biol.Rev.2014;doi:10.1128/MMBR.00013-14。

[0019] 例如,铜绿假单胞菌(一种引起医院感染的生物体)会在囊性纤维化肺组织、隐形眼镜和导管等各种表面上形成生物膜。在慢性伤口中也发现了以生物膜形式生长的铜绿假单胞菌,可能导致伤口愈合受损。生物膜,尤其是铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa* biofilms)生物膜,还会引起呼吸道疾病(诸如支气管扩张、慢性阻塞性肺病和慢性鼻窦炎)的慢性感染。医疗装置上形成的生物膜是细菌的储存库,可以流入体内,导致慢性全身感染。白色念珠菌(一种酵母)是医院中最常见的真菌生物膜,但治疗起来极其困难,并且对典型的抗真菌治疗反应不佳。

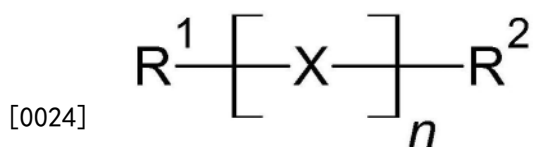
[0020] 细菌生物膜形成的开创性研究集中在金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性)和铜绿假单胞菌(革兰氏阴性)上,因为它们与奶牛复发性乳腺炎和复杂的伤口感染有关。此外,链球菌、禽致病性大肠杆菌(APEC)和空肠弯曲菌生物膜的形成引起了人们的关注,因为这些细菌种类与公共卫生相关。随后,其它重要的动物病原体,包括胸膜肺炎放线杆菌(猪的严重肺部感染,可能致命)、大肠杆菌(局部和全身感染以及全身性败血症,通常对家禽致命)、狗和猫的皮肤和肠道疾病以及马的伤口感染和子宫内膜炎被认为是生物膜感染。该列表是非排他性的,因为生物膜形成是几乎所有微生物的普遍特征。

[0021] 因此,需要抗微生物化合物以及生物膜相关病症的替代性治疗。

发明内容

[0022] 本公开内容提供了以下优选的实施方式。

[0023] -式I的化合物,或包含式I的化合物的组合物:



式I,

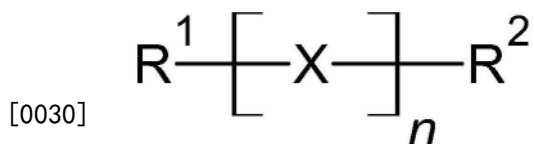
[0025] 其中n是2,

[0026] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S-、-S(O)-和-S(O)₂-;

[0027] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基;其中所述式I的化合物选自以下组:二正丁基二硫、二甲基二硫、二乙基二硫、二正丙基二硫、硫代亚磺酸二乙酯、硫代亚磺酸二正丙酯、硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二正丙酯、硫代磺酸二甲酯和硫代磺酸二苯酯;

[0028] 用于治疗生物膜相关病症。

[0029] -式I的化合物,或包含式I的化合物的组合物:



式I,

[0031] 其中n是2,

[0032] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S-、-S(0)-和-S(0)₂-；

[0033] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基；

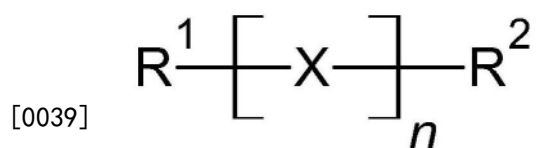
[0034] 用于治疗生物膜相关病症中。

[0035] -根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物，其中所述生物膜相关病症是慢性和/或持续性感染。

[0036] 根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物，其中所述生物膜相关病症是指疣皮炎、乳房裂性皮炎或慢性伤口感染。

[0037] -根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物，其中所述生物膜包含细菌、酵母、真菌、微藻或其组合。

[0038] -式I的化合物，或包含式I的化合物的组合物：



式I，

[0040] 其中n是2，

[0041] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S-、-S(0)-和-S(0)₂-；

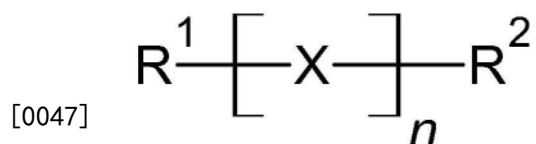
[0042] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基；

[0043] 用于治疗或预防微生物感染，优选细菌或真菌感染。

[0044] -根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物，其中所述应用进一步包括给予抗微生物剂，优选选自抗真菌剂或抗生素。

[0045] -根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物，其中所述应用进一步包括给予抗炎剂。

[0046] -包含式I的化合物的组合物：



式I，

[0048] 其中n是2，

[0049] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S-、-S(0)-和-S(0)₂-；

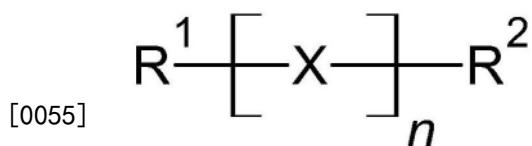
[0050] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基；

[0051] 其中所述组合物是药物组合物、功能性食品或清洁产品。

[0052] -一种用于预防或减少表面上的生物膜形成或生长或用于降解或减少表面上的生物膜的体外方法，

[0053] 所述方法包括将组合物施用到表面，例如以防止或减少表面上的生物膜形成或生长，

[0054] 或者诸如以降解或减少表面上的生物膜，其中所述组合物包含式I的化合物：



式I,

[0056] 其中n是2,

[0057] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S-、-S(O)-和-S(O)₂-;

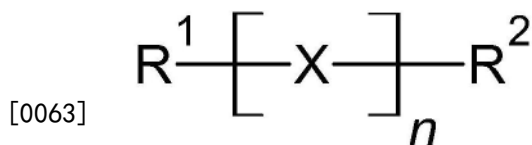
[0058] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基。

[0059] -根据前述实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法或组合物,其中所述组合物基本上不含硫代亚磺酸二烯丙酯。

[0060] -根据前述实施方式中任一项应用的化合物或组合物、方法或组合物,其中所述组合物进一步包含抗微生物剂,优选选自抗真菌剂或抗生素。

[0061] -根据前述实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法或组合物,其中所述组合物进一步包含抗炎剂。

[0062] 一种制品,其具有至少部分涂覆有式I的化合物的表面:



式I,

[0064] 其中n是2,

[0065] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S-、-S(O)-和-S(O)₂-;

[0066] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基或任选取代的芳基;优选地,其中所述制品是医疗装置或手术装置。

[0067] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中所述R¹和R²独立地选自C₁₋₆烷基和苯基;优选地,R¹和R²独立地为C₁₋₄烷基。

[0068] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中R¹和R²相同。

[0069] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中各X是-S-,并且R¹和R²独立地为C₁₋₄烷基。

[0070] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S(O)-和-S(O)₂-;并且R¹和R²独立地选自烷基、芳基、烷基芳基和芳基烷基。

[0071] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物,其中一个X是-S-并且当另一个X是-S(O)-时,R¹和R²独立地选自以下组:正丙基、异丙基、丁基、苄基和对甲苯基;和/或其中当另一个X为-S(O)₂-时,R¹和R²独立地选自以下组:甲基、苯基、苄基、4-甲基苯和正丙基。

[0072] 优选地,其中当一个X为-S-并且当另一个X为-S(O)-时,R¹和R²独立地选自以下组:异丙基、丁基、苄基和对甲苯基;并且,其中当另一个X为-S(O)₂-时,R¹和R²独立地选自以下

组：甲基、苯基、苄基、4-甲基苯和正丙基。

[0073] -根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中式I的化合物选自以下组：二甲基二硫、二乙基二硫、二正丙基二硫、二正丁基二硫、硫代亚磺酸二乙酯、硫代亚磺酸二正丙酯、硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二正丙酯、硫代磺酸二甲酯和硫代磺酸二苯酯。

[0074] -根据实施方式中任一项所述的应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中所述式I的化合物选自以下组：硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯、硫代磺酸二苄酯、硫代亚磺酸二正丙酯和硫代磺酸二正丙酯。

[0075] 根据实施方式中任一项所述应用的化合物或组合物、方法、制品或组合物，其中所述式I的化合物选自以下组：硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯和硫代磺酸二苯基酯。

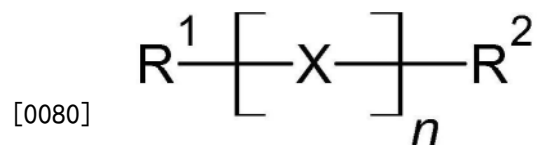
[0076] 还公开了治疗方法，其包括向有此需求的个体给予式I的化合物。此类方法可用于治疗本文公开的生物膜病症。此类方法还可用于治疗本文公开的感染。

[0077] 附图简要说明

[0078] 图1. 治疗后60天内奶牛的体细胞计数。

具体实施方式

[0079] 本公开涉及式I的化合物：



式I，

[0081] 其中n是2，

[0082] 其中一个X是-S-并且另一个X选自以下组：-S-、-S(O)-和-S(O)₂-；

[0083] 并且R¹和R²独立地选自任选取代的烷基和任选取代的芳基。此类化合物(本文也称为有机硫化合物)可用于减少、降解和/或防止生物膜的形成。

[0084] 如本文所用，“烷基”涉及饱和脂肪族烃基。除非另有说明，烷基可以是直链或支链的。优选地，烷基是直链的。如本文所用，烷基可以是取代的或未取代的。优选地，烷基是未取代的。在优选的实施方式中，式I中的烷基是C₁₋₆烷基，更优选C₁₋₄烷基。

[0085] 如本文所用，“芳基”是指包含6至24个碳原子、更优选6至12个碳原子的芳族烃环系统，并且可以包括单环和多环结构。当芳基为多环结构时，优选为二环结构。任选地，芳基被本文中进一步指定的一个或多个取代基取代。优选地，芳基是未取代的。芳基的实例是苯基、苄基和萘基。最优选地，芳基是苯基。

[0086] 如本文所用，“取代的”表示基团含有一个或多个取代基。优选地，取代基独立地选自卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-OH、=O、C₁₋₃烷氧基、-NH₂、-NO₂、-SO₃H和CF₃。优选地，卤素选自以下组：-Cl、-F、-Br和-I。最优选地，卤素是-Cl。在优选的实施方式中，本文公开的基团含有至多三个取代基，更优选至多两个取代基，最优选至多一个取代基。

[0087] 在优选的实施方式中，R¹和R²独立地选自烷基和芳基。更优选地，R¹和R²独立地选

自 C_{1-6} 烷基和苯基。甚至更优选地, R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-4} 烷基。最优选地, R^1 和 R^2 独立地是直链 C_{1-4} 烷基,即甲基、乙基、正丙基或正丁基。

[0088] 在优选的实施方式中, R^1 和 R^2 相同。

[0089] 在优选的实施方式中,各个X是-S-。在优选的实施方式中,一个X是-S-并且另一个X是-S(O)-。在其它优选的实施方式中,一个X是-S-,并且另一个X是-S(O)₂-。

[0090] 在优选的实施方式中,式I中各个X是-S-,并且 R^1 和 R^2 独立地是 C_{1-4} 烷基,优选直链 C_{1-4} 烷基,即甲基、乙基、正丙基或正丁基。优选地,包含这些特定的式I化合物的组合物进一步包含一种或多种抗微生物剂。

[0091] 在式I的优选实施方式中,一个X是-S-并且另一个X选自以下组:-S(O)-和-S(O)₂-,并且 R^1 和 R^2 独立地选自烷基、芳基、烷基芳基和芳基烷基。

[0092] 优选地,其中当一个X为-S-并且当另一个X为-S(O)-时, R^1 和 R^2 独立地选自以下组:正丙基、异丙基、丁基、苄基和对甲苯基;和/或其中当另一个X为-S(O)₂-时, R^1 和 R^2 独立地选自以下组:甲基、苯基、苄基、4-甲基苯和正丙基。

[0093] 在优选的实施方式中,式I的化合物不是丙基丙烷硫代磺酸酯(PTSO,也称为硫代磺酸二正丙酯)或丙基丙烷硫代亚磺酸酯(PTS,也称为硫代亚磺酸二正丙酯)。

[0094] 优选地,其中当一个X为-S-并且当另一个X为-S(O)-时, R^1 和 R^2 独立地选自以下组:异丙基、丁基、苄基和对甲苯基;并且,其中当另一个X为-S(O)₂-时, R^1 和 R^2 独立地选自以下组:甲基、苯基、苄基、4-甲基苯和正丙基。

[0095] 在优选的实施方式中,式I的化合物选自以下组:二甲基二硫、二乙基二硫、二正丙基二硫、二正丁基二硫、硫代亚磺酸二乙酯、1-硫代亚磺酸正丙酯(也称为硫代亚磺酸二正丙酯)、正丁基丁烷硫代亚磺酸酯(也称为硫代亚磺酸二正丁酯)、1-硫代磺酸正丙酯(也称为硫代磺酸二正丙酯)、甲硫代磺酸甲酯(也称为硫代磺酸二甲酯)和苯硫代磺酸酯(也称为硫代磺酸二苯酯)。在优选的实施方式中,式I的化合物选自以下组:二甲基二硫、二乙基二硫、二正丙基二硫和二正丁基二硫。在优选的实施方式中,式I的化合物选自以下组:硫代亚磺酸二乙酯、硫代亚磺酸二正丙酯和硫代亚磺酸二正丁酯。在优选的实施方式中,式I的化合物选自以下组:硫代磺酸二正丙酯、硫代磺酸二甲酯和硫代磺酸二苯酯。在优选的实施方式中,式I的化合物选自以下组:硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二苯基酯、硫代亚磺酸双(对甲苯基)酯、S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯、硫代亚磺酸二异丙酯、硫代亚磺酸二苄酯和硫代磺酸二苄酯。

[0096] 在优选的实施方式中,式I的化合物是二甲基二硫。在优选的实施方式中,式I的化合物是二乙基硫。在优选的实施方式中,式I的化合物是二正丙基二硫。在优选的实施方式中,式I的化合物是二正丁基二硫。在优选的实施方式中,式I的化合物是二苯基二硫。在优选的实施方式中,式I的化合物是硫代亚磺酸二乙酯。在优选的实施方式中,式I的化合物是硫代亚磺酸二正丙酯。在优选的实施方式中,式I的化合物是正丁基丁烷硫代亚磺酸酯。在优选的实施方式中,式I的化合物是硫代磺酸二正丙酯。在优选的实施方式中,式I的化合物是硫代磺酸二甲酯。在优选的实施方式中,式I的化合物是硫代磺酸二苯酯。

[0097] 应当理解,术语“硫化物(sulphide)”和“硫化合物(sulfide)”在本文中可互换使用。

[0098] 在一些实施方式中,化合物获自天然来源(诸如植物)。可以通过多种方式从植物

材料中提取化合物。适当的方法取决于化合物的化学性质。例如,萃取时可以先使用非极性溶剂,然后再用极性增加的溶剂进行。这些化合物也可商购或可如实施例1中所述制备。

[0099] 本公开提供了包含本文公开的化合物的组合物。优选地,此类组合物基本上不含硫代亚磺酸二烯丙酯(也称为烯丙基-2-丙烯-1-硫代亚磺酸酯)。硫代亚磺酸二烯丙酯更广泛为人知的名称是大蒜素。大蒜素是一种有机硫化合物。当新鲜大蒜被切碎或压碎时,蒜氨酸酶(alliinase)会将蒜氨酸(alliin)转化为大蒜素,从而产生新鲜大蒜的香气。生成的大蒜素不稳定,很快转变为一系列其它含硫化合物(诸如二烯丙基二硫)。

[0100] 如本文所用,“基本上不含”是指包含小于5重量%硫代亚磺酸二烯丙酯的组合物。在一些实施方式中,组合物包含小于1重量%硫代亚磺酸二烯丙酯,优选小于0.5重量%硫代亚磺酸二烯丙酯。在一些实施方式中,该组合物包含的式I化合物与硫代亚磺酸二烯丙酯重量比为至少10:1,更优选至少100:1。

[0101] 本发明的组合物还优选基本上不含二烯丙基二硫。在一些实施方式中,组合物包含小于1重量%二烯丙基二硫,优选小于0.5重量%二烯丙基二硫。在一些实施方式中,该组合物包含式I的化合物与二烯丙基二硫重量比为至少10:1,更优选至少100:1。

[0102] 在一些实施方式中,提供了组合物,其中至少50重量%,优选至少90重量%活性成分是本文公开的式I的化合物。在一些实施方式中,提供了组合物,其中唯一的活性成分是式I的化合物,任选地包括其它抗微生物剂和/或抗炎剂。在一些实施方式中,提供了组合物,其中至少50重量%,优选至少90重量%活性成分是本文公开的式I化合物。在一些实施方式中,提供了组合物,其中唯一的活性成分是式I的化合物,任选地包括其它抗微生物剂和/或抗炎剂。

[0103] 本文公开的化合物和包含该化合物的组合物可用于治疗或预防感染。例如,具体用途是用于治疗或预防呼吸道感染、肠感染、乳腺感染、乳房感染、皮肤感染、膀胱感染、耳部感染、全身感染、关节感染、脑部感染。

[0104] 如本文所用,“感染”是指例如可导致疾病的致病性感染。具体地,此类感染是细菌或真菌感染。优选地,感染是微生物感染。在优选的实施方式中,感染是细菌感染。在优选的实施方式中,感染是真菌感染(包括酵母感染)。

[0105] 细菌和真菌几乎无处不在,并且以多种形式存在。大多数无害且对于地球生命是不可或缺的,并对植物、动物和人类健康至关重要。例如,人类和动物肠道中的微生物群,即所谓的肠道菌群,其中的细菌和真菌与宿主共生。此外,皮肤上天然存在的细菌也是免疫系统的一部分。另一个实例是土壤生物,其中大部分由细菌和真菌组成。例如在动物或人类中,一些细菌和真菌会导致致病性感染。这些致病性感染会导致受感染个体的疾病和病况。

[0106] 如本文所用,“感染的治疗”是指感染的严重性和/或持续时间的减少和/或感染症状的严重性和/或持续时间的减少。优选地,所述治疗导致个体健康的恢复。优选地,个体具有较少的疾病症状或持续较短的时间。如本文所用,“感染的预防”是指预防或延迟感染或与感染相关的一种或多种症状的发作。

[0107] 一些微生物(诸如细菌、微藻、真菌)可以形成生物膜。本文公开的化合物还可用于预防或减少生物膜形成或生长和/或用于降解或减少生物膜。优选地,所述化合物和包含该化合物的组合物可用于治疗或预防生物膜相关病症。正如技术人员将认识到的,并非所有能够治疗微生物(例如细菌)感染的化合物都能够治疗生物膜相关病症。

[0108] 生物膜一词最初用于技术和环境微生物学,来描述附着在天然或人造表面上的固着细菌和其它微生物的群落。微生物生物膜的形成是由细菌在其附着的表面上定殖而引发的,并产生由有机聚合物组成的粘液膜。这种初级细菌膜吸引其它微生物(诸如藻类和原生动物、真菌和原生动物),从而形成可见的多物种生物膜。这种三维生物膜在自然界中无处不在,存在于所有与水接触的表面上。引起公众健康关注的是市政供水以及家庭供水管道和设备中的微生物生物膜。

[0109] 如本文所用,术语“生物膜”是指聚集在界面(通常是固体/液体)处并且通常被细胞外聚合物粘液基质包围的微生物群。生物膜可以在生物或非生物表面上形成,并且存在于自然、工业和医院环境中。生物膜可以包含许多不同类型的微生物,例如细菌、古细菌、原生动物、真菌和藻类。优选地,此类生物膜包含细菌、微藻(诸如原藻属)或真菌。

[0110] 如本文所用,“生物膜相关病症的治疗”在本文中也指“生物膜相关病症”的治疗,是指疾病的严重性和/或持续时间的减少和/或疾病症状的严重性和/或持续时间的减少,尤其是感染症状的减少。优选地,所述治疗导致个体健康的恢复。优选地,个体具有较少的疾病症状或持续较短的时间。

[0111] 如本文所用,“预防或减少生物膜形成或生长”是指预防、延迟或减少生物膜形成或生长。如技术人员将理解的,与未处理的生物膜的生长相比,生物膜形成或生长的这种减少可以减缓生物膜的生长。优选地,该组合物可用于减少生物膜形成或生长。如本文所用,“生物膜的降解或减少”是指部分或完全消除生物膜。如技术人员将理解的,在这样的处理之后,浮游细菌可能仍然存在。

[0112] 本文公开的化合物可能能够破坏生物膜的结构,例如细胞外粘液基质。在一些实施方式中,该化合物可用于抑制细胞粘附。具体地,该化合物可以防止微生物生物膜,尤其是自由活体微生物中遇到的所有细胞类型的静态或活体表面的粘附(不杀死细菌)。

[0113] 尽管不希望受理论束缚,但本公开提出本文公开的治疗化合物可以通过影响群体感应来发挥其部分作用。群体感应(QS)信号在控制例如细菌毒力因子的表达等方面发挥着重要作用。QS包括周围环境中信号分子的积累,这使得单一细胞能够感知细菌数量的密度和信号分子,从而使细菌种群作为一个整体做出协调反应。这些细胞-细胞通讯系统调控着细菌的各种功能,诸如运动、毒力、孢子形成、抗生素生产、DNA交换以及等更复杂的多细胞结构的发育(诸如生物膜)。因此,干扰QS信号系统可能会提供一种对抗持续(慢性)细菌感染的新策略。某些物质,诸如具有群体感应抑制(QQ)能力的天然产生的化合物,可用作抗粘附性化合物和干扰生物膜形成的化合物。

[0114] 本文公开的化合物可具体用于治疗生物膜相关病症,其中所述病症的特征在于慢性和/或持续性感染。本文公开的化合物可具体用于治疗慢性和/或持续性感染。持续性感染和慢性感染这两个术语经常互换使用,但基于不同的机制。持续性感染通常受到免疫防御的抑制,但当这种免疫防御减弱时,可能会被活化。持续性感染通常是无症状的,只有当免疫防御无法控制病原体时才会出现临床症状。尽管持续性感染通常是无症状的,但是技术人员熟知检测此类持续性感染的方法,包括例如检测来自患者样品(例如血液或尿液)的微生物。在慢性感染中,病原体残留在一组细胞/组织的部分(例如关节或肺组织)中。患者始终会出现疾病症状,尽管这些症状可能比感染急性期的症状轻微。

[0115] 牛乳腺炎就是生物膜疾病的突出实例。牛乳腺炎是奶牛乳腺感染的临床术语,可

由多种病原体引起,最常见的是金黄色葡萄球菌、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactia*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)以及黏质沙雷氏菌(*erratia marescens*)和其它兼性致病性肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌和原藻属,后者被认为是一种新出现的病原体,在世界许多地区引起侵袭性、不可治愈的乳腺炎。本发明涵盖用本文公开的化合物和组合物处理包含此类微生物的生物膜。

[0116] 在一些实施方式中,由本发明的化合物治疗的伤口包含例如金黄色葡萄球菌;链球菌;革兰氏阴性菌,例如密螺旋体属(*Treponema spp*)、大肠杆菌、鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)、铜绿假单胞菌;或酵母/真菌,例如念珠菌属(*Candida spp*) (白色念珠菌)、多主枝孢菌(*Cladosporidium herbarum*)、丝孢酵母(*Trichosporum*)、红冬孢酵母(*Rhodosporidium*)和马拉色菌(*Malassezia*)。

[0117] 目前普遍认识到生物膜相关微生物引起大量感染,包括心内膜炎、骨髓炎、鼻窦炎、尿路感染、慢性前列腺炎、牙周病、囊性纤维化患者的慢性肺部感染、中耳感染和各种医院感染,尤其是与所有已知的留置装置(导管、植入物)相关的那些。生物膜疾病的负担是巨大的,是医疗保健中的一个主要问题。

[0118] 虽然现在已知几乎所有细菌种类都能够在应激条件下形成生物膜,但在当前的临床实践中,一些细菌和真菌种类引起了人们的主要兴趣,因为即使同一种类和菌株的非生物膜、浮游形态对普通治疗剂(抗生素和抗霉菌剂/杀真菌剂)非常敏感,但相关感染几乎完全是治疗抗性的。

[0119] 以下列出了因其生物膜相关的治疗抗性而受到临床主要关注的病原体的实例:

[0120] 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) - 肺曲霉病(真菌病)

[0121] 洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacian*) - 肺囊性纤维化超级感染

[0122] 念珠菌属(酵母) - 胃肠道和泌尿生殖道的粘膜表面

[0123] 阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*) (泌尿生殖道)

[0124] 大肠杆菌(多器官和败血症)

[0125] 铜绿假单胞菌(多器官和肺部感染,包括囊性纤维化)

[0126] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (多组织和伤口感染,医院感染)

[0127] 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) (多种组织和伤口感染)

[0128] 嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*) (慢性呼吸道疾病)。

[0129] 本发明涵盖此类生物膜相关病症和生物膜相关微生物的治疗。在优选的实施方式中,生物膜相关病症是乳房裂性皮炎。其它可用式I化合物治疗的包括溃疡(例如,糖尿病足溃疡(DFU)、静脉性腿部溃疡(VLU)和压疮(PU));莫泰拉罗(*mortellaro*)病(指疣皮炎);和湿疹。

[0130] 微生物生物膜不仅由细菌形成,还由其它微生物形成,尤其是定植于胃肠道和泌尿生殖道粘膜表面的致病性真菌(烟曲霉是多种曲霉相关肺部疾病的主要原因)和酵母(念珠菌属)。最常见的与植入物相关的生物膜是由金黄色葡萄球菌(MSSA和MRSA)、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*.)形成的。此外,微藻(诸如原藻属)可形成生物膜并且是人类和动物疾病的来源(原孢囊藻病(*Protothecosis*))。

[0131] 在某些实施方式中,生物膜包括选自以下一种或多种的细菌:密螺旋体属、鼠疫杆

菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌、黏质沙雷氏菌、酿脓特吕佩尔氏菌(*Trueperella pyogenes*)、溶血曼海姆氏菌(*Mannheimia haemolytica*)、多杀性巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenza*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、坏死梭菌(*Fusobacterium necrophorum*)、假性结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。在一些实施方式中,生物膜包含选自以下的真菌:犁头霉属(*Absidia* spp.)、放线菌属(*Actinomyces* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)、葡萄属(*Botrytis* spp.)、念珠菌属(*Candida* spp.)、中心孢属(*Centrospora* spp.)、头孢霉属(*Cephalosporium* spp.)、长喙壳属(*Ceratocystis* spp.)、毛壳孢属(*Ceratocystis* spp.)、毛壳属(*Chaetomium* spp.)、枝孢菌属(*Cladosporium* spp.)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)、耳霉属(*Conidiobolus* spp.)、富尔维亚属(*Fulvia* spp.)、镰孢菌属(*Fusarium* spp.)、地霉属(*Geotrichum* spp.)、球座菌属(*Guignardia* spp.)、长蠕孢属(*Helminthosporium* spp.)、组织胞浆菌属(*Histoplasma* spp.)、油瓶霉属(*Lecythophora* spp.)、马拉色菌属(*Malassezia* spp.)、丛赤壳属(*Nectria* spp.)、诺卡氏菌属(*Nocardia* spp.)、卵形孢霉属(*Oospora* spp.)、蛇孢腔菌属(*Ophiobolus* spp.)、拟青霉属(*Paecilomyces* spp.)、巴西副球孢子菌(*Paecilomyces* spp.)、青霉菌属(*Penicillium* spp.)、瘤梗孢属(*Phymatotrichum* spp.)、疫霉属(*Phytophthora* spp.)、腐霉属(*Pythium* spp.)、何德毛节菌属(*Piedraia hortai*)、丝核菌属(*Rhizoctonia* spp.)、根霉属(*Rhizopus* spp.)、红孢子虫属(*Rhodosporidium* spp.)、酵母属(*Saccharomyces* spp.)、小核菌属(*Scerotium* spp.)、核盘菌属(*Sclerotinia* spp.)、球拟酵母属(*Torulopsis* spp.)、和发癣菌属(*Trichophyton* spp.)。已知许多医学上重要的真菌,例如念珠菌属、曲霉属、隐球菌属(*Cryptococcus*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、球霉菌属(*Coccidioides*)和肺孢子菌属(*Pneumocystis*),都会产生生物膜。在一些实施方式中,生物膜包含微藻,例如原藻属。

[0132] 在某些实施方式中,细菌感染或生物膜相关病症是由革兰氏阴性菌引起的。在某些实施方式中,细菌感染或生物膜相关病症是由革兰氏阳性菌引起的。在某些实施方式中,细菌感染或生物膜相关病症是由多重耐药细菌引起的。。在某些实施方式中,细菌感染是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)相关感染或表皮葡萄球菌(例如,MRSE)相关感染。

[0133] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是大肠杆菌,优选地生物膜感染是复发性尿路感染、导管相关的尿路感染或胆道感染。

[0134] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是铜绿假单胞菌,优选地生物膜感染是囊性纤维化肺部感染、慢性伤口感染、导管相关尿路感染、慢性鼻窦炎、慢性中耳炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺病或隐形眼镜相关角膜炎。

[0135] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是金黄色葡萄球菌,优选地生物膜感染是慢性骨髓炎、慢性鼻窦炎、心内膜炎、慢性中耳炎或(整形外科)植入物的感染。

[0136] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是表皮葡萄球菌,优选地生物膜感染是中心静脉导管、整形外科植入物感染或慢性骨髓炎。

[0137] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是肺炎链球菌,优选地生物膜感染是鼻咽感染、慢性鼻窦炎、慢性中耳炎或慢性阻塞性肺病感染。

[0138] 在优选的实施方式中,引起生物膜的细菌是化脓性链球菌,优选地生物膜感染是口腔和鼻咽感染、复发性扁桃体炎。

[0139] 生物膜感染的临床症状对医生来说是已知的(参见,例如,Wu等.Int J Oral Sci.2015年3月;7(1):1-7的表1)。此类生物膜病症可能导致慢性感染。急性与慢性感染的确定也是从业者已知的。例如,根据梅奥诊所的说法,一年内发生4次或更多次酵母菌感染表明存在慢性酵母菌感染,而在6个月内发生两次或更多次膀胱感染则表明存在慢性膀胱感染(也称为复发性尿路感染)。

[0140] 治疗细菌致病性感染的最常见方法是使用抗生素。目前的抗生素主要通过生长依赖性机制发挥作用,并以快速分裂的细菌为目标。然而,非复制性或生长缓慢的细菌(例如休眠持续细胞,生物膜)表现出高水平的抗生素耐受性和/或耐药性,导致持续和反复感染。本文公开的化合物适用于包含抗生素抗性细菌、抗生素耐受性细菌和抗生素持久性(persistent)细菌的感染或生物膜。本文公开的化合物还适合作为二线疗法,或者更适用于对先前的治疗(例如,抗微生物治疗)没有反应或其病症在例如一年或6个月内复发的个体。

[0141] 本公开进一步提供了本文公开的化合物和包含该化合物的组合物,用于治疗由生物膜诱导的或与生物膜相关的任何病症。由生物膜引起的或与生物膜相关的病症是技术人员众所周知的。具体地,此类病症是生物膜相关的感染。适合治疗的病症包括例如细菌性前列腺炎、细菌性阴道病、胆道感染、慢性鼻窦炎、慢性肺部疾病、龋齿、心内膜炎、肾结石、喉炎、囊性纤维化中的肺部感染、齿龈炎、乳腺炎、中耳感染、非院内(血流)感染、阻塞性肺病、骨髓炎、中耳炎、牙周炎、肺炎前列腺炎、慢型鼻窦炎、鼻窦炎、扁桃体炎、结核、尿路感染和伤口感染。例如,已知牛支原体(*Mycoplasma Bovis*)会引起乳房感染和关节感染。生物膜相关病症还包括由留置装置(例如医疗植入物、导管等)上形成的生物膜引起的疾病。通常,此类病症通过移除/替换植入物来治疗。在优选实施方式中,该病症是乳腺炎。在一些实施方式中,该病症不是乳腺炎。在一些实施方式中,治疗不是针对炎性肠病,尤其不是结肠炎。

[0142] 在一些实施方式中,本文公开的化合物和组合物还可用于治疗 and 预防植入型医疗装置(诸如本文进一步公开的关节假体和心脏瓣膜)的感染。

[0143] 在一些实施方式中,本文公开的化合物和组合物还可用于预防或减轻响应于细菌感染或生物膜的炎症。炎症是身体组织对有害刺激物(诸如病原体)的复杂生物反应的部分,是涉及免疫细胞和分子介质的保护性反应。炎症的功能是消除病原体。

[0144] 在优选的实施方式中,用本文公开的化合物或包含该化合物的组合物治疗个体能预防或减轻动物(例如牛)的临床炎症。优选地,该治疗能预防或减轻乳房的(临床)炎症。在另一个实施方式中,用化合物和包含该化合物的组合物治疗个体能预防或减轻人的(临床)炎症。例如,治疗能预防或减轻皮肤炎症,优选预防湿疹。

[0145] 尽管不希望受理论束缚,但用本文公开的化合物或包含该化合物的组合物治疗个体能减少生物膜形成或生长和/或引起生物膜的降解或减少。因此,在病原体存在的情况

下,个体不再产生炎症反应。换言之,清除生物膜和这些生物膜内的病原体能减少炎症反应并预防临床炎症。

[0146] 在生物膜处理过程中,生物膜中会释放微生物(诸如细菌和真菌)。在一些情况下,个体的免疫系统会对活性微生物产生反应。这可能会导致组织炎症。活化的免疫细胞和炎症反应也会损害组织,例如乳腺组织。因此,抑制炎症反应可以防止或减少对组织的损伤。

[0147] 此外,在组织受损且炎症结束后,身体就会开始修复。仍然存在的巨噬细胞刺激新血管的产生。它们还确保成纤维细胞的吸引力。这些成纤维细胞最终导致肉芽组织的形成。例如,在治疗奶牛的情况下,可能会形成瘢痕组织而不是产乳组织。因此,奶牛的产乳量可能低于炎症前。

[0148] 除了本文所述的化合物之外,可进一步给予其它抗炎药物以抑制炎症反应并减少组织损伤。在优选的实施方式中,本文公开的治疗(治疗性和预防性)进一步包括给予抗炎剂。抗炎剂包括例如非甾体抗炎剂(cox/lox抑制剂),诸如布洛芬、扑热息痛、阿司匹林、双氯芬酸、酮洛芬、托美丁、依托度酸和非诺洛芬。也可使用天然抗炎剂,诸如姜黄素、生姜、螺旋藻、卡宴辣椒(Cayenne)、肉桂、丁香、鼠尾草、迷迭香、黑胡椒、天然阿司匹林、乳香(Boswellia)、血根草(Sanguinaria)和/或绿茶。在一些实施方式中,本文公开的方法和用途包括本文公开的治疗性有机硫化合物与抗炎剂的联合治疗。该化合物可以共同给予或分开给予。在一些实施方式中,提供了包含本文公开的治疗性有机硫化合物和抗炎剂的组合物。

[0149] 在一些实施方式中,该方法包括向有此需求的个体给予包含本文公开的化合物的组合物,优选地诸如以预防或减少生物膜形成或生长、降解或减少生物膜、和/或治疗或预防感染(尤其是细菌或真菌感染)。在一些实施方式中,可以将组合物给予个体以治疗(例如,治疗剂)或预防(例如,预防剂)疾病或病症或感染。在一些实施方式中,个体患有生物膜相关感染或处于发生生物膜相关感染的风险中。

[0150] 该组合物可给予任何个体,尤其是动物。优选地,该动物是反刍动物(诸如奶牛和山羊),更优选奶牛。在一些实施方式中,该动物不是奶牛。优选地,动物是非反刍动物(诸如单胃动物、啮齿动物、非人灵长类动物、猪、马、犬、猫或禽类)。在优选的实施方式中,动物是人。在一些实施方式中,动物是非人动物。在一些实施方式中,动物不是水生动物(诸如鱼)、软体动物和甲壳类动物。优选地,动物是哺乳动物或鸟类。

[0151] 虽然不希望受到理论的束缚,本公开提供了本文公开的组合物在单次给予后能产生有利效果。在优选的实施方式中,通过提供本文公开的组合物的单次口服给予来达到效果。此类口服给予可以是例如供本文公开化合物延长释放的片剂。

[0152] 本公开还提供了多次给予。例如,可以每天(per day)、每日(daily)、每周或每月多于一次以提供组合物。在示例性实施方式中,可以每天一次提供组合物,持续一周或直到症状减轻。

[0153] 可改变本文描述的药物制剂的实际剂量水平,以获得对于特定患者、组合物和给予模式能有效实现所需治疗应答且对患者无毒性的活性分量。所选剂量水平取决于多种因素,包括特定化合物的活性,给予途径,给予时间,所用特定化合物的排泄率,治疗持续时间,组合使用的其他药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病症、整体健康状况和先前病史,以及医学领域熟知的类似因素。具有本领域普通技能的医师或兽医可容易地测定并开出所需药物组合物的有效量。

[0154] 技术人员意识到,较小的动物具有较高的代谢率,因此较小的动物需要基于体重的较大药物剂量。动物间以及人类与动物间的剂量转换在以下进行综述:Nair和Jacob(J Basic Clin Pharm.2016年3月-2016年5月;7(2):27-31)和Holliday等(1967代谢率与体重和器官大小的关系(The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size).综述.Pediatr.Res.1:185-195)。

[0155] 在本文公开的方法和用途的一些实施方式中,向人类提供至少5mg/天的本文公开的化合物(诸如通过口服给予)。优选地,提供至少10mg/天的化合物。在一些实施方式中,以0.1mg/kg至100mg/kg的剂量向人类提供本文公开的化合物。当全身(例如口服)提供化合物时,这种量的化合物尤其有用。技术人员将认识到,当局部给予时(例如,在皮肤、牙龈、伤口上),可以使用较低的量。优选地提供本文公开的组合物,持续至少一周或直至症状减轻。虽然此类组合物可提供数次(例如,每周一次、每月一次、每年两次等),但在单次使用后即可观察到预防和治疗效果。

[0156] 在一些实施方式中,将1-50g本文公开的化合物给予奶牛,例如用于治疗乳腺炎。优选地,给予至少5g化合物。

[0157] 在一些实施方式中,提供了组合物,其包含本文公开的化合物以及一种或多种其它药剂,诸如抗生素(例如,抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂)、抗炎剂、退热剂和止痛剂。

[0158] 在一些实施方式中,本文公开的化合物与抗微生物剂(诸如抗真菌药或抗生素)一起使用。虽然不希望受理论的束缚,但本公开提供的本文公开化合物靶向生物膜。然后,抗菌药可以对剩余的浮游细胞以及破坏的生物膜中的微生物细胞发挥作用。如技术人员将理解的,抗微生物剂与本文描述的化合物的组合可以减少抗微生物剂的剂量和/或剂量频率。

[0159] 可用于联合治疗的示例性抗微生物剂包括抗真菌剂,诸如咪康唑、酮康唑、益康唑、特比萘芬、环吡酮、托萘酯、舍他康唑、磺康唑、两性霉素b、氯二甲酚、氯碘羟喹、布替萘芬、萘替芬、制霉菌素和克霉唑。示例性抗生素包括青霉素类、四环素类、头孢菌素类、喹诺酮类、林可霉素类、大环内酯类、磺酰胺类、糖肽类、氨基糖苷类和碳青霉烯类。

[0160] 本公开提供了包含本文公开的化合物以及抗微生物剂的组合物。正如技术人员将理解的,化合物和抗微生物剂也可以分开提供。在一些实施方式中,化合物和抗微生物疗法重叠。在一些实施方式中,用本发明的化合物进行的治疗先于抗微生物疗法。

[0161] 在一些实施方式中,本文公开的组合物作为食品或在食品中或作为功能性食品提供。如本文所用,术语“功能性食品”是指那些不仅为了其营养特性而制备的食品,而且还为了实现特定功能(诸如改善健康或降低感染疾病的风险)。此类功能性食品也可称为膳食补充剂或(动物)食品添加剂。为此,向其中添加生物活性化合物(诸如矿物质、维生素、脂肪酸、具有有益作用的细菌、膳食纤维和抗氧化剂等)。此类食品可以是适合口服摄入的任何形式,例如液体、凝胶、粉末、丸剂、片剂或凝胶胶囊的形式。

[0162] 功能性食品还可以包括动物消化物,例如由清洁且未分解的动物组织的化学和/或酶水解产生的任何材料。功能性食品还可以包括干燥的啤酒酵母,例如作为酿造工业副产品的干燥的、无活性的试剂。人们发现动物消化物和干啤酒酵母可以增强功能性食品的适口性。当存在于功能性食品中时,动物消化物占功能性食品约10%至约90%,干啤酒酵母占功能性食品约1%至约30%。

[0163] 在一些实施方式中,本公开提供组合物,其包含本文公开的治疗性有机硫化合物

以及至少一种药学上可接受的运载体、稀释剂和/或赋形剂。(参见,例如《雷明顿:药物科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),Alfonso R.Gennaro(编辑) 马克出版公司(Mack Publishing Company),1997年4月)。如本文所用,术语“药学上可接受的”是指合理医疗判断范围内的那些组合物或试剂、材料或组合物和/或其剂型的组合,其适用于接触人体和动物的组织而不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应或与合理的效益/风险比相适应的其它问题或并发症。此外,如本文所用,术语“药学上可接受的稀释剂或运载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载剂(诸如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料),其参与将肽从身体的一个器官或部分携带或运输到身体的另一器官或部分。

[0164] 药物组合物可以通过任何合适的途径和模式给予。本领域技术人员理解,取决于所需结果,给予途径和/或模式会有所不同。药物组合物可以根据常规程序配制,用于任何途径给予(诸如胃肠外、局部(包括眼部)、口服、舌下、经皮或通过吸入)。胃肠外给予包括例如静脉内、肌内、动脉内、冠状动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。优选的途径是口服或局部给予。

[0165] 该组合物可以是任何合适的形式(诸如液体、半固体和固体剂型)。组合物可以是片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、锭剂、霜剂或液体制剂(具体是用于给予皮肤或眼睛)的形式,诸如无菌肠胃外溶液或混悬剂或喷雾剂、气溶胶的形式或其它常规吸入方法。本发明的药物组合物包括适合于口服、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外给予的那些。在具体实施方式中,组合物是乳膏、凝胶、软膏、洗剂、泡沫、悬浮液、喷雾剂、气溶胶或粉末气溶胶形式的局部组合物。该组合物尤其适用于皮肤给予。合适的组合物还包括口腔护理组合物,例如牙膏、洁牙剂、牙粉、牙胶、龈下凝胶、口腔漱洗液(mouthrinse)/漱口水(mouthwash)、人工唾液、假牙产品、口腔喷雾剂、锭剂、口腔片剂和口香糖。

[0166] 本公开还提供如本文公开的组合物的体外用途,其用于预防或减少表面上的生物膜形成或生长和/或用于降解或减少表面上的生物膜。优选地,该方法用于减少表面上的生物膜或生物膜形成。在一些实施方式中,该方法包括将附着于表面的生物膜与本文公开的组合物接触。该组合物包括例如清洁组合物。用于清洁(或者更确切地说去除或减少)生物膜的组合物是本领域已知的并且可以包括表面活性剂和酶(例如蛋白酶和多糖酶)。

[0167] 可以用本文公开的组合物处理任何表面以涂覆此类表面。例如,可以将表面喷洒、浸入或浸泡在组合物中。表面包括玻璃、金属、多孔和无孔表面。它还涉及可能被污染的设备的外部、内部和表面(诸如食品工业中的设备或医院和医疗保健机构中的医疗设备,以及管道系统(例如水槽排水管))、台面、建筑材料、管道系统、洁净室。表面还指管道的内部或外部,例如排水管,以及游泳池、水箱(例如,用于水产养殖)、净化过滤器、马桶、水槽、温室中的表面。表面还包括水,诸如来自饮水槽的水。

[0168] 在一些实施方式中,该表面是医疗装置的表面,诸如假体(髌植入物、牙植入物、假体关节、发声假体、阴茎假体)、机械心脏瓣膜、心脏起搏器、动静脉分流器、巩膜带扣、导管(例如,中心静脉导管、血管内导管、导尿管、希克曼导管、腹膜透析导管、气管内导管)、鼓膜造口管、气管造口管、手术缝合线、骨锚、骨螺钉、眼内晶状体、隐形眼镜、宫内节育器、主动脉股动脉移植物或血管移植物。其它医疗装置感染包括那些来自以下的感染:腹腔引流管、

胆道支架、乳房植入物、心脏起搏器、脑脊液分流器、隐形眼镜、除颤器、假牙、电透析器、气管插管、留置导尿管、宫内节育器、静脉导管、关节假体、机械心脏瓣膜、肾造口管、矫形植入物、腹膜透析导管、人工心脏瓣膜、假体关节同种异体矫形装置、组织填充物、尿道支架、血管假体、呼吸机相关性肺炎、心室辅助装置、心室衍生体、心室分流体和发声假体。

[0169] 在一些实施方式中,该表面是手术装置(诸如夹子、镊子、剪刀、皮肤钩、管子、针、牵开器、洁牙器、钻头、凿子、锉刀或锯)的表面。

[0170] 如本文所用,“包括/包含”及其词形变化以其非限制性意义使用,意指包括该词之后的项目,但不排除未具体提及的项目。此外,“由……组成”可以“基本上由……组成”代替,意指本文定义的化合物或辅助化合物可以包含除具体测定的化合物之外的其他组分,所述其他组分不会改变本发明的独特特征。

[0171] 如本文所用,冠词“一”和“一个/种”是指一个/种或超过一个/种(即至少一个/种)该冠词的语法对象。举例而言,“一个元素”表示一个元素或者多于一个元素。

[0172] 当与数值(约10,大约10)联用时,词语“约”或“大约”优选表示该值可以是比给定值10大或小1%的值。

[0173] 本文公开的化合物和组合物可用于疗法和治疗性治疗,并且因此可用作药物并用于制备药物的方法中。在一些实施方式中,本公开提供不对人体或动物体进行治疗的方法和/或不包括用于修饰人类种系遗传特性的过程的方法。

[0174] 其中,细胞不是人类生殖细胞系。

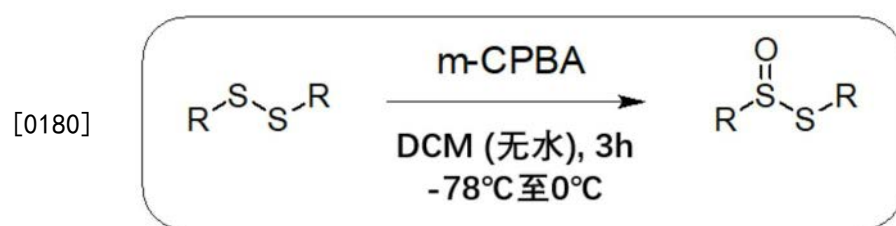
[0175] 本说明书中引用的所有文献和专利参考文献,其全部内容通过引用纳入本文。

[0176] 以下实施例中进一步解释本发明。这些实施例并不限制本发明的范围,而仅用于阐明本发明。

[0177] 实施例

[0178] 实施例1:硫代亚磺酸盐的化学合成

[0179] 合成对称脂肪族硫代亚磺酸盐的一般程序是众所周知的(参见,例如,J Am Chem Soc;1947;69;1710-1713)。反应流程如下所示,其中对于化合物1,两个R均为乙基;对于化合物2,两个R均为丙基;对于化合物3,两个R均为丁基。



[0181] 起始材料从以下供应商获得。二硫化物(二乙基二硫化物、二丙基二硫化物和二丁基二硫化物)购自TCI,m-CPBA和硫酸镁购自西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich),碳酸氢钠购自赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),二氯甲烷购自拉斯伯恩公司(Rathburn)。

[0182] 将二硫化物(16.36mmol)在 N_2 气氛下于 -78°C 溶解在无水二氯甲烷(DCM,30mL)中,然后逐滴添加溶解在无水DCM(30mL)中的间氯过氧苯甲酸(m-CPBA,16.36mmol)。添加完成后,将反应物搅拌3小时,缓慢升温至 0°C 。用饱和碳酸氢钠猝灭反应,并用DCM萃取所得水性溶液3次。然后将合并的有机部分用无水 MgSO_4 干燥并减压蒸发溶剂。然后通过自动快速色谱法纯化粗产物(40g二氧化硅,30:70%乙酸乙酯:庚烷,20分钟,28mL/分钟)。使用 KMnO_4 染

色通过薄层色谱 (TLC) 检测产物。将含有产物的级分合并,并在40℃下真空蒸发溶剂,得到纯产物(化合物1-3),通过¹H-NMR对其进行分析。

[0183] 化合物1:S-乙烷亚磺基硫代酸乙酯(硫代亚磺酸二乙酯)

[0184] 产率:54%,呈黄色油状;¹H-NMRδ(400MHz,CDCl₃):3.25-3.05(4H,m,0=SCH₂,SCH₂),1.46(3H,t,J=7.2Hz,0=SCH₂CH₃),1.40(3H,t,J=7.6Hz,SCH₂CH₃)ppm。

[0185] 化合物2:S-丙基丙烷-1-硫代亚磺酸酯(硫代亚磺酸二正丙酯)

[0186] 产率:49%,呈黄色油状;¹H-NMRδ(400MHz,CDCl₃):3.18-3.00(4H,m,0=SCH₂,SCH₂),1.90-1.72(4H,m,0=SCH₂CH₂,SCH₂CH₂),1.06(3H,t,J=7.2Hz,(0=SCH₂CH₂CH₃),1.01(3H,t,J=7.6Hz,SCH₂CH₂CH₃)ppm。

[0187] 化合物3:S-丁基丁烷-1-硫代亚磺酸酯(硫代亚磺酸二正丁酯)

[0188] 产率:51%,呈黄色油状;¹H-NMRδ(400MHz,CDCl₃):3.10-2.90(4H,m,0=SCH₂,SCH₂),1.75-1.58(4H,m,0=SCH₂CH₂,SCH₂CH₂),1.45-1.28(4H,m,0=SCH₂CH₂CH₂CH₃,SCH₂CH₂CH₂CH₃),0.84(3H,t,J=7.2Hz,0=SCH₂CH₂CH₂CH₃),0.81(3H,t,J=7.6Hz,SCH₂CH₂CH₂CH₃)ppm。

[0189] 实施例1b

[0190] 实验设计:二硫化物的氧化导致相应的硫代亚磺酸盐和硫代磺酸盐的形成。对于氧化反应,使用市售的二硫化物,并使用间氯过氧苯甲酸(mcpba)作为有机合成中的氧化剂。这导致相应的硫代亚磺酸盐的形成。

[0191] 合成对称硫代亚磺酸盐的一般程序(J Am Chem Soc;1947;69;1710-1713)。将二硫化物(16.36mmol)在N₂气氛下于-78℃溶解在无水DCM(二氯甲烷30mL)中,然后逐滴添加溶解在无水DCM(30mL)中的m-CPBA(间氯过氧苯甲酸16.36mmol)。添加完成后,将反应物搅拌3小时,缓慢升温至0℃。用饱和碳酸氢钠猝灭反应,并用DCM萃取所得水性溶液3次。随后将合并的有机部分用无水MgSO₄干燥并减压蒸发溶剂。然后用自动快速法(供应商:泰勒迪埃克公司(Teledyne Isco))提纯粗产品。使用KMnO₄染色通过薄层色谱(TLC)检测产物。将含有产物的级分合并,并在40℃下真空蒸发溶剂,得到纯产物,通过¹H-NMR对其进行分析。备注:蒸发脂肪族、F-芳基和杂环类似物的溶剂时要尤其注意。温度保持较低(约25℃),以防止由于挥发而降解或蒸发。

[0192] 合成对称硫代磺酸盐的一般程序(Chem. Eur. J. 2015, 21, 8105)。在30℃下,向乙酸(2.34ml)中添加二硫化物(0.012mol),随后在大约5分钟内添加过氧化氢(30重量%,10.89ml)。将温度升至55℃并将反应物在此温度下搅拌约4小时。将反应冷却至室温并用5M NaOH处理直至pH为碱性。此后,用DCM萃取原料3次。合并的有机萃取物经无水MgSO₄干燥并减压蒸发溶剂以获得粗混合物。此后,通过自动快速法(泰勒迪埃克公司)进行纯化(表1和2)。使用KMnO₄染色通过TLC检测产物,合并含有产物的级分,真空蒸发溶剂以得到纯产物,将其通过¹H-NMR分析。备注:对于脂肪族和杂环族,添加氧化剂后反应温度设定为40℃。

[0193] 根据Angew. Chem. Int. Ed., 2018, 57, 12290-12293制备S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯。

[0194] 结果当在乙酸存在下使用过氧化氢作为氧化剂时,形成相应的硫代磺酸盐。大多数化合物是在标准反应条件下合成的,具有良好至中等的产率(表1)。与芳基取代物相比,一些物质(尤其是脂肪族和杂环族)在硫代磺化过程中需要较好的反应条件才能得到一些

反应产物。与其它芳基取代的类似物相比,苄基取代的反应性更强,这可能是在尝试的反应条件下反应产物低的原因。由于溶解度问题,杂环类似物(二硫化二苯并噻唑)没有发生反应,并产生具有不溶性固体的焦油。尝试在两种溶剂(二氯甲烷和氯仿)中进行其硫代亚磺酸盐的反应,得到相同的结果。尝试在升高的温度下进行相应的硫代磺酸盐的反应也没有成功。由于不稳定,甲基糠基二硫的氧化也是个问题。它产生少量的硫代亚磺酸盐,而相应的硫代磺酸盐的反应产生焦油。

[0195] 最初使用反相色谱对合成的F-芳基硫代亚磺酸盐/硫代磺酸盐进行纯化,并通过¹H NMR进行分析(表1和2)。

[0196] 这些化合物在高温下不稳定,并且在后处理过程中会降解。因此,它们被重新合成并通过二氧化硅色谱纯化。

[0197]

表1：对称硫代亚磺酸盐合成过程中的产率、纯化和¹H NMR检测。
n.a.: 由于商购可得性而不适用
* 表示: 40克硅胶柱; EtOAc:石油醚为液相

取代基	相应的硫代亚磺酸盐	通过快速色谱法纯化	通过 ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)分析	产率 (%) / 外观
丙基	硫代亚磺酸二正丙酯	Si 40gr, EtOAc: 石油醚 *	δ 3.18-3.00 (m, 4H), 1.90-1.72 (m, 4H), 1.06 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.01 (t, 3H, J=7.6 Hz) ppm	40/无色油状
乙基	硫代亚磺酸二乙酯	Si 12gr, EtOAc: 石油醚	δ 3.25-3.05 (m, 4H), 1.46 (t, 3H, J=7.2 Hz), 1.40 (t, 3H, J=7.6 Hz) ppm	54/黄色油状
丁基	硫代亚磺酸二正丁酯	Si 40gr, EtOAc: 石油醚	δ 3.10-2.90 (m, 4H), 1.75-1.58 (m, 4H), 1.45-1.28 (m, 4H), 0.84 (t, 3H, J=7.2 Hz), 0.81 (t, 3H, J=7.6 Hz) ppm	49/无色油状
异丙基	S-异丙基丙烷-1-硫代亚磺酸酯	Si 12gr, EtOAc: 石油醚	δ 3.60 (hept, 1H, J=6.8 Hz), 3.18 (hept, 1H, J=6.8 Hz), 1.42-1.48 (m, 6H), 1.33-1.37 (m, 6H) ppm	45/淡黄色油状
苯基	硫代亚磺酸二苯基酯	C18 15.5gr, ACN: H ₂ O	δ 7.66 (dd, J = 6.8, 2.8 Hz, 2H), 7.56-7.36 (m, 8 H) ppm	36/黄色固体
F-芳基	双(4-氟苯基)硫代亚磺酸酯	Si 40gr, EtOAc: 石油醚	δ 7.62-7.58 (m, 2H), 7.46-7.42 (m, 2H), 7.18 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 7.08 (t, J = 8.4 Hz, 2H) ppm	25/黄色固体

[0198]

氯芳基	双(4-氯苯基)硫代亚磺酸酯	C18 15.5 gr, ACN:H2O	δ 7.58-7.54 (m, 2H), 7.49-7.46 (m, 2H), 7.43-7.35 (m, 4H) ppm	22/白色固体
CH3O-芳基	双(4-甲氧基苯基)硫代亚磺酸酯	C18 15.5gr, ACN:H2O	δ 7.58 (d, J= 8.4Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.4Hz, 2H), 6.91 (d, J =8.4Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H) ppm	37/浅黄色固体
甲基	双(对甲基苯基)硫代亚磺酸酯	C18 15.5gr, ACN:H2O	δ 7.59 (d, J= 8.0 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.0Hz, 2H), 7.21 (d, J =8.0Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.41 (s, 3H) ppm	14/浅黄色固体
苄基	硫代亚磺酸二苄酯	C18 15.5gr, ACN:H2O	δ 7.40-7.34 (m, 10H), 4.35-4.30 (m, 4H) ppm	17/浅粉色固体
糠基	二糠基硫代亚磺酸酯	Si 40gr, EtOAc: 石油醚	δ 7.42 (dd, J = 0.8, 2.0 Hz, 2H), 6.36 (dd, J = 1.6, 3.2 Hz, 2H), 6.26 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 4H) ppm	56/棕色油状

表2：对称硫代磺酸酯的合成产率
n.a.: 由于商购可得性而不适用
* 表示：40克硅胶柱； EtOAc:石油醚为液相

取代基	相应的硫代磺酸盐	通过快速色谱法纯化	通过1H NMR (400 MHz, CDCl ₃)分析	产率(%)/ 外观
丁基	硫代磺酸二正丁酯	C18 15.5gr,	δ 3.30 t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.13(t, J = 7.6Hz, 2H),	20/ 无色油

[0199]

		ACN:H ₂ O	1.91-1.87 (m, 2H), 1.76-1.67 (m, 2H), 1.51-1.41 (m, 2H), 0.97, J = 7.6Hz, 3H), 0.93 (t, J = 7.6Hz, 3H) ppm	状
异丙基	D-异丙基硫代磺酸酯	Si 12 gr, EtOAc: 石油醚	δ 3.65 - 3.62 (m, 1H), 3.23 - 3.2 (m, 1H), 1.50-1.47 (m, 6H), 1.41-1.38 (m, 6H) ppm	6/淡黄色油状
F-芳基	双(4-氟苯基)硫代磺酸酯	C18 15.5gr, ACN:H ₂ O	δ 7.63-7.60 (m, 2H), 7.41-7.37 (m, 2H), 7.17-7.06 (m, 4H) ppm	26/灰白色固体
氯芳基	双(4-氯苯基)硫代磺酸酯	C18 15.5gr, ACN:H ₂ O	δ 7.54-7.52 (m, 2H), 7.44-7.42 (m, 2H), 7.37-7.31 (m, 4H) ppm	5/灰白色固体
CH ₃ O-芳基	双(4-甲氧基苯基)硫代磺酸酯	Si 40gr, EtOAc: 石油醚	δ 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.8 Hz, 2H) ppm	18/浅黄色固体
苄基	硫代磺酸二苄酯	C18 15.5gr, ACN:H ₂ O	δ 7.44- 7.39 (m, 5H), 7.31-7.31 (m, 5H), 4.25 (s, 2H), 4.07 (s, 2H) ppm	9/. 白色固体

[0200] 实施例2: MIC和生物膜试验

[0201] 本实施例中的MIC试验测量浮游微生物的生长抑制。如本文所示, 许多测试的化合

物显示出对浮游细菌的作用。

[0202] 如技术人员将理解的,化合物针对浮游微生物的作用并不表明此类化合物针对生物膜的作用。正如本文前文所讨论的,这一点已在许多抗微生物剂中得到证实,在文献中也是公知的。参见,例如Roy等表明生物膜中的细菌对常规抗生素的耐药性增加了约1000倍(2018Virulence 9:522-554)。

[0203] 与针对浮游微生物的研究不同,本实施例中的生物膜根除试验展示了化合物对生物膜的作用。

[0204] 在生物膜试验中,化合物的主要作用机制被认为与抑制群体感应和随后的集体基因转换有关,从而导致细菌粘附和细胞外基质的合成或组装以形成生物膜的三维结构。这些机制与纯粹的抗菌/抗微生物“杀灭”效果完全不同。

[0205] 如果化合物在生物膜试验中测试有效,但没有抗菌效果,那么可以将该化合物与抗生素结合使用,以确保能杀死从生物膜中释放出来的细菌。如果动物的免疫系统受到损害,情况尤其如此。不过,此类化合物在特别针对生物膜方面也尤其有用,但对例如健康的肠道菌群等几乎没有影响。尤其优选此类化合物。

[0206] 表3:本研究中使用的化合物CAS号和供应商。

[0207]

化合物	CAS号	供应商
二甲基二硫	624-92-0	西格玛奥德里奇公司
二乙基二硫	110-81-6	西格玛奥德里奇公司
二正丙基二硫	629-19-6	西格玛奥德里奇公司
二正丁基二硫	629-45-8	默克(Merck)
二苯基二硫	882-33-7	西格玛奥德里奇公司
二异丙基二硫	4253-89-8	阿克洛斯(Acros)
二苄基二硫	150-60-7	TCI
双(4-氟苯基)二硫	405-31-2	飞世尔科学公司 (Fischer Scientific)
甲基丙基二硫	2179-60-4	TCI

[0208]

双(4-甲氧基苯基)二硫	5335-87-5	赛默飞世尔
对甲苯基二硫	103-19-5	西格玛奥德里奇公司
二糠基二硫	4437-20-1	TCI
双(4-氯苯基)二硫	1142-19-4	赛默飞世尔
二己基二硫	10496-15-8	商购可得
双正癸基二硫	10496-18-1	商购可得
硫代亚磺酸二正丙酯	1948-52-3	有机合成
双(对甲苯基)硫代亚磺酸酯	6481-73-8	有机合成
硫代磺酸二苯基酯	1208-20-4	有机合成
硫代亚磺酸二异丙酯	38739-06-9	有机合成
硫代亚磺酸二苄酯	16302-98-0	有机合成
双(4-氯苯基)硫代亚磺酸酯	6481-72-7	有机合成
双(4-氟苯基)硫代亚磺酸酯	61169-14-0	有机合成
S-癸基-1-癸烷硫代亚磺酸酯	56527-90-3	有机合成
硫代磺酸二正丙酯	1113-13-9	辛科姆(Syncom)
硫代磺酸二甲酯	2949-92-0	西格玛奥德里奇公司
硫代磺酸二苯基酯	1212-08-4	西格玛奥德里奇公司
硫代磺酸二异丙酯	10027-69-7	有机合成
硫代磺酸二苄酯	16601-40-4	有机合成
双(4-氯苯基)硫代磺酸酯	1146-44-7	有机合成
双(4-氟苯基)硫代磺酸酯	2905-15-9	有机合成
S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯	90494-81-8	有机合成

[0209] 1.1化合物的溶解和稀释

[0210] 在Eppendorf管中称重10-20mg如表3所示的化合物。记录下准确的称量,并计算出达到80mM稀释度的溶剂体积。先添加一半体积的Tween 80。第二步,添加另一半体积的DMSO,将封闭的试管倒置5-10次,然后彻底涡旋至少30秒。如果在此过程后仍能看到未溶解的材料,则将试管放在振荡器中于37℃以150rpm处理至少30分钟。溶解的透明稀释液的浓度为80mM,并用具有阳离子调节的穆勒辛顿肉汤(MHB-II)稀释10倍,用于MIC试验(方法1.2)。对于MBEC试验(方法1.3),需要将溶液稀释至终浓度为在0.9%盐水溶液中的2mM,然后进一步稀释为在盐水中的1mM、0.5mM、0.25mM和0.125mM。将这些稀释液添加到具有生长的生物膜的96孔板中作为处理(参见方法3)。

[0211] 1.2MIC试验

[0212] 将表皮葡萄球菌ATCC 35984和铜绿假单胞菌ATCC 27853的冷冻等分部分用于接种胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)平板,并在37℃下孵育过夜。孵育后,从TSA板中选择具有相同形态的3-5个分离良好的菌落,并用3-6个玻璃珠重悬于2mL 0.9%盐水溶液中并涡旋。使用分

光光度计 (Evolution™201/220紫外可见分光光度计,赛默飞世尔科技科技公司(Thermo Fisher Scientific))测量细菌悬浮液在600nm处的光密度(OD₆₀₀),并稀释至OD₆₀₀为0.0008,相当于10⁶CFU/mL。

[0213] MIC试验在平底96微量滴定板中进行。将50μL MHB-II添加到第2-11列中,将100μL添加到第12列中以进行无菌对照。在第1列中添加100μL 8mM的测试化合物溶液(方法1)。通过将50μL的8mM溶液从第1列重悬浮到第2列,实现了MHB-II中溶液的两倍稀释系列。该步骤一直重复到第10列。第1列中Tween 80和DMSO的浓度分别为2.5%,在整个平板中稀释了两倍。在1-11列中添加50μL细菌悬浮液。将微量滴定板用粘合聚乙烯膜(多元化生物科技(Diversified Biotech))以密封微孔板,并在37°C下孵育24小时。孵育后,使用Varioskan(赛默飞世尔科技公司)测量600nm处的OD。将所获得的OD值与第11列中的生长对照标准化后,计算导致细菌培养物最终OD₆₀₀降低50%(MIC₅₀)和90%(MIC₉₀)的最小浓度。该试验在三个独立实验中重复三次。

[0214] 1.3MBEC试验

[0215] 将表皮葡萄球菌ATCC 35984和铜绿假单胞菌ATCC 27853的冷冻等分部分用于在37°C和150rpm下将20mL胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)接种到100mL锥形瓶中,并孵育过夜(伊孚森(Infors))。用分光光度计(Evolution™201/220紫外-可见分光光度计,赛默飞世尔科技公司)测量过夜培养物的OD₆₀₀,并将OD₆₀₀稀释至0.2,相当于10⁸CFU/mL。用移液管将OD₆₀₀=0.2的细胞悬浮液移入U形底96孔板的第1-11列,100μL/孔,第12列添加100μL培养基作为无菌对照。96孔板用粘合聚乙烯膜密封以密封微孔板,并在37°C的静态条件下培养48小时。生物膜生长阶段结束后,向小瓶中添加100μL的处理溶液(方法1),处理浓度分别为1mM、0.5mM、0.25mM和0.125mM,Tween 80和DMSO的浓度分别各自为0.63%、0.32%、0.16%和0.08%。在有同一菌株的四个不同孔中使用相同浓度,各浓度和菌株四重复。在37°C的静态条件下培养20小时。处理后,仔细去除上清液,用200μL 0.9%盐水溶液仔细清洗有生物膜的孔一次。添加200μL盐水溶液并彻底重悬生物膜。完全均质化后,用20μL在180μL 0.9%盐水溶液中进行第一次稀释,盐水是在第二个平板中准备的。继续稀释至稀释步骤10E-5,并将100μL的10E-4和10E-5稀释铺板在TSA平板上。将TSA平板在37°C下孵育24小时。计数平板上的菌落,计算分配的生物膜的每毫升菌落形成单位及其平均值,以及与来自相同孔板的未处理样品相比的对数减少。菌落形成单位的减少与生物膜的厚度密切相关,从而与生物膜中存在的细菌数量密切相关。因此,生物膜中菌落形成单位的显著减少被定义为对数减少值≥1或更多。该试验在两个独立实验中重复两次。

[0216] 1.4MBIC试验

[0217] 将表皮葡萄球菌ATCC 35984和铜绿假单胞菌ATCC 27853的冷冻等分部分用于接种胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)平板,并在37°C下孵育过夜。孵育后,从TSA板中选择具有相同形态的3-5个分离良好的菌落,并用3-6个玻璃珠重悬于2mL 0.9%盐水溶液中并涡旋。使用分光光度计(Evolution™201/220紫外可见分光光度计,赛默飞世尔科技科技公司)测量细菌悬浮液在600nm处的光密度(OD₆₀₀),并稀释至OD₆₀₀为0.2。MBIC试验在96孔微量滴定板中进行。将50μL TSB添加到第2-11列中,将100μL添加到第12列中以进行无菌对照。在第1列中添加100μL 8mM的测试化合物溶液(方法1)。通过将50μL的8mM溶液从第1列重悬浮到第2列,实现了TSB中溶液的两倍稀释系列。该步骤一直重复到第10列。第1列中Tween 80和DMSO的浓

度分别为2.5%，在整个平板中稀释了两倍。在1-11列中添加50 μ L细菌悬浮液。将微量滴定板用粘合聚乙烯膜(多元化生物科技(Diversified Biotech))以密封微孔板,并在37 $^{\circ}$ C下孵育48小时。孵育后,仔细去除上清液,用100 μ L 0.9%盐水溶液清洗有生物膜的孔一次。添加100 μ L 0.1M HCl,室温孵育1小时以固定生物膜。孵育后,除去HCl,添加100 μ L结晶紫(0.1% v/v于水中),并在室温下孵育30分钟。除去未结合的结晶紫,并用100 μ L软化水将孔清洗一次。添加100 μ L 30%乙酸并在37 $^{\circ}$ C下以150rpm孵育1小时。将溶液重悬并转移至平底96孔板中,用分光光度计测量540nm处的吸光度。该试验在两个独立实验中重复两次。

[0218] 结果和讨论表4列出了测试结果。

[0219] 当生物膜被根除或降解时,微生物就会释放到环境中。如果生物膜存在于体内(例如人或动物体内),则释放的微生物可能会受到免疫系统的攻击。本体外系统的优势在于,它提供了研究试剂对生物膜和相应微生物本身影响的机会,而不会受到环境(例如免疫系统)的其它影响。

[0220] 表4显示,一些有机硫化合物的MIC值较低,而MBEC值较高。表4还列出了一些MIC值很高而MBEC值很低的化合物。这是非常出人意料的结果。这表明表皮葡萄球菌和铜绿假单胞菌的生长不受这些有机硫化合物的影响,相反,这些化合物对生物膜有很强的抑制作用。

[0221]

表4.MIC-和生物膜试验的结果。MIC50和MIC90被定义为与不含测试化合物的培养物相比，导致细菌培养物的最终OD₆₀₀降低50% (MIC50)和90% (MIC90)的最小浓度。

类别	化合物	表皮葡萄球菌		铜绿假单胞菌		表皮葡萄球菌	铜绿假单胞菌	表皮葡萄球菌	铜绿假单胞菌	表皮葡萄球菌	铜绿假单胞菌
		MIC 50 [mM]	MIC 90 [mM]	MIC 50 [mM]	MIC 90 [mM]						
二烷基二硫	二甲基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1	对数减少≥1的 MBEC mM	对数减少≥1的 MBEC mM	MBIC90 [mM]	MBIC90 [mM]
	二乙基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	二正丙基二硫	>4	>4	>4	>4	>4	>4			4	>4
	二正丁基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	二苯基二硫	0.125	>4	2	>4	>1	>1	0.125	0.125		
	二异丙基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	二苄基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	甲基丙基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	双(4-甲氧基苯基)二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	对甲苯基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1	>1	>1	>4	4

[0222]

	二糠基二硫	2	>4	2	>4	>1	>1	>1	>1	>4	>4
	二己基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1	>1	>1	>4	>4
	双正癸基二硫	>4	>4	>4	>4	>1	>1	>1	>1	>4	>4
卤代二烷基二硫	双(4-氯苯基)二硫	0.01	0.03	0.02	0.03	>1	>1	>1	>1	>4	>4
	双(4-氟苯基)二硫	0.06	0.06	0.125	0.25	>1	>1	>1	>1	>4	>4
硫代亚磺酸二烷基酯	硫代亚磺酸二正丙酯	0.25	0.5	1	2	2	4	>4	>4	2	>4
	双(对甲苯基)硫代亚磺酸酯	0.125	0.25	0.125	0.25	1	1	>4	>4	>4	>4
	硫代亚磺酸二苯基酯	1	1	1	1	2	2	>4	>4	>4	>4
	硫代亚磺酸二异丙酯	2	2	2	4	0.5	0.125	>4	>4	>4	>4
	硫代亚磺酸苄酯	0.03	0.03	0.06	0.5	1	0.125	>4	>4	>4	>4
	S-癸基-1-癸烷硫代亚磺酸酯	>4	>4	>4	>4	>1	>1	>1	>1	>4	>4
卤代硫代亚磺酸二烷基酯	双(4-氯苯基)硫代亚磺酸酯	0.02	0.02	0.02	0.02	>1	>1	>1	>1	>4	>4
	双(4-氟苯基)硫代亚磺酸酯	0.125	0.25	1	4	>1	>1	>1	>1	>4	>4
二烷基硫代磺酸酯	硫代磺酸二正丙酯	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	1	2	2	0.5	>4
	硫代磺酸二甲酯	0.25	0.25	0.25	0.5	2	2	>4	>4	4	>4
	硫代磺酸二苯基酯	1	2	2	2	2	>4	>4	>4	>4	>4
	硫代磺酸二异丙酯	2	2	2	2	>1	>1	>1	>1	>4	>4
	硫代磺酸二苄酯	2	4	4	>4	0.125	0.125	>4	>4	>4	>4

[0223]

卤代二烷基硫 代磺酸酯	S-丙基-4-甲基苯硫代磺酸酯	0.06	0.13	0.06	0.06	0.06	0.5	>1		
						4				
	双(4-氯苯基)硫代磺酸酯	0.03	0.06	0.25	2	2	>1	>1		
	双(4-氟苯基)硫代磺酸酯	0.25	2	2	2	2	>1	>1		

[0224] 实施例3体内试验——乳腺炎

[0225] 为了证明本文公开的化合物的体内作用,对多种含有机硫的组合物进行了针对多

种生物膜相关病症的体内测试。牛乳腺炎是每年影响全世界数百万头奶牛的疾病。这种疾病是由多种不同的细菌引起的,在一些情况下,酵母菌也会侵入泌乳牛的乳腺,引起持续感染和炎症反应。牛乳腺炎可由各种革兰氏阳性和革兰氏阴性病原体引起,并且各病原体的流行率在不同国家和大陆之间可能存在一定程度的差异。所有形式的乳腺炎最显著的临床症状是,由于乳房组织的(慢性)炎症反应,供人类摄取的牛乳中体细胞数量出现不期望的增加。这种继发性炎症会降低牛乳产量,从而给农民造成严重的经济损失。在过去的几十年里,已经开发出许多含有不同类别抗生素的药品,单独或联合以处理乳腺炎的主要传染源。这些药品通过乳头通道全身给予(通过注射)或局部给予,以对抗细菌感染。然而,尽管做出了巨大的努力,牛乳腺炎仍然是奶牛最普遍的疾病,因为抗生素治疗通常只是暂时有效,而且在许多病因中,作为乳腺炎临床标志的体细胞数(SCC)仍然居高不下。

[0226] 众所周知,乳腺炎是生物膜相关病症。在体外实验中,在有利于细菌生物膜形成的条件下培养乳腺炎病原体(染色,并通过测量驱动生物膜形成的基因来量化),以及在受感染的牛乳房组织中对生物膜基质进行原位染色,都证明了细菌生物膜的形成。例如,**Schönborn S**和**Krömker V**(2016年Journal Veterinary Microbiology,30;196:126-128)的图1描述了患有乳腺炎的奶牛乳房组织中的生物膜基质。

[0227] 过去十年的生物医学研究表明,生物膜的形成不仅发生在乳房感染和牛乳腺炎病例中,而且是微生物侵入人类和动物组织并导致持续感染和炎症的普遍特征。迄今为止,微生物生物膜是现代人类和动物传染病治疗中尚未解决的主要难题之一。下文实例中提供的临床证据显示,一些含有机硫的组合物在治疗重要的生物膜疾病(诸如牛乳腺炎和受感染的慢性伤口(例如UCD))方面具有出乎意料的治疗效果。描述的一些实地试验的表明,这些化合物的应用与治疗牛体细胞计数的长期稳定减少直接相关,这表明了细菌治愈和组织再生。其它实例描述了对生物膜相关的慢性伤口(即乳房裂性皮炎(UCD))的影响。这些发现令人瞩目,因为人们普遍认为普通抗生素不能有效对抗生物膜感染。这些关于抗生素的观察结果已在人类和兽医学的许多科学文章中进行了描述,所有这些都表明生物膜的形成是反复和持续感染以及组织炎症和损伤的主要原因。本文描述的化合物针对典型生物膜感染的实验(体外)和体内(临床观察)功效表明,这些化合物可以有效地用于临床实践中以预防 and 解决生物膜感染。生物膜的形成和分解是分子和微生物之间直接相互作用的结果,因此独立于宿主(动物或人类)。由于涉及生物膜形成的机制在细菌种类之间高度保守,因此可以假设这些化合物对人类和动物中的广谱生物膜感染有效。这些实例还表明,这些化合物可以口服给予,并在不同的部位(例如乳腺和UCD)产生作用。

[0228] 范围

[0229] 实验研究了化合物对牛乳中细胞数或体细胞数(SCC)的作用。表5列出了受试化合物和给予总剂量。

[0230] 体细胞数(SCC)与免疫系统可见的四分之一的病原体数量有关。通过产乳登记(MPR)测量各奶牛的细胞计数。所有农场每30-40天定期进行MPR。体细胞计数(SCC)是牛乳质量的主要指标。大部分体细胞是白细胞(白血球)——通常作为对引起乳腺炎的病原体的免疫反应,白细胞在牛乳中的数量会不断增加——还有少量上皮细胞,它们是在发生感染时从乳房内部脱落的产乳细胞。

[0231] 炎症通常发生在其中一个乳房部位,导致该乳房的细胞数量增加。不过,由于乳房

其它部分的稀释作用,细胞数的总增幅较低。SCC以每毫升牛乳中的细胞数进行量化。SCC表明乳房是否受到(亚临床)病原体感染(例如乳腺炎),也是衡量牛乳质量的主要指标。Sharma等,2011Asian-Aust J Anim Sci 24:429-438中对SCC与乳腺炎的关系进行综述。

[0232] SCC数据是从牛乳生产登记(MPR)中提取的。MPR是显示每头奶牛所产牛乳的所有详细信息(例如SCC)的数据库。所选农场的MPR定期公布。SCC以每毫升牛乳中的细胞数进行量化。一般来说:SCC值为100,000或以下的奶牛表示“未感染”,亚临床乳腺炎不会造成重大的生产损失。阈值SCC超过250,000表示感染,计数在100,000至250,000之间表示感染风险较高。

[0233] 表5.口服给予奶牛的化合物及相应总量。

[0234]	测试化合物	Cas号	片剂总量(g)	检测奶牛数量
	对照	n.a.	0	1
[0235]	PTSO	1113-13-9	4.5	5
	二正丙基二硫	629-19-6	10	3
	硫代亚磺酸二正丙酯	1948-52-3	10	1
	硫代磺酸二甲酯	2949-92-0	10	1
	硫代磺酸二苯基酯	1212-06-4	10	1

[0236] n.a.:不适用

[0237] 研究设计

[0238] 实验在一个拥有90头奶牛的农场进行。使用上述片剂对细胞计数进行了60天的检测。

[0239] 选择治疗前SCC数多于250,000个细胞/ml的奶牛,给予单一片剂。

[0240] 奶牛牛乳的计数和平均体细胞数见图1。参考奶牛的SCC仍相对较高(参见图1;第0天约为673,第60天为587)。不同的是,接受硫代亚磺酸二正丙酯、硫代磺酸二甲酯或硫代磺酸二苯基酯的单一处理的奶牛SCC显著下降。由于在乳房组织中观察到了具有临床意义的效果,这表明这些化合物不仅能通过瘤胃(表明对瘤胃微生物稳定),还能到达肝后血流(表明肝脏生物转化和灭活轻微或不显著),并最终具有治疗效果的浓度进入乳腺。

[0241] 实施例4:体内测试乳房裂性皮炎

[0242] 一类慢性感染是被形成生物膜的微生物感染的伤口。一旦伤口被感染,微生物就开始形成附着在伤口上的生物膜。微生物EPS(细胞外聚合物)的产生有助于生物膜在几个小时内形成复杂的三维结构。这些复杂的结构对伤口的防御机制有抵抗力。当使用抗生素攻击细菌时,它们可能只能部分根除生物膜,伤口和下层组织仍然受到感染。已知这些生物膜会导致慢性感染和伤口不愈合。在美国,每年诊断出约1600万例的基于生物膜的新感染。因此,生物膜构成伤口愈合的主要障碍。此类伤口感染型病原微生物的实例是细菌(革兰氏阳性菌,例如金黄色葡萄球菌;链球菌;革兰氏阴性菌,例如密螺旋体属(*Treponema* spp)、

大肠杆菌、鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*)、铜绿假单胞菌;酵母/真菌,例如念珠菌属 (*Candida spp*) (白色念珠菌)、多主枝孢 (*Cladosporidium herbarum*)、丝孢酵母菌 (*Trichosporum*)、红冬孢酵母 (*Rhodospiridium*) 和马拉色菌 (*Malassezia*)。

[0243] 指趾皮炎的实例是指疣皮炎 (同义词是毛状疣 (hairy heel warts)、草莓足腐病 (strawberry foot rot)、莫特拉罗病 (mortellaro disease)、意大利足腐病 (Italian foot rot)、乳突状指疣皮炎 (papillomatous digital dermatitis)),这是导致牛跛行的感染。

[0244] 生物膜相关病症的实例是乳房裂性皮炎 (UCD),其与慢性伤口有关。在本实施例中,测试了二烷基硫代磺酸酯、二烷基硫代亚磺酸酯和二烷基二硫对受UCD影响的奶牛的作用。

[0245] UCD是位于乳房和腹壁之间或乳房前部之间前部交界处的皮肤病变。病变的外观和大小可能有所不同,但皮肤增厚、结痂、流脓和容易流血的伤口是常见的表现。由于其解剖位置以及受影响的奶牛很少表现出一般疾病体征,乳房裂性皮炎可能很难被发现。关于UCD患病率的研究很少发表,大多数只包括一个或几个牛群,主要被归类为问题牛群。这些研究中的群体内患病率在0%到22%之间变化。然而,在荷兰最近的一项研究中,纳入了20个牛群,其中3个牛群没有UCD,而其它牛群的群内体患病率在2.5%至13%之间变化 (Amersfort等,2012)。UCD的病因尚不清楚,但一些因素 (诸如乳房形态和乳房水肿) 被认为发挥了作用。奶牛因素 (诸如胎次和DIM (产乳天数)) 也与UCD相关 (Beattie和Taylor,2000, J.Brit.Cattle Vet.Assoc.8,377-380)。

[0246] 病变最常见于后肢指间裂的足底部分。密螺旋体属通常存在于大量活动性病变中。病变部位会有触痛,并可能导致临床跛行。其传染性通常会导致牛群的地方性感染,造成巨大的经济损失。

[0247] 研究设计

[0248] 进行实验以检查含有水 (对照)、测试化合物或参考化合物 (含有盐酸金霉素的CTC喷雾,获得自德克拉 (Dechra) 兽医产品) 的各种喷雾的效果。

[0249] 每次治疗将0.35mL喷雾喷洒在乳裂性伤口上。在t=0、t=3天和t=6天时每天进行治疗。这些实验结果示于表7中。表6解释了表7中使用的评估资格。

[0250] 表6.乳房裂性伤口的评估资格及相应描述。1分表示伤口最严重,10分表示伤口已完全愈合。

评估资格	描述
[0251] 1	慢性粘液性伤口,带有脓液,厚痂,明显发炎,呈白色且敏感的伤口,带有突出的肉

[0252]

2	慢性粘液性伤口，带有脓液，厚痂，明显发炎，呈白色且敏感
3	慢性粘液性伤口，带有脓液，厚痂，明显发炎，呈红色且敏感
4	粘液性伤口、厚痂、明显发炎、呈红色且敏感
5	粘液性伤口、厚痂、明显发炎、呈粉色且敏感
6	干性伤口、厚痂、明显发炎、呈粉色且敏感
7	干性伤口、厚痂、明显发炎、呈粉色且敏感、伤口从边缘恢复
8	干性伤口、厚痂、明显发炎、呈粉色且敏感、伤口从边缘恢复、伤口变小
9	伤口几乎闭合
10	伤口完全闭合

[0253] 如下表7所示，在以下治疗后立即观察到炎症快速减轻：硫代亚磺酸二正丙酯、硫代亚磺酸二正丁酯、硫代磺酸二甲酯、硫代磺酸二正丙酯 (PTS0) 和S-硫代磺酸二苯酯之后，感染的强度减轻并且伤口愈合。

[0254] 相比之下，在用清水进行的对照治疗中，没有观察到感染的改善，并且伤口变得更大。参考例使用基于盐酸金霉素的CTC喷雾剂，对伤口没有显示出任何作用。

[0255] 总之，本实施例清楚地表明，所要求保护的化合物能够治疗与生物膜有关的疾病。

[0256]

表 7.在给予对照物(例如水、Tween 80、参考组合物(CTC 喷雾)或测试化合物)后的不同适当时刻对奶牛进行伤口评估。星号(*)表示给予各种组合物的日期。喷雾中有机硫化合物的百分比与重量百分比有关。

测试化合物	CAS号	喷雾中的 化合物%	奶牛数 量	第 0 天*	第 3 天*	第 6 天*	第 9 天	第 12 天	第 19 天	第 28 天	第 60 天	结论
对照-水		n.a.	1	2	2	2	2	2	2	2	2	无作用*
对照-Tween 80	9005-65-6	10	2	7	7	7	7	7	7	7	7	无作用
二正丙基二硫	629-19-6	5.0	3	2	2	3	3	4	5	5	5	正向作用
				2	3	3	3	4	5	5	6	
				2	3	3	5	7	7	7	8	
二正丁基二硫	629-45-8	12.5	2	5	5	5	5	5	5	5	5	无作用
				6	6	5	5	5	5	5	5	
二异丙基二硫	4253-89-8	5.2	1	5	5	5	5	5	5	5	5	无作用
二苯基二硫	882-33-7	12.5	2	7	7	6	6	6	6	6	6	无作用
				7	7	7	7	7	6	6	6	
二苄基二硫	150-60-7	5	3	4	3	3	3	3	3	3	3	无作用

[0257]

					6	6	6	6	5	5	5	5	5	5	5	
					6	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	
双(4-甲氧基苯基)二硫	5335-87-5	3.2	2		6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	6	无作用
					5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	
双(4-氟苯基)二硫	405-31-2	3.2	2		5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	无作用
					7	6	6	6	5	5	6	6	6	6	6	
对甲基二硫	103-19-5	3.2	2		8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	无作用
					4	4	3	3	2	2	2	3	3	3	3	
硫代磺酸二乙基酯	18542-39-7	20	1		8	8	7	7	7	7	7	6	7	7	7	无作用
硫代亚磺酸二正丙酯	1948-52-3	28.5	1		2	2	3	4	7	7	7	7	7	7	7	正向作用
硫代亚磺酸二正丁酯	7559-55-9	20.4	1		3	3	3	4	4	4	6	6	7	7	7	正向作用
硫代磺酸二苯基酯	1208-20-4		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	无作用
双(4-氯苯基)硫代	6481-72-7	3.2	2		6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	4	无/轻微负向

[0258]

亚磺酸酯				8	8	8	7	7	7	7	7	作用
双(4-氟苯基)硫代 亚磺酸酯	61169-14-0	3.2	3	5	4	4	4	4	4	4	3	无/轻微负向 作用
				3	2	2	2	2	2	2	3	
				9	9	9	9	8	8	8	9	
硫代磺酸二甲酯	2949-92-0	3.5	1	3	3	4	4	7	8	9	10	正向作用
硫代磺酸二正丙 酯 (PTSO)	1113-13-9	3.2	3	2	2	3	4	4	5	5	5	正向作用
				2	3	3	5	7	7	ND	ND	
				2	2	3	3	4	4	5	6	
双(4-氟苯基)硫代 磺酸酯	2905-15-9	3.2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	轻微正向作 用
				5	4	4	3	3	3	3	3	
				2	4	5	5	6	7	7	4	
S-硫代磺酸二苯酯	1212-08-4	5.9	2	2	3	3	4	6	7	7	8	正向作用
				2	2	2	2	2	2	2	1	
				2	2	2	2	2	2	2	2	
CTC喷雾***	n.v.t.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	无作用
				2	2	2	2	2	2	2	2	
				2	2	2	2	2	2	2	2	

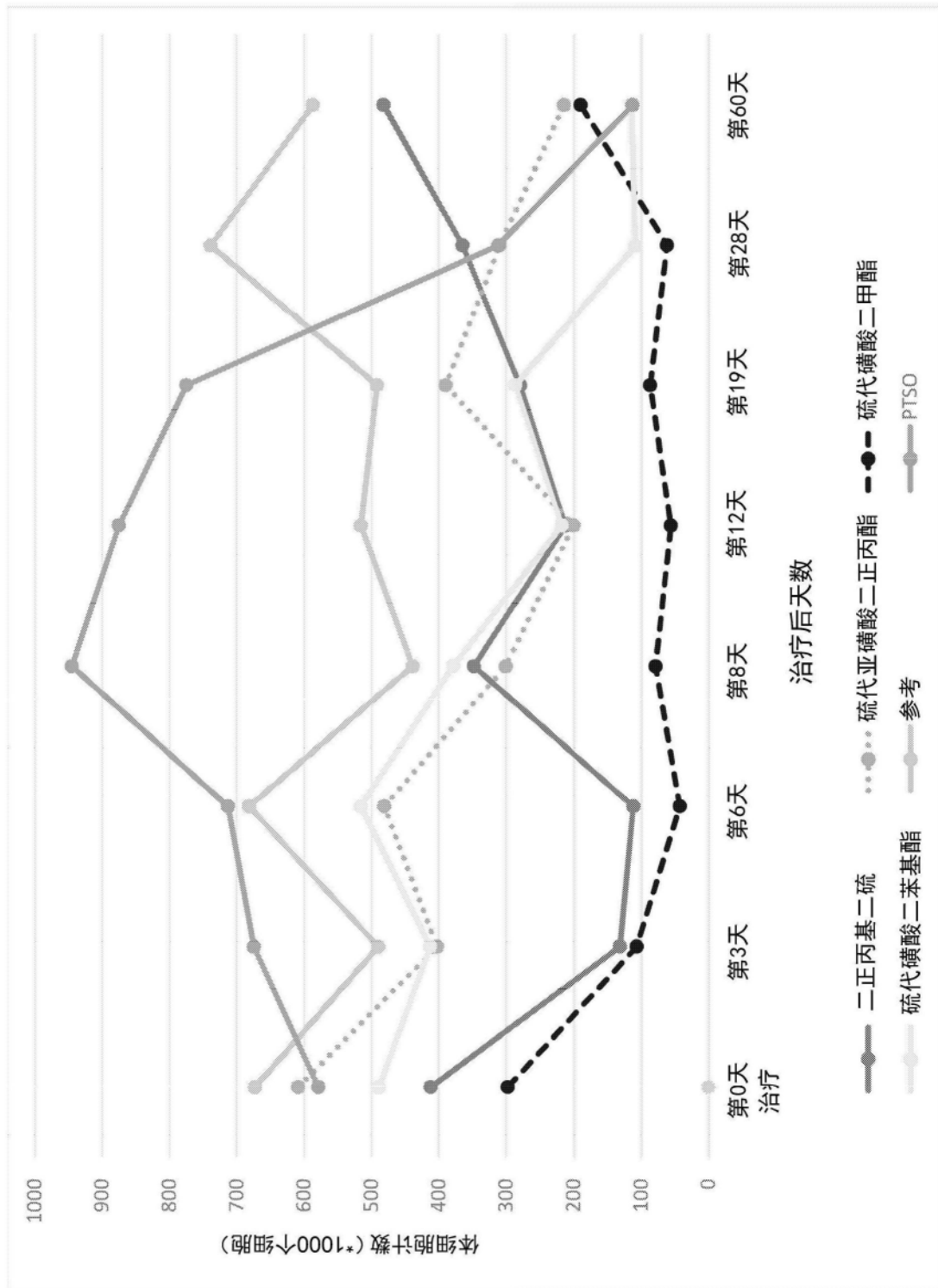


图1