

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-538502

(P2024-538502A)

(43)公表日 令和6年10月23日(2024.10.23)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/095 (2006.01)	A 6 1 K	31/095	4 B 0 1 8	
A 6 1 P	31/10 (2006.01)	A 6 1 P	31/10	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	4 C 2 0 6	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	4 H 0 1 1	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全48頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-515583(P2024-515583)				
(86)(22)出願日	令和4年9月8日(2022.9.8)				
(85)翻訳文提出日	令和6年4月22日(2024.4.22)				
(86)国際出願番号	PCT/NL2022/050507				
(87)国際公開番号	WO2023/038522				
(87)国際公開日	令和5年3月16日(2023.3.16)				
(31)優先権主張番号	2029166				
(32)優先日	令和3年9月10日(2021.9.10)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	524090806 アーハーフェー・インターナショナル・ ベー・フェー オランダ・8 0 4 2・パーセー・ズヴォ レ・スコケルウェッヒ・1 0				
(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦				
(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉				
(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦				
(72)発明者	レックス・デ・ブール オランダ・8 0 4 2・パーセー・ズヴォ レ・スコケルウェッヒ・1 0内				
(72)発明者	ヘリット・ヤン・ストレーフラント 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 バイオフィルム障害及び感染症を治療するための組成物及び方法

(57)【要約】

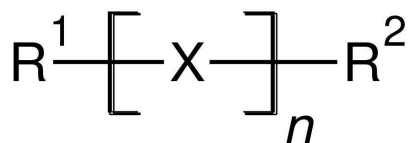
本開示は、有機硫黄含有組成物、特に、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p-トリル)チオスルフィネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルホネート、S-プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、及びジ-n-プロピルチオスルホネートに関する。このような組成物は、インビボとインビトロの両方で感染を処置し、バイオフィルムを低減又は分解するために有用である。特に、このような組成物は、乳房炎、趾皮膚炎、及び慢性創傷感染症を含むがこれらに限定されないバイオフィルム関連障害の治療において有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオフィーム関連障害の治療における使用のための、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物:

【化 1】



式I

10

(式中、nは、2であり、一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S(O)-及び-S(O)₂-からなる群から選択され; R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)。

【請求項 2】

バイオフィーム関連障害が、慢性感染症及び/又は持続性感染症である、請求項1に記載の使用のための化合物又は組成物。

【請求項 3】

バイオフィーム関連障害が、趾皮膚炎、乳房裂、又は慢性創傷感染症である、請求項1又は2に記載の使用のための化合物又は組成物。

20

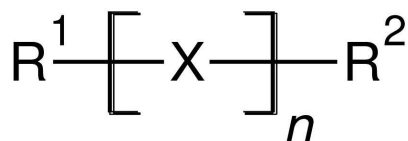
【請求項 4】

バイオフィームが、細菌、酵母、真菌、微細藻類、又はそれらの組合せを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用のための化合物又は組成物。

【請求項 5】

微生物感染症、好ましくは細菌感染症又は真菌感染症の治療又は予防における使用のための、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物:

【化 2】



式I

30

(式中、nは、2であり、一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S(O)-及び-S(O)₂-からなる群から選択され; R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)。

【請求項 6】

使用が、好ましくは抗真菌薬又は抗生物質から選択される抗菌剤の投与を更に含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の使用のための化合物又は組成物。

40

【請求項 7】

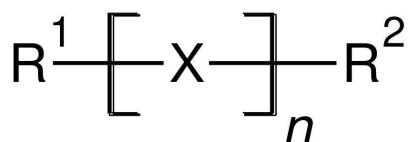
使用が、抗炎症剤の投与を更に含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の使用のための化合物又は組成物。

【請求項 8】

式Iによる化合物:

50

【化 3】



式I

(式中、nは、2であり、
一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S(O)-及び-S(O)₂-からなる群から選択され;
R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリ
ールから選択される)を含む組成物であって;
医薬組成物、機能性食品、又は洗浄製品である、組成物。

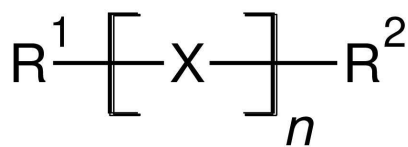
10

【請求項 9】

ある表面のバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防する若しくは低減するための、又
はある表面のバイオフィルムを分解若しくは低減するためのインビトロでの方法であって
、
前記方法は、ある表面のバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防若しくは低減するよう
に、
又はある表面のバイオフィルムを分解若しくは低減するように、その表面に組成物を塗布
する工程を含み、前記組成物は、式Iによる化合物:

20

【化 4】



式I

(式中、nは、2であり、
一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S(O)-及び-S(O)₂-からなる群から選択され;
R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリ
ールから選択される)を含む、方法。

30

【請求項 10】

組成物が、ジアリルチオスルフィネートを本質的に含まない、請求項1から9のいずれ
か一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、又は組成物。

【請求項 11】

組成物が、好ましくは抗真菌薬又は抗生物質から選択される抗菌剤を更に含む、請求項
1から10のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、又は組成
物。

【請求項 12】

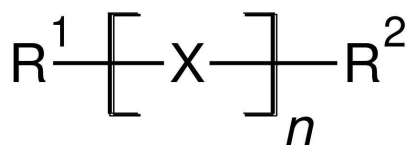
組成物が、抗炎症剤を更に含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の使用のため
の化合物若しくは組成物、方法、又は組成物。

40

【請求項 13】

式Iによる化合物:

【化 5】



式I

50

(式中、 n は、2であり、一方の X は、 $-S-$ であり、他方の X は、 $-S(O)-$ 及び $-S(O)_2-$ からなる群から選択され; R^1 及び R^2 は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)で少なくとも部分的に被覆された表面を有する物品であって;好ましくは、医療機器又は外科用器具である、物品。

【請求項14】

R^1 及び R^2 が、独立して、アルキル、アリール、アルキルアリール、及びアリールアルキルから選択される、請求項1から13のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項15】

R^1 及び R^2 が、独立して、 C_{1-6} アルキル及びフェニルから選択される、請求項1から13のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項16】

式Iによる化合物が、ジ- n -プロピルチオスルフィネートでもジ- n -プロピルチオスルホネートでもない、請求項1から15のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項17】

他方の X が $-S(O)-$ であるとき、 R^1 及び R^2 が、独立して、イソプロピル、ブチル、ベンジル、及び p -トリルからなる群から選択され;他方の X が $-S(O)_2-$ であるとき、 R^1 及び R^2 が、独立して、メチル、フェニル、ベンジル、4-メチルベンゼン、及び n -プロピルからなる群から選択される、請求項1から14のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項18】

式Iによる化合物が、ジ- n -ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p -トリル)チオスルフィネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルホネート、 S -プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ- n -プロピルチオスルフィネート、及びジ- n -プロピルチオスルホネートからなる群から選択される、請求項1から14のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項19】

R^1 及び R^2 が、同一である、請求項1から18のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項20】

式Iによる化合物が、ジ- n -ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p -トリル)チオスルフィネート、 S -プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、及びジ-ベンジルチオスルホネートからなる群から選択される、請求項1から14のいずれか一項に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【請求項21】

式Iによる化合物が、ジ- n -ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、及びジ-フェニルチオスルホネートからなる群から選択される、請求項20に記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、有機硫黄含有組成物、特に、ジ- n -ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p -トリル)チオスルフィネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、ジ-ベンジル

10

20

30

40

50

チオスルホネート、S-プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、及びジ-n-プロピルチオスルホネートに関する。このような組成物は、インピボとインピトロの両方で感染を処置し、バイオフィルムを低減又は分解するために有用である。特に、このような組成物は、乳房炎、趾皮膚炎、及び慢性創傷感染症を含むがこれらに限定されないバイオフィルム関連障害の治療において有用である。

【背景技術】

【0002】

乳房の健康状態は、健康とウェルネスの両方の観点、及び経済的観点から、乳畜において重要な役割を担っている。乳房炎として知られている、ウシ等の乳畜の乳腺における感染症は、世界中の酪農場に重大な経済的影響を与える。全世界での年間の損失は、40億〜50億ユーロであると推定される。乳牛乳房炎では、乳房は、侵入微生物に対する効果的な防御応答を起こすことができない。乳房のレベルでバランスを崩壊させるいくつかの要因が知られており、乳畜が乳房炎を引き起こす微生物を死滅させる能力を損なう可能性がある。結果として、宿主応答メカニズムは、侵入病原体を排除するための効率的な防御応答を引き起こすことができず、乳房の細菌コロニー形成、及び臨床型又は不顕性乳房炎の発症をもたらす可能性がある。

10

【0003】

乳牛の乳房における細菌コロニー形成、特に細菌リザーバーの形成は、対抗するのが一般に困難であり、抗生物質を用いた又は用いない特定の治療戦略にもかかわらず持続する可能性のある慢性感染症をもたらす。乳牛の乳房の細菌感染症の持続に関連する重要な因子は、上皮接着、バイオフィルムの生成、及び食作用に対する細菌の感受性である。

20

【0004】

乳牛の乳房炎を制御又は予防するために、いくつかの戦略、2〜3例を挙げると、抗生物質処置及び予防接種等が用いられ、この疾患の臨床的及び経済的影響を低減してきた。しかし、ほとんどの処置及び戦略は、この疾患を改善する効果がほとんど又は全くない。効果がないのにはいくつか理由がある。第1に、いくつかの病原性因子が単一成分ワクチンの潜在的抗原として示唆されているが、実験的試験は、単一因子に対する免疫の誘導は、乳牛の乳房炎を引き起こす細菌に対する強い保護を与えるのに十分ではないことを実証している。第2に、細菌抗原は、免疫原性が低く、適切なアジュバント(adjuvantion)を必要とする。第3に、乳房炎の制御における主要な課題は、例えば、細菌によるバイオフィルムの形成の結果として、乳房の細菌プールに到達することのできる効果的な抗生物質である。

30

【0005】

細菌等の微生物は、バイオフィルムを生成する必要は必ずしもないが、それらが、例えば、上皮細胞に接着することができる場合、宿主内で生き残る可能性ははるかに高くなる。接着は、一連の付着及び脱離が関与する活動的プロセスであり、その結果バイオフィルムが形成され、これには、微生物における重大な遺伝子的変化及びその後の生理的变化が伴い、その結果、とりわけ、事実上すべてのクラスの抗生物質に対する感受性が損失する。したがって、細菌による乳房感染症の管理は、抗生物質に耐性を示す細菌病原体の出現及び流行増加のために、ますます困難になってきている。いくつかの場合では、低用量の抗生物質は、バイオフィルム形成を促進することさえあり、抗生物質の致死効果を避けることにおける細菌の自然な防御メカニズムを示唆している。この複雑で問題ある状況のために、乳房炎は、近年、一般的な乳房の健康状態の改善に進展があったにもかかわらず、乳牛の最も重要な疾患の1つのままである。

40

【0006】

更に、ウシが頻繁に又は継続的に抗生物質で処置されるとき、その抗生物質及び分解産物がふん尿にも見られる。抗生物質及び分解産物を含むふん尿は、土壌に拡散される。抗生物質の存在は、土壌の細菌多様性に影響を与えることが示されている。これは、環境にとって望ましくない効果である。ウシにおいて感染症を治療するための代替的組成物は、環境への抗生物質の拡散を阻止し、土壌のマイクロバイオーームを回復させる。

50

【0007】

細菌バイオフィルムの記載が科学文献ではるか前に見ることができるにもかかわらず、バイオフィルムの意味は、1982年に、Costertonが黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)が心臓ペースメーカーリードにバイオフィルムを形成していることを観察したときに知られるようになった。その後の研究及び臨床観察により、細菌バイオフィルムは、インプラント及びカテーテル、補綴装具、並びに他の埋め込まれた生体材料に見ることができることが明らかになった。更により重要なのは、微生物バイオフィルムは、ヒト及び動物組織の生体表面、例えば、口腔内の歯周粘膜(歯垢)、副鼻腔(慢性副鼻腔炎)、内耳(内耳炎)、血管及び心臓弁(心内膜炎)、肺胞表面(複数の肺疾患)、又は胆道及び膀胱にも形成されることが観察されたことである。

10

【0008】

バイオフィルム形成の第1段階は、ある表面への細胞の付着を含む。第2の段階では、細胞増殖が起こり、細胞の多くの層を有する成熟構造の形成を伴う。細菌を更に保護する粘液層も形成される。例えば、Melchiorら *Veterinary Journal* 2006 171:398~407頁を参照されたい。臨界質量に達すると、バイオフィルムの最も外側の細胞層は、「浮遊性有機体(planktonic organism)」を放出する場合がある。これらの有機体は、他の表面に更にコロニーを形成しうる。バイオフィルムは、生体組織、留置医療機器、工業用若しくは飲用の水系配管、又は自然の利水システムを含む多種多様な表面に形成しうる。当業者には理解されるように、すべての感染がバイオフィルムの形成をもたらすわけではない。

20

【0009】

過去20年の研究により、集団的バイオフィルム形成は、クオラムセンシング(QS)と示される細菌コミュニケーションシステムによって促進されることが明らかになった。QSは、細菌によってそれらの環境中に永久に排出される小さい化学分子(いわゆるオートインデューサー(auto-inducer)、AI)を用いて起こる。これらのシグナル伝達分子(例えば、オリゴペプチド(AIP)又はN-アセチルホモセリンラクトン(AHL))は、それらの近くにある他の細菌によって特定の受容体を介して認識及び監視される。AIの特定密度に達すると(定数)、細菌細胞は集団で遺伝子発現を変え、病原性因子を産生して体細胞を攻撃するか、又は代謝経路を活性化して組織表面にバイオフィルムを形成する。バイオフィルム形成は、最初は主に多糖である大きな重合体からなる細胞外マトリックスの形成を含み、それは、成熟するとタンパク質及び脂質によって安定化され、三次元構造が生じる。

30

【0010】

一度バイオフィルム感染が確立されると、根絶は非常に困難である場合がある。成熟バイオフィルムは、断続的に浮遊性細胞を放出する。これは、断続的悪化を伴う慢性感染症を引き起こしうる。抗生物質又は宿主の免疫応答が浮遊性細胞による症状を解決しうる一方、成熟バイオフィルムは、残存する可能性がある。

【0011】

バイオフィルムの保護下の微生物細胞は、抗生物質及び体の自然な免疫応答に対してより耐性を示す場合が多い。休眠細菌は、代謝的に不活性であり、したがって、細菌細胞壁構成物質の合成(ペニシリン系及びセファロsporin系等の β -ラクタム抗生物質並びにバンコマイシンの標的)、及び迅速タンパク質(rapid protein)(アミノグリコシド系、テトラサイクリン系、マクロライド系、及びリネゾリドの標的)、及びDNA合成(フルオロキノロン系及びリファンピシン)又は葉酸合成(スルホンアミド系、アミノピリミジン系(トリメトプリム等))等の多くの抗生物質の典型的標的を発現していない。したがって、抗生物質処置だけでは、一般に、バイオフィルム感染を根絶するのに十分ではない。(Wuら *Int J Oral Sci.* 2015 Mar; 7(1): 1~7頁を参照されたい)。抗生物質は、分散した(浮遊性)細菌に対しては効果的でありうるが、バイオフィルム中の微生物を根絶するのに必要な最小濃度の抗生物質をバイオフィルム内に到達させるのは困難である。様々なインビトロ実験で、バイオフィルム中で増殖している細菌は、同じ株の浮遊性細菌と比較したとき、様々な抗菌剤に対して10~1000倍高い耐性を示すことが実証されている(例えば

40

50

、Amorenaら 1999 J. Antimicrob. Chemother. 44:43～55頁; Ceriら、1999 J. Clin. Microbiol. 37:1771～1776頁;及びOlsonら、2002 Can. J. Vet. Res. 66:86～92頁を参照されたい)。Olsenらは、バイオフィームによって誘導される抗生物質抵抗性及び耐性の様々なメカニズムを概説している(Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 34:877～886頁)。

【0012】

ウシ乳房炎の場合、それは、黄色ブドウ球菌の野外株を用いた研究で報告されている(Melchior、Gaastra & Fink-Gremmels、J. Vet. Med. 2006 53:326～332頁)。MIC50、最小細菌濃度(minimum bacterial concentration)(BMIC)、及びMBEC(最小バイオフィーム根絶濃度(minimal biofilm eradicating concentration))を、乳房炎感染ウシから分離した7株について決定した。試験した抗生物質は、ペニシリン、アモキシシリン、クロキサシリン、セファロチン、セフォペラゾン、セフキノム、クロキサシリン/ペニシリンの組合せ、リンコマイシン、ピルリマイシン、チロシン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、トリメトプリム/スルファメトキサゾール、フロルフエニコール、及びダノフロキサシン等のウシ乳房炎の治療に一般的に使用されているものを含む。試験したすべての抗生物質について、MIC(浮遊性細菌)とMBEC(バイオフィーム根絶濃度)の差は、256倍超、非常に多くの場合で2048倍超であった。

【0013】

抗生物質がバイオフィーム形成を刺激するという証拠もある。例えば、いくつかの抗生物質(テトラサイクリン系、キヌプリスチン-ダルホプリスチン、及びエリスロマイシン等)は、細菌の接着を促進する細菌中の遺伝子(例えば、ica遺伝子)の発現を刺激する(Melchiorら、上記を参照)。興味深いことに、黄色ブドウ球菌乳房炎の分離菌の間では、ica遺伝子が広く存在していることが示されている(Melchiorらで概説されている、上記を参照)。これらの結果は、乳房の感染症が、バイオフィーム形成と関連しているという仮説を支持する。

【0014】

バイオフィームはまた、休眠細菌を含みうる。バイオフィームは、宿主の免疫応答を回避するために、免疫細胞活性に影響を与える制御因子/抑制因子の活性化及び免疫細胞に対する物理的障壁として作用することを含むいくつかのメカニズムを用いる(Gonzalez Pathog Dis. 2018 Apr; 76(3))が、休眠から移行して活性になることもある。一般に、免疫系は、活性細菌に対してのみ作用し、したがって、休眠細菌は、個体の免疫系から逃れることができる。休眠細菌は、バイオフィームから脱離し、すぐに活性化し、宿主に対して有害となることができる。

【0015】

真菌関連バイオフィームもまた、浮遊性細胞と比較して、抗真菌薬に対してより耐性を示すことが知られている(例えば、概説についてはFanning and Mitchell PLOS Pathog 2012 8:e1002585を参照されたい)。したがって、抗菌効果を有する化合物が必ずしもバイオフィームの処置又は予防に適しているとは限らない。

【0016】

成熟バイオフィームでは、休眠段階は、一次代謝の下方制御(遺伝子シフト)によって採用される。休眠は、バイオフィーム細菌が、タンパク質及びDNA合成並びに細胞壁再構築等の、抗生物質の典型的標的の発現をほとんど完全に抑制することを包含する。続いて、バイオフィームは、本質的に抗生物質に対して非感受性であり、それらに対して浮遊性(自由に動く)細菌よりも上向きに1000倍高い耐性を示すことが多い。更に、バイオフィーム中の細胞密度が高いため、遺伝子水平伝播の可能性がかなり高まり、それにより、抵抗性が増強した株又は病原性プロファイルが変化した株の出現の可能性が高まる。臨床転帰は、一般的な(最新のものでさえ)抗生物質に対する表現型耐性である。

【0017】

このようなバイオフィームの保護環境では、細菌生存時間は増加する。更に、自己構築された不活性な多糖豊富なマトリックスは、非免疫原性であり、バイオフィームに埋め込

10

20

30

40

50

まれた細菌を、認識(PAMPS-病原体関連分子パターンを介する)及び宿主の免疫細胞による貪食から保護する。

【0018】

バイオフィルムの形成は、医療、工業、及び自然の環境で深刻な悪影響をもたらす可能性がある。特に、バイオフィルム関連感染症(すなわち、バイオフィルム関連障害)は、ヒトと動物の両方において深刻な問題である。このような障害は、再発性の急性発症を伴う慢性炎症反応並びに抗菌療法及び/又は宿主防御に対する抵抗性によって特徴づけることができる。創傷バイオフィルムは、組織修復を遅延させ、その結果慢性創傷を生じる。バイオフィルム感染症は、現在、ヒト微生物感染症の全体の80%までを占めることが示唆されている(Bartell JAら、20 Evolutionary highways to persistent bacterial infection. *Nature Communications* (2019) 10:629及びSharmaら 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76)。Jamalらは、国立衛生研究所が、微生物感染症の65%及び慢性感染症の80%がバイオフィルム形成と関連していることを示したことを報告した(*Journal of Chinese Medical Association* 81:7~11頁)。バイオフィルム及びバイオフィルム関連障害は、文献で広く議論されてきた;例えば、Sharmaら 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76; Royら 2018 Virulence 9:522~554頁;及びJamalら 2018 *Journal of the Chinese Medical Association* 81:7~11頁を参照されたい。Vestbyらは、細菌バイオフィルム及び疾患におけるその役割を概説している(*Antibiotics (Basel)*. 2020 Feb; 9(2): 59)。バイオフィルム感染症の包括的概要は、2014年に欧州臨床微生物及び感染症学会(*European Clinical Society of Microbiology and Infectious Disease*)によって提示された;David Lebeauxら *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014; doi:10.1128/MMBR.00013-14も参照されたい。

10

20

【0019】

例えば、院内感染症を引き起こす生物である緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は、嚢胞性線維症肺組織、コンタクトレンズ、及びカテーテルライン等、多種多様な表面にバイオフィルムを形成する。バイオフィルムとして増殖する緑膿菌は、慢性創傷においても見られており、創傷の治癒障害をもたらす可能性がある。バイオフィルム、特に、緑膿菌バイオフィルムは、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患等の呼吸器疾患及び慢性鼻副鼻腔炎において慢性感染症も引き起こす。医療機器に形成されたバイオフィルムは、体内に脱落する可能性のある細菌のリザーバーとして働き、慢性的な全身感染症をもたらす。カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)(酵母)は、病院で見られる最も一般的な真菌バイオフィルムであるが、治療するのが極めて困難であり、典型的な抗真菌治療にはあまり反応しない。

30

【0020】

細菌バイオフィルム形成の先駆け研究は、乳牛の再発性乳房炎及び複雑な創傷感染症に参与していることから、黄色ブドウ球菌(グラム陽性)及び緑膿菌(グラム陰性)に焦点を当てた。更に、ストレプトコッカス属種(*Streptococcus* ssp.)、トリ病原性大腸菌(*E. coli*)(APEC)、及びカンピロバクター・ジェジュニ(*C. jejuni*)バイオフィルムのバイオフィルム形成が、これらの細菌種が公衆衛生に参与することから、注目を集めた。その後、例えば、アクチノバチルス・プルロニューモニア(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)(致死性になる可能性があるブタの重篤な肺感染症)、大腸菌(局所及び全身感染症、並びに家禽で致死性であることが多い全身性敗血症)、イヌ及びネコの皮膚及び腸疾患、並びにウマの創傷感染症及び子宮内膜炎を含む他の重要な動物病原体が、バイオフィルム感染症として認識された。バイオフィルム形成がほとんどすべての微生物の一般的特性であるため、この一覧は、非排他的である。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Melchiorら *Veterinary Journal* 2006 171:398~407頁

50

- 【非特許文献2】 Wuら Int J Oral Sci. 2015 Mar; 7(1): 1～7頁
- 【非特許文献3】 Amorenaら 1999 J. Antimicrob. Chemother. 44:43～55頁
- 【非特許文献4】 Ceriら、1999 J. Clin. Microbiol. 37:1771～1776頁
- 【非特許文献5】 Olsonら、2002 Can. J. Vet. Res. 66:86～92頁
- 【非特許文献6】 Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 34:877～886頁
- 【非特許文献7】 Melchior、Gaastra & Fink-Gremmels、J. Vet. Med. 2006 53:326～332頁
- 【非特許文献8】 Gonzalez Pathog Dis. 2018 Apr; 76(3)
- 【非特許文献9】 Fanning and Mitchell PLOS Pathog 2012 8:e1002585
- 【非特許文献10】 Bartell JAら、20 Evolutionary highways to persistent bacterial infection. Nature Communications (2019) 10:629 10
- 【非特許文献11】 Sharmaら 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76
- 【非特許文献12】 Jamalら Journal of Chinese Medical Association 81:7～11頁
- 【非特許文献13】 Royら 2018 Virulence 9:522～554頁
- 【非特許文献14】 Antibiotics (Basel). 2020 Feb; 9(2): 59
- 【非特許文献15】 David Lebeauxら Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014
- 【非特許文献16】 Nair及びJacob (J Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7(2): 27-31頁)doi:10.1128/MMBR.00013-14
- 【非特許文献17】 Holliday,ら、(1967 The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size. A Review. Pediat.Res. 1: 185-195頁) 20
- 【非特許文献18】 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997
- 【非特許文献19】 J Am Chem Soc; 1947; 69; 1710～1713頁
- 【非特許文献20】 Chem. Eur. J. 2015, 21, 8105
- 【非特許文献21】 Angew.Chem. Int. Ed., 2018, 57, 12290～12293頁
- 【非特許文献22】 Schonborn S及びKromker V (2016 Journal Veterinary Microbiology, 30;196:126～128頁)
- 【非特許文献23】 Sharmaら、2011 Asian-Aust J Anim Sci 24:429～438頁
- 【非特許文献24】 Beattie及びTaylor、2000, J. Brit. Cattle Vet. Assoc. 8, 377～380頁 30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

したがって、抗菌化合物及びバイオフィルム関連障害の代替治療法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0023】

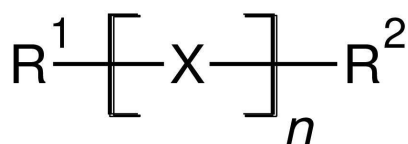
本開示は、以下の好ましい実施形態を提供する。

【0024】

・ バイオフィルム関連障害の治療における使用のための、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物:

【0025】

【化1】



式I

40

50

【0026】

(式中、nは、2であり、一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)であって;式Iによる化合物は、ジ-n-ブチルジスルフィド、ジメチルジスルフィド、ジエチルジスルフィド、ジ-n-プロピルジスルフィド、ジエチルチオスルフィネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-n-プロピルチオスルホネート、ジ-メチルチオスルホネート、及びジ-フェニルチオスルホネートからなる群から選択される、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物。

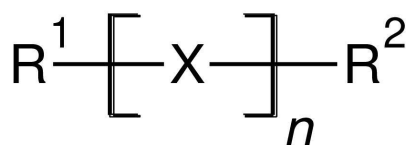
10

【0027】

- バイオフィーム関連障害の治療における使用のための、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物:

【0028】

【化2】



式I

20

【0029】

(式中、nは、2であり、一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)。

【0030】

- バイオフィーム関連障害が、慢性感染症及び/又は持続性感染症である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物又は組成物。

30

【0031】

- バイオフィーム関連障害が、趾皮膚炎、乳房裂(udder cleft)、又は慢性創傷感染症である、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物又は組成物。

【0032】

- バイオフィームが、細菌、酵母、真菌、微細藻類、又はそれらの組合せを含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物又は組成物。

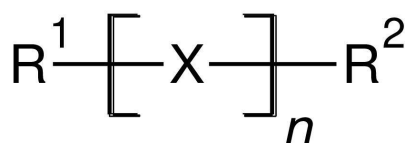
【0033】

微生物感染症、好ましくは細菌感染症又は真菌感染症の治療又は予防における使用のための、式Iによる化合物、又は式Iによる化合物を含む組成物:

40

【0034】

【化3】



式I

【0035】

(式中、nは、2であり、

50

一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)。

【0036】

- 使用が、好ましくは抗真菌薬又は抗生物質から選択される抗菌剤の投与を更に含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物又は組成物。

【0037】

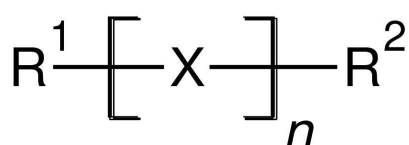
- 使用が、抗炎症剤の投与を更に含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物又は組成物。

【0038】

- 式Iによる化合物:

【0039】

【化4】



式I

【0040】

(式中、nは、2であり、

一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)を含む組成物であって;

医薬組成物、機能性食品、又は洗浄製品である、組成物。

【0041】

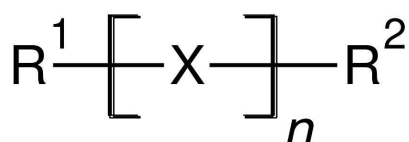
- ある表面のバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防する若しくは低減するための、又はある表面のバイオフィルムを分解若しくは低減するためのインビトロでの方法であって、

前記方法は、ある表面のバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防若しくは低減するように、

又はある表面のバイオフィルムを分解若しくは低減するように、その表面に組成物を塗布する工程を含み、前記組成物は、式Iによる化合物:

【0042】

【化5】



式I

【0043】

(式中、nは、2であり、

一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)を含む、方法。

【0044】

10

20

30

40

50

- 組成物が、ジアリルチオスルフィネートを本質的に含まない、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、又は組成物。

【0045】

- 組成物が、好ましくは抗真菌薬又は抗生物質から選択される抗菌剤を更に含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、又は組成物。

【0046】

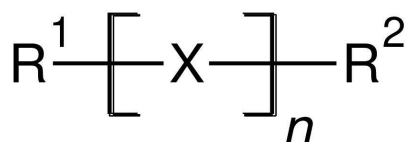
- 組成物が、抗炎症剤を更に含む、前述の実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、又は組成物。

【0047】

- 式Iによる化合物:

【0048】

【化6】



式I

【0049】

(式中、nは、2であり、一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル又は任意選択で置換されたアリールから選択される)で少なくとも部分的に被覆された表面を有する物品であって;好ましくは、医療機器又は外科用器具である、物品。

【0050】

- R¹及びR²が、独立して、C₁~₆アルキル及びフェニルから選択され;好ましくは、R¹及びR²が、独立して、C₁~₄アルキルである、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0051】

- R¹及びR²が、同一である、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0052】

- 各Xが、-S-であり、R¹及びR²が、独立して、C₁~₄アルキルである、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0053】

- 一方のXが、-S-であり、他方のXが、-S(O)-及び-S(O)₂-からなる群から選択され; R¹及びR²が、独立して、アルキル、アリール、アルキルアリール、及びアリールアルキルから選択される、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0054】

- 一方のXが、-S-であり、他方のXが-S(O)-であるとき、R¹及びR²が、独立して、n-プロピル、イソプロピル、ブチル、ベンジル、及びp-トリルからなる群から選択され;且つ/又は他方のXが-S(O)₂-であるとき、R¹及びR²が、独立して、メチル、フェニル、ベンジル、4-メチルベンゼン、及びn-プロピルからなる群から選択される、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0055】

好ましくは、ここで、一方のXは、-S-であり、他方のXが-S(O)-であるとき、R¹及びR²は、独立して、イソプロピル、ブチル、ベンジル、及びp-トリルからなる群から選択

10

20

30

40

50

され;ここで、他方のXが-S(O)₂-であるとき、R¹及びR²は、独立して、メチル、フェニル、ベンジル、4-メチルベンゼン、及びn-プロピルからなる群から選択される。

【0056】

式Iによる化合物が、ジメチルジスルフィド、ジエチルジスルフィド、ジ-n-プロピルジスルフィド、ジ-n-ブチルジスルフィド、ジエチルチオスルフィネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-n-プロピルチオスルホネート、ジ-メチルチオスルホネート、及びジ-フェニルチオスルホネートからなる群から選択される、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0057】

式Iによる化合物が、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p-トリル)チオスルフィネート、S-プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルホネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、及びジ-n-プロピルチオスルホネートからなる群から選択される、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0058】

式Iによる化合物が、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、及びジ-フェニルチオスルホネートからなる群から選択される、実施形態のいずれか1つに記載の使用のための化合物若しくは組成物、方法、物品、又は組成物。

【0059】

治療の方法はまた、式Iの化合物をそれを必要とする個体に投与する工程を含んで開示される。このような方法は、本明細書に開示されるバイオフィルム障害を治療するのに有用である。このような方法は、本明細書に開示される感染症を治療するのに有用である。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】処置後60日間のウシの体細胞数を示す図である。

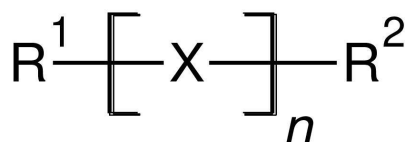
【発明を実施するための形態】

【0061】

本開示は、式I:

【0062】

【化7】



式I

【0063】

(式中、nは、2であり、

一方のXは、-S-であり、他方のXは、-S-、-S(O)-、及び-S(O)₂-からなる群から選択され;

R¹及びR²は、独立して、任意選択で置換されたアルキル及び任意選択で置換されたアリールから選択される)による化合物に関する。このような化合物(本明細書では、有機硫黄化合物とも呼ばれる)は、バイオフィルムの形成を低減、分解、及び/又は予防するのに有用である。

【0064】

本明細書で使用される場合、「アルキル」は、飽和脂肪族ヒドロカルビル基に関する。別段の記載がない限り、アルキル基は、直鎖状又は分岐鎖状でありうる。好ましくは、ア

10

20

30

40

50

ルキル基は、直鎖状である。本明細書で使用される場合、アルキル基は、置換されていても置換されていなくてもよい。好ましくは、アルキル基は、置換されていない。好ましい実施形態では、式Iにおいて、アルキルは、 $C_1 \sim 6$ アルキル、より好ましくは、 $C_1 \sim 4$ アルキルである。

【0065】

本明細書で使用される場合、「アリアル」は、6～24個の炭素原子、より好ましくは6～12個の炭素原子を含む芳香族炭化水素環系を指し、単環構造及び多環構造を含みうる。アリアル基が多環構造であるとき、それは、好ましくは二環構造である。任意選択で、アリアル基は、本明細書に更に明示される1つ又は複数の置換基によって置換されている。好ましくは、アリアル基は、置換されていない。アリアル基の例は、フェニル、ベンジル、及びナフチルである。最も好ましくは、アリアル基は、フェニルである。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、「置換されている」は、ある基が1つ又は複数の置換基を含むことを示す。好ましくは、置換基は、独立して、ハロゲン、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $C_1 \sim 3$ アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3H$ 、及び CF_3 からなる群から選択される。好ましくは、ハロゲンは、 $-Cl$ 、 $-F$ 、 $-Br$ 、及び $-I$ からなる群から選択される。最も好ましくは、ハロゲンは、 $-Cl$ である。好ましい実施形態では、本明細書に開示される基は、多くとも3つの置換基、より好ましくは多くとも2つの置換基、最も好ましくは多くとも1つの置換基を含む。

【0067】

好ましい実施形態では、 R^1 及び R^2 は、独立して、アルキル及びアリアルから選択される。より好ましくは、 R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_1 \sim 6$ アルキル及びフェニルから選択される。更により好ましくは、 R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_1 \sim 4$ アルキルである。最も好ましくは、 R^1 及び R^2 は、独立して、直鎖状 $C_1 \sim 4$ アルキル、すなわちメチル、エチル、 n -プロピル、又は n -ブチルである。

20

【0068】

好ましい実施形態では、 R^1 及び R^2 は、同一である。

【0069】

好ましい実施形態では、各 X は、 $-S-$ である。好ましい実施形態では、一方の X は、 $-S-$ であり、他方の X は、 $-S(O)-$ である。他の好ましい実施形態では、一方の X は、 $-S-$ であり、他方の X は、 $-S(O)_2-$ である。

30

【0070】

好ましい実施形態では、式Iにおいて、各 X は、 $-S-$ であり、 R^1 及び R^2 は、独立して、 $C_1 \sim 4$ アルキル、好ましくは直鎖状 $C_1 \sim 4$ アルキル、すなわちメチル、エチル、 n -プロピル、又は n -ブチルである。好ましくは、式Iによるこれらの特定の化合物を含む組成物は、1つ又は複数の抗菌剤を更に含む。

【0071】

式Iの好ましい実施形態では、一方の X は、 $-S-$ であり、他方の X は、 $-S(O)-$ 及び $-S(O)_2-$ からなる群から選択され、 R^1 及び R^2 は、独立して、アルキル、アリアル、アルキルアリアル、及びアリアルアルキルから選択される。

40

【0072】

好ましくは、ここで、一方の X は、 $-S-$ であり、他方の X が $-S(O)-$ であるとき、 R^1 及び R^2 は、独立して、 n -プロピル、イソプロピル、ブチル、ベンジル、及び p -トリルからなる群から選択され;且つ/又はここで、他方の X が $-S(O)_2-$ であるとき、 R^1 及び R^2 は、独立して、メチル、フェニル、ベンジル、4-メチルベンゼン、及び n -プロピルからなる群から選択される。

【0073】

好ましい実施形態では、式Iの化合物は、プロピル-プロパンチオスルホネート(PTSO、ジ- n -プロピルチオスルホネートとも呼ばれる)でもプロピル-プロパンチオスフィネート(PTS、ジ- n -プロピルチオスルフィネートとも呼ばれる)でもない。

50

【0074】

好ましくは、ここで、一方のXは、-S-であり、他方のXが-S(O)-であるとき、 R^1 及び R^2 は、独立して、イソプロピル、ブチル、ベンジル、及びp-トリルからなる群から選択され;ここで、他方のXが-S(O)₂-であるとき、 R^1 及び R^2 は、独立して、メチル、フェニル、ベンジル、4-メチルベンゼン、及びn-プロピルからなる群から選択される。

【0075】

好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジメチルジスルフィド、ジエチルジスルフィド、ジ-n-プロピルジスルフィド、ジ-n-ブチルジスルフィド、ジエチルチオスルフィネート、n-プロピルプロパン-1-チオスルフィネート(ジ-n-プロピルチオスルフィネートとも呼ばれる)、n-ブチルブタンチオスルフィネート(ジ-n-ブチルチオスルフィネートとも呼ばれる)、n-プロピルプロパン-1-チオスルホネート(ジ-n-プロピルチオスルホネートとも呼ばれる)、メチルメタンチオスルホネート(ジ-メチルチオスルホネートとも呼ばれる)、及びフェニルベンゼンチオスルホネート(ジ-フェニルチオスルホネートとも呼ばれる)からなる群から選択される。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジメチルジスルフィド、ジエチルジスルフィド、ジ-n-プロピルジスルフィド、及びジ-n-ブチルジスルフィドからなる群から選択される。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジエチルチオスルフィネート、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、及びジ-n-ブチルチオスルフィネートからなる群から選択される。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-プロピルチオスルホネート、ジ-メチルチオスルホネート、及びジ-フェニルチオスルホネートからなる群から選択される。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-フェニルチオスルホネート、ビス(p-トリル)チオスルフィネート、S-プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート、ジ-イソプロピルチオスルフィネート、ジ-ベンジルチオスルフィネート、及びジ-ベンジルチオスルホネートからなる群から選択される。

【0076】

好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジメチルジスルフィドである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジエチルジスルフィドである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-プロピルジスルフィドである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-ブチルジスルフィドである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジフェニルジスルフィドである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジエチルチオスルフィネートである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-プロピルチオスルフィネートである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、n-ブチルブタンチオスルフィネートである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-n-プロピルチオスルホネートである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-メチルチオスルホネートである。好ましい実施形態では、式Iによる化合物は、ジ-フェニルチオスルホネートである。

【0077】

「スルフィド(sulphide)」及び「スルフィド(sulfide)」という用語は、本明細書では互換的に使用されることが理解されるであろう。

【0078】

いくつかの実施形態では、化合物は、植物等の天然の供給源から得られる。化合物は、様々な方法で植物材料から抽出することができる。適切な方法は、化合物の化学的性質による。例えば、抽出は、非極性溶媒から開始し、その後、溶媒の極性を上げていくことができる。化合物はまた、市販されているか、又は実施例1に記載のように調製することができる。

【0079】

本開示は、本明細書に開示される化合物を含む組成物を提供する。好ましくは、このような組成物は、ジアリルチオスルフィネート(アリル-2-プロペン-1-スルフィノチオエートとも呼ばれる)を実質的に含まない。ジアリルチオスルフィネートは、アリシンという名称でよく知られている。アリシンは、有機硫黄化合物である。生のニンニクを刻むか押

10

20

30

40

50

しつぷすと、酵素アリイナーゼがアリインをアリシンに変換し、これが生のニンニクの香りの原因となる。生成したアリシンは不安定であり、ジアリルジスルフィド等の一連の他の硫黄含有化合物にすぐに変化する。

【0080】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」は、5wt%未満のジアリルチオスルフィネートを含む組成物を指す。いくつかの実施形態では、組成物は、1wt%未満のジアリルチオスルフィネート、好ましくは0.5wt%未満のジアリルチオスルフィネートを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも10:1、より好ましくは、少なくとも100:1である、式Iを有する化合物のジアリルチオスルフィネートに対する質量比を含む。

10

【0081】

本開示の組成物はまた、好ましくは、ジアリル-ジスルフィドを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、組成物は、1wt%未満のジアリルジスルフィド、好ましくは0.5wt%未満のジアリルジスルフィドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも10:1、より好ましくは、少なくとも100:1である、式Iを有する化合物のジアリル-ジスルフィドに対する質量比を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、活性成分の少なくとも50質量%、好ましくは少なくとも90質量%が、本明細書に開示される式Iによる化合物である組成物が提供される。いくつかの実施形態では、唯一の活性成分が、式Iによる化合物であり、任意選択でさらなる抗菌剤及び/又は抗炎症剤を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、活性成分の少なくとも50質量%、好ましくは少なくとも90質量%が、本明細書に開示される式Iによる化合物である組成物が提供される。いくつかの実施形態では、唯一の活性成分が、式Iによる化合物であり、任意選択でさらなる抗菌剤及び/又は抗炎症剤を含む組成物が提供される。

20

【0083】

本明細書に開示される化合物及びそれを含む組成物は、感染症の治療又は予防に有用である。例えば、特定の使用は、呼吸器感染症、腸感染症、乳房感染症(breast infection)、乳房感染症(udder infection)、皮膚感染症、膀胱感染症、耳感染症、全身感染症、関節感染症、脳感染症の治療又は予防のためである。

30

【0084】

本明細書で使用される場合、「感染症」は、例えば、疾患をもたらしうる病原性感染症を指す。特に、このような感染症は、細菌感染症又は真菌感染症である。好ましくは、感染症は、微生物感染症である。好ましい実施形態では、感染症は、細菌感染症である。好ましい実施形態では、感染症は、真菌感染症(酵母感染症を含む)である。

【0085】

細菌及び真菌は、ほとんどの場所で見られ、非常に多様な形態で存在している。ほとんどは有害ではなく、実際に地球上の生命に不可欠であり、植物、動物、及びヒトの健康に必須である。例えば、細菌及び真菌が共生生物としてそれらの宿主と生きているヒト及び動物の腸管におけるマイクロバイームは、いわゆる腸内細菌叢である。また、細菌は、皮膚に自然に存在し、免疫系の一部を形成している。別の例は、土壌生物学であり、大部分は細菌及び真菌からなる。細菌及び真菌の中には、例えば、動物又はヒトにおいて、病原性感染症を引き起こしうるものがある。これらの病原性感染症は、感染した個体の疾患及び病気をもたらす可能性がある。

40

【0086】

本明細書で使用される場合、「感染症の治療」は、感染症の重症度及び/若しくは持続期間の低減、並びに/又は感染症からの症状の重症度及び/若しくは持続期間の低減を指す。好ましくは、前記治療は、個体の健康の回復につながる。好ましくは、個体は、疾患症状が軽くなるか、又は短期間になる。本明細書で使用される場合、「感染症の予防」は、感染症又は感染症に関連した1つ若しくは複数の症状の発症の予防又は代替的に遅延さ

50

せることを指す。

【0087】

細菌、微細藻類、真菌等のいくつかの微生物は、バイオフィルムを形成することができる。本明細書に開示される化合物は、バイオフィルムの形成若しくは増殖の予防若しくは低減及び/又はバイオフィルムの分解若しくは低減にも有用である。好ましくは、本化合物及びそれを含む組成物は、バイオフィルム関連障害の治療又は予防に有用である。当業者であれば認識するように、微生物(例えば、細菌)感染症を治療することができるすべての化合物が、バイオフィルム関連障害を治療することができるわけではない。

【0088】

バイオフィルムという用語は、当初は、自然又は人工の表面に付着した固着性の細菌及び他の微生物の群集を説明するために、工業微生物学及び環境微生物学において使用された。微生物バイオフィルムの形成は、細菌が付着し、有機ポリマーからなる粘液性のフィルムを生成する表面に細菌がコロニー形成することによって開始される。この最初の細菌性フィルムは、藻類及び原生動物、真菌及び原生動物等の他の微生物を引きつけ、その結果、目に見える複数種のバイオフィルムが形成される。このような三次元バイオフィルムは、自然に遍在し、水と接触しているあらゆる表面に見られる。公衆衛生上の懸念は、都市用水供給並びに家庭用水パイプライン及び装置における微生物バイオフィルムである。

【0089】

本明細書で使用される場合、「バイオフィルム」という用語は、境界面(通常は、固体/液体)に集中し、典型的に細胞外ポリマー粘液マトリックスによって取り囲まれた微生物の集団を指す。バイオフィルムは、生体表面又は非生体表面に形成し、自然、工業、及び病院の環境で見ることができる。バイオフィルムは、様々な種類の微生物、例えば細菌、古細菌、原生動物、真菌、及び藻類を含みうる。好ましくは、このようなバイオフィルムは、細菌、微細藻類(プロトテカ属種(*Prototheca* spp.)等)又は真菌を含む。

【0090】

本明細書で使用される場合、本明細書で「バイオフィルム関連障害(biofilm associated disorder)」とも呼ばれる「バイオフィルム関連障害(biofilm-related disorder)の治療」は、障害の重症度及び/若しくは持続期間の低減、並びに/又は障害からの症状、特に感染症の症状の重症度及び/若しくは持続期間の低減を指す。好ましくは、前記治療は、個体の健康の回復につながる。好ましくは、個体は、疾患症状が軽くなるか、又は短期間になる。

【0091】

本明細書で使用される場合、「バイオフィルムの形成又は増殖の予防又は低減」は、バイオフィルムの形成又は増殖の予防、遅延、又は低減を指す。当業者には理解されるように、バイオフィルムの形成又は増殖のこのような低減は、未処置のバイオフィルムの増殖と比較して、バイオフィルムの増殖を遅くすることができる。好ましくは、組成物は、バイオフィルムの形成又は増殖を低減するのに有用である。本明細書で使用される場合、「バイオフィルムの分解又は低減」は、バイオフィルムの部分的又は完全な除去を指す。当業者に理解されるように、このような処置の後、浮遊性細菌は、依然として存在している可能性がある。

【0092】

本明細書に開示される化合物は、バイオフィルムの構造、例えば、細胞外粘液性マトリックスを崩壊させることができる場合がある。いくつかの実施形態では、化合物は、細胞接着を阻害するのに有用である。特に、化合物は、微生物バイオフィルムで遭遇したすべての細胞の種類、特に遊離生活微生物の静的表面又は生存表面(live surface)への接着を(細菌を死滅させることなく)防止することができる。

【0093】

理論に拘泥されることを望むものではないが、本開示は、本明細書に開示される治療化合物が、その効果の一部をクオラムセンシングに影響を与えることによって発揮する可能性があることを提案する。クオラムセンシング(QS)シグナル伝達は、例えば、細菌の病

10

20

30

40

50

原性因子の発現の制御において重要な役割を果たしている。QSは、周囲の環境におけるシグナル伝達分子の蓄積に関与し、これは、単一の細胞が細菌数及びシグナル伝達分子の密度を感知することを可能にし、したがって細菌集団が全体として協調反応をすることができる。これらの細胞間コミュニケーションシステムは、運動性、病原性、孢子形成、抗生物質産生、DNA交換、及びバイオフィーム等のより複雑な多細胞構造の発達等の細菌の様々な機能を調節している。したがって、QSシグナル伝達システムへの妨害は、持続する(慢性)細菌感染症に対抗する新たな戦略を提案する可能性がある。クオラムクエンチング(QQ)能力を有する天然に存在する化合物等の特定の物質の能力は、抗接着化合物として、且つバイオフィーム形成を妨害する化合物として使用することができる。

【0094】

本明細書に開示される化合物は、バイオフィーム関連障害の治療に特に有用であり、この障害は、慢性感染症及び/又は持続性感染症によって特徴づけられる。本明細書に開示される化合物は、慢性感染症及び/又は持続性感染症の治療に特に有用である。持続性感染症及び慢性感染症という用語は、しばしば互換的に使用されるが、異なるメカニズムに基づいている。持続性感染症は、通常、免疫防御によって抑制されているが、そのような免疫防御が弱まるとき、活性化することがある。持続性感染症は、無症状であることが多く、免疫防御が病原体を制御できなくなったときにのみ臨床的に明らかになる。持続性感染症は、無症状であることが多いが、当業者であれば、例えば、患者の試料(例えば、血液又は尿)から微生物を検出することを含む、このような持続性感染症を検出する手段を熟知している。慢性感染症では、病原体は細胞の群/組織の一部(例えば、関節又は肺組織)に残存する。患者は常に疾患の症状を有するが、これらは感染の急性期におけるものより軽い可能性がある。

【0095】

バイオフィーム疾患の顕著な例は、ウシ乳房炎である。ウシ乳房炎は、ウシの乳腺の感染症の臨床用語であり、複数の病原体によって引き起こされる場合があり、最も蔓延している形態は、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・ウベリス(*Streptococcus uberis*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ(*Streptococcus agalactia*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、並びにセラチア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)、及び他の通性病原性腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)、及びプロトテカ属種であり、後者は、世界の多くの地域で、攻撃的で治療できない乳房炎を引き起こす新興病原体と考えられている。本発明は、このような微生物を含むバイオフィームを、本明細書に開示される化合物及び組成物を用いて処置することを包含する。

【0096】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物によって治療される創傷は、例えば、黄色ブドウ球菌;連鎖球菌(*Streptococci*);グラム陰性細菌、例えばトレポネーマ属種(*Treponema spp.*)、大腸菌、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、緑膿菌;又は酵母/真菌、例えばカンジダ属種(*Candida spp.*)(アルビカンス種(*albicans*))、クラドスポリウム・ヘルバルム(*Cladosporidium herbarum*)、トリコスポロン属(*Trichosporum*)、ロドスポリジウム属(*Rhodosporidium*)、及びマラセチア属(*Malassezia*)を含む。

【0097】

バイオフィーム関連微生物が、心内膜炎、骨髄炎、副鼻腔炎、尿路感染症、慢性前立腺炎、歯周炎、嚢胞性線維症患者における慢性肺感染症、中耳感染症、及び様々な院内感染症、特にすべての既知の留置機器(カテーテル、インプラント)に関連したものを含む多くの感染症を引き起こすことは、現在、一般的に認識されている。バイオフィーム疾患の負担は大きく、医療における主要な懸念事項である。

ストレスの条件下でほとんどすべての細菌種がバイオフィームを形成することができることが知られているが、現在の臨床診療では、たとえ同じ種及び株の、非バイオフィーム、浮遊性形態が、一般的治療剤(抗生物質及び抗真菌薬/殺真菌剤)に対して非常に良好な感受性を示しても、関連感染症がほとんど完全に治療抵抗性であることから、いくつかの細

10

20

30

40

50

菌及び真菌種が大きな関心を集めている。

【0098】

そのバイオフィルムに関連した療法抵抗性のために大きな臨床的問題となっている病原体の例を下記に記載する：

アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*)-肺アスペルギルス症(真菌疾患)

バークホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*)-肺嚢胞性線維症重複感染症

カンジダ属種(酵母)-胃腸管及び尿生殖路の粘膜表面

ガードネラ・バギナリス(*Gardnerella vaginalis*)(尿生殖路)

大腸菌(多臓器及び敗血症)

緑膿菌(多臓器及び嚢胞性線維症を含む肺感染症)

黄色ブドウ球菌(多組織及び創傷感染症、院内感染症)

表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)(多組織及び創傷感染症)

ステノトロフォモナス・マルトフィリア(*Stenotrophomonas maltophilia*)(慢性気道疾患)。

【0099】

このようなバイオフィルム関連障害及びバイオフィルム関連微生物の治療/処置は、本発明によって包含される。好ましい実施形態では、バイオフィルム関連障害は、乳房裂である。式Iの化合物を用いて治療されうる他のものは、潰瘍(例えば、糖尿病性足部潰瘍(DFU)、静脈性下肢潰瘍(VLU)、及び褥瘡(PU));モルテラロ(*mortellaro*)(趾皮膚炎);並びに湿疹を含む。

【0100】

微生物バイオフィルムは、細菌によって形成されるだけでなく、他の微生物、特に病原性真菌(複数のアスペルギルス(*Aspergillus*)関連肺疾患の主な原因であるアスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*))及び酵母(カンジダ属種)が胃腸管及び尿生殖路の粘膜表面にコロニー形成することによっても形成される。最も蔓延しているインプラント関連バイオフィルムは、黄色ブドウ球菌(MSSA及びMRSA)、カンジダ・アルビカンス、緑膿菌、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumonia*)、及びエンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)によって形成される。更に、例えば、プロトテカ属種等の微細藻類は、バイオフィルムを形成することができ、ヒト及び動物における疾患(プロトテカ症)の原因である。

【0101】

いくつかの実施形態では、バイオフィルムは、トレポネーマ属種、ペスト菌、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・アガラクティエ(*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ、ストレプトコッカス・ウベリス、セラチア・マルセッセンス、トルエペレラ・パイオジェンス(*Trueperella pyogenes*)、マンヘミア・ヘモリチカ(*Mannheimia haemolytica*)、パスツレラ・ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)、緑膿菌、バークホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*Hemophilus influenza*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、フソバクテリウム・ネクロホラム(*Fusobacterium necrophorum*)、コリネバクテリウム・シュードツベルクロシス(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、ストレプトコッカス属種(*Streptococcus* spp.)、ポルフィロモナス・ジンジバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、緑膿菌、エンテロコッカス・フェカリス、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、大腸菌、サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)、及び緑膿菌のうちの1つ又は複数から選択される細菌を含む。いくつかの実施形態では、バイオフィルムは、アブシディア属種(*Absidia* spp.)、アクチノマイセス属種(*Actinomyces* spp.)、アスペルギルス属種(*Aspergillus* spp.)、ボトリチス属種(*Botrytis* spp.)、カンジダ属種、セントロスポラ属種(*Centrospora* spp.)、セファロスポリウム属種(*Cephalosporium* spp.)、セラトシスチス属種(*Ceratocystis* spp.)、ケトコニジウ

10

20

30

40

50

ム属種(*Chaetoconidium* spp.)、ケトミウム属種(*Chaetomium* spp.)、クラドスポリウム属種(*Cladosporium* spp.)、コレトトリカム属種(*Colletotrichum* spp.)、コニディオボラス属種(*Conidiobolus* spp.)、フルビア属種(*Fulvia* spp.)、フザリウム属種(*Fusarium* spp.)、ゲオトリクム属種(*Geotrichum* spp.)、ギニャルディア属種(*Guignardia* spp.)、ヘルミントスポリウム属種(*Helminthosporium* spp.)、ヒストプラズマ属種(*Histoplasma* spp.)、レシトフォラ属種(*Lecythophora* spp.)、マラセチア属種(*Malassezia* spp.)、ネクトリア属種(*Nectria* spp.)、ノカルジア属種(*Nocardia* spp.)、オースポラ属種(*Oospora* spp.)、オフィオボラス属種(*Ophiobolus* spp.)、ペシロマイセス属種(*Paecilomyces* spp.)、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス(*Paracoccidioides brasiliensis*)、ペニシリウム属種(*Penicillium* spp.)、フィマトリクム属種(*Phymatotrichum* spp.)、フィトフトラ属種(*Phytophthora* spp.)、フィチウム属種(*Pythium* spp.)、ピエドライア・ホルタイ(*Piedraia hortai*)、リゾクトニア属種(*Rhizoctonia* spp.)、リゾプス属種(*Rhizopus* spp.)、ロドスポリジウム属種(*Rhodosporiidum* spp.)、サッカロマイセス属種(*Saccharomyces* spp.)、スセロチウム属種(*Scerotium* spp.)、スクレロティニア属種(*Sclerotinia* spp.)、トルロプシス属種(*Torulopsosis* spp.)、及びトリコフィトン属種(*Trichophyton* spp.)から選択される真菌を含む。カンジダ属(*Candida*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、クリプトコッカス属(*Cryptococcus*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、コクシジオイデス属(*Coccidioides*)、及びニューモシスチス属(*Pneumocystis*)等の多くの医学的に重要な真菌が、バイオフィルムを生成することが知られている。いくつかの実施形態では、バイオフィルムは、微細藻類、例えば、プロトテカ属種を含む。

10

20

【0102】

特定の実施形態では、細菌感染症又はバイオフィルム関連障害は、グラム陰性細菌によって引き起こされる。特定の実施形態では、細菌感染症又はバイオフィルム関連障害は、グラム陽性細菌によって引き起こされる。特定の実施形態では、細菌感染症又はバイオフィルム関連障害は、多剤耐性細菌によって引き起こされる。特定の実施形態では、細菌感染症は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)関連感染症又は表皮ブドウ球菌(例えば、MRSE)関連感染症である。

【0103】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、大腸菌であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、再発性尿路感染症、カテーテル関連尿路感染症、又は胆道感染症である。

30

【0104】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、緑膿菌であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、嚢胞性線維症肺感染症(*Cystic fibrosis lung infection*)、慢性創傷感染症、カテーテル関連尿路感染症、慢性鼻副鼻腔炎、慢性中耳炎、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患、又はコンタクトレンズ関連角膜炎である。

【0105】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、黄色ブドウ球菌であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、慢性骨髓炎、慢性鼻副鼻腔炎、心内膜炎、慢性中耳炎、又は(整形外科用)インプラントのものである。

40

【0106】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、表皮ブドウ球菌であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、中心静脈カテーテル、整形外科用インプラント、又は慢性骨髓炎である。

【0107】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、鼻咽頭の感染症、慢性鼻副鼻腔炎、慢性中耳炎、又は慢性閉塞性肺疾患における感染症である。

50

【0108】

好ましい実施形態では、バイオフィルムを引き起こす細菌は、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)であり、好ましくはバイオフィルム感染症は、口腔及び鼻咽頭の感染症、再発性扁桃炎である。

【0109】

バイオフィルム感染症の臨床的兆候は、医師に知られている(例えば、Wuら *Int J Oral Sci.* 2015 Mar; 7(1): 1~7の表1を参照されたい)。このようなバイオフィルム障害は、慢性感染症をもたらす。急性感染症か慢性感染症かの決定も、医師に知られている。例えば、メイヨークリニックによると、1年以内に4回以上酵母感染症が発生した場合、慢性酵母感染症であることを示し、一方で6カ月の期間の間に2回以上膀胱感染症が発生した場合、慢性膀胱感染症(再発性尿路感染症とも呼ばれる)であることを示す。

10

【0110】

細菌の病原性感染症を治療する最も一般的な方法は、抗生物質の使用である。現在の抗生物質は、主に増殖に依存したメカニズムを通して作用し、急速に分裂する細菌を標的にする。しかし、非複製性又はゆっくり増殖する細菌(例えば、休眠生細胞(*dormant persister cell*)、バイオフィルム)は、高いレベルの抗生物質耐性及び/又は抵抗性を示し、持続的で再発性の感染症の一因となる。本明細書に開示される化合物は、抗生物質抵抗性細菌、抗生物質耐性細菌、及び抗生物質持続性細菌(*antibiotic persistent bacteria*)を含む感染症又はバイオフィルムにおける使用に適している。本明細書に開示される化合物は、第二選択療法として、又はむしろ以前の治療(例えば、抗菌治療)に反応しなかったか若しくは、障害が、例えば、1年又は6カ月以内に再発した個体にも適している。

20

【0111】

本開示は、バイオフィルムによって誘導される又はバイオフィルムに関連するあらゆる障害を治療するための、本明細書に開示される化合物及びそれを含む組成物を更に提供する。バイオフィルムによって誘導される又はバイオフィルムに関連する障害は、当業者にはよく知られている。特に、このような障害は、バイオフィルム関連感染症である。治療に適切な障害は、例えば、細菌性前立腺炎、細菌性膣炎、胆道感染症、慢性副鼻腔炎、慢性肺疾患、う歯、心内膜炎、腎結石、喉頭炎、嚢胞性線維症における肺感染症、歯肉炎、乳房炎、中耳感染症、院内(血流)感染症、閉塞性肺疾患、骨髓炎、中耳炎、歯周炎、肺炎、前立腺炎、鼻副鼻腔炎、副鼻腔炎、扁桃炎、結核、尿路感染症、及び創傷感染症を含む。例えば、マイコプラズマ・ボビス(*Mycoplasma Bovis*)は、乳房感染症及び関節感染症を引き起こすことが知られている。バイオフィルム関連障害は、留置機器(例えば、医療用インプラント、カテーテル等)に形成されたバイオフィルムによって引き起こされる障害も含む。一般に、そのような障害は、インプラントを取り除く/取り換えることによって治療される。好ましい実施形態では、障害は、乳房炎である。いくつかの実施形態では、障害は、乳房炎ではない。いくつかの実施形態では、治療は、炎症性腸疾患のためではなく、特に大腸炎のためではない。

30

【0112】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物及び組成物は、本明細書に更に開示されるように、人工関節及び心臓弁等の埋め込まれた医療機器の感染を処置及び予防するのに有用である。

40

【0113】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物及び組成物は、細菌感染症又はバイオフィルムに反応する炎症を予防又は低減するのに有用である。炎症は、病原体等の有害な刺激に対する体組織の複雑な生物学的反応の一部であり、免疫細胞及び分子メディエーターが関与する防御反応である。炎症の機能は、病原体を排除することである。

【0114】

好ましい実施形態では、本明細書に開示される化合物又はそれを含む組成物を用いた個体の処置は、動物、例えば、ウシの臨床的炎症を予防又は低減する。好ましくは、その処置は、乳房の(臨床的)炎症を予防又は低減する。別の実施形態では、この化合物及びそれ

50

を含む組成物を用いた個体の処置は、ヒトの(臨床的)炎症を予防又は低減する。例えば、この処置は、皮膚の炎症を予防又は低減し、好ましくは、湿疹を予防する。

【0115】

理論に拘泥されることを望むものではないが、本明細書に開示される化合物又はそれを含む組成物を用いた個体の処置は、バイオフィルムの形成若しくは増殖を低減し、且つ/又はバイオフィルムの分解若しくは低減を引き起こす。したがって、その個体はもはや、病原体の存在下で炎症反応を起こさなくなる。言い換えれば、バイオフィルム及びこれらのバイオフィルム内の病原体の除去は、炎症反応を低減し、臨床的炎症を予防する。

【0116】

バイオフィルムの処置の間、微生物(細菌及び真菌等)は、バイオフィルムから放出される。場合によっては、個体の免疫系が活性微生物に反応する。その結果、組織の炎症が生じる可能性がある。活性化免疫細胞及び炎症反応はまた、例えば、乳腺の組織に損傷を与える可能性がある。したがって、炎症反応の抑制は、組織への損傷を予防又は低減する可能性がある。

10

【0117】

更に、組織が損傷を受け、炎症が終息した後、体は修復を開始する。依然として存在するマクロファージが、新しい血管の生成を刺激する。それらはまた、線維芽細胞を確実に引きつける。これらの線維芽細胞は、最後に肉芽組織の形成を引き起こす。例えば、乳牛の処置の場合、乳汁産生組織の代わりに瘢痕組織が形成される可能性がある。したがって、ウシの乳汁産生量は、炎症の前よりも少なくなる可能性がある。

20

【0118】

本明細書に記載される化合物に加えて、炎症反応を抑制し、組織損傷を低減するために、さらなる抗炎症薬を投与することができる。好ましい実施形態では、本明細書に開示される処置(治療的と予防的の両方)は、抗炎症剤の投与を更に含む。抗炎症剤は、例えば、非ステロイド系抗炎症剤(cox/lox阻害剤)、例えばイブプロフェン、パラセタモール、アスピリン、ジクロフェナク、ケトプロフェン、トルメチン、エトドラク、及びフェノプロフェンを含む。天然の抗炎症剤、例えばクルクミン、ショウガ、スピルリナ属(*Spirulina*)、トウガラシ、シナモン、クローブ、セージ、ローズマリー、ブラックペッパー、天然アスピリン、ボスウェリア属(*Boswellia*)、サンギナリア属(*Sanguinaria*)、及び/又は緑茶も使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び使用は、本明細書に開示される治療用有機硫黄化合物と抗炎症剤の併用治療を含む。化合物は、一緒に又は別々に投与してもよい。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に開示される治療用有機硫黄化合物と抗炎症剤を含んで提供される。

30

【0119】

いくつかの実施形態では、本方法は、好ましくはバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防若しくは低減する、バイオフィルムを分解若しくは低減する、且つ/又は感染症(特に細菌感染症又は真菌感染症)を治療若しくは予防するように、本明細書に開示される化合物を含む組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、疾患、又は障害、又は感染症の治療(例えば、治療剤)又は予防(例えば、予防剤)のために個体に投与することができる。いくつかの実施形態では、個体は、バイオフィルム関連疾患を有するか、又はそれを発症する危険性がある。

40

【0120】

本組成物は、任意の個体、特に動物に投与することができる。好ましくは、動物は、反芻動物(ウシ及びヤギ等)であり、より好ましくは、ウシである。いくつかの実施形態では、動物は、ウシではない。好ましくは、動物は、単胃、げっ歯類、非ヒト霊長類、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、又はトリ等、非反芻動物である。好ましい実施形態では、動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、動物は、非ヒト動物である。いくつかの実施形態では、動物は、魚、軟体動物、及び甲殻類等の水生動物ではない。好ましくは、動物は、哺乳動物又はトリである。

【0121】

50

理論に拘泥されることを望むものではないが、本開示は、本明細書に開示される化合物が単回投与後に有利な効果を有することを提供する。好ましい実施形態では、効果は、本明細書に開示される化合物の単回経口投与をすることによって達成される。そのような経口投与は、例えば、本明細書に開示される化合物の持続放出を提供する錠剤としてでありうる。

【0122】

本開示は、複数回投与も提供する。例えば、組成物は、1日2回以上、毎日、毎週、又は毎月提供されうる。例示的な実施形態では、組成物は、1日1回、1週間又は症状が緩和されるまで提供されうる。

【0123】

本明細書に記載される医薬製剤の実際の投薬レベルは、患者にとって有害となることなく、特定の患者、組成物、及び投与の様式に対して所望の治療反応を達成するのに効果的である活性成分の量を得るように変えることができる。選択される投薬レベルは、特定の化合物の活性、投与の経路、投与の時間、用いられる特定の化合物の排出速度、治療の期間、併用して使用される他の薬物、化合物、及び/又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康、及び前病歴、並びに医学分野においてよく知られている同様の要因を含む様々な要因に依存する。当技術分野で通常の技術を有する医師又は獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【0124】

当業者は、小さい動物ほど代謝率が高く、したがって、小さい動物ほど体重ベースでより多くの薬物用量を必要とすることを認識している。動物間、及びヒトと動物間での用量換算は、Nair及びJacob (J Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7(2): 27-31頁)並びにHolliday,ら、(1967 The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size. A Review. Pediat.Res. 1: 185-195頁)で概説されている。

【0125】

本明細書に開示される方法及び使用のいくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物の少なくとも5mg/日がヒトに提供される(経口投与によって等)。好ましくは、化合物の少なくとも10mg/日が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物は、0.1mg/kg~100mg/kgの用量でヒトに提供される。化合物のこのような量は、化合物を全身的に(例えば、経口的に)提供するときに特に有用である。当業者であれば、局所的に(例えば、皮膚、歯肉、創傷に)投与するときにはより少ない量を使用することができることを認識するであろう。本明細書に開示される組成物は、好ましくは少なくとも1週間、又は症状が緩和されるまで提供される。このような組成物は、数回(例えば、週に1回、月に1回、年に2回等)提供してもよいが、予防効果及び治療効果は1回の使用後に観察される。

【0126】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物の1~50gが、例えば、乳房炎の治療のためにウシに投与される。好ましくは、少なくとも5gの化合物が投与される。

【0127】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物を、抗生物質(例えば、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤)、抗炎症剤、解熱剤、及び鎮痛剤等の1つ又は複数のさらなる薬剤と共に含む化合物が提供される。

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される化合物は、抗真菌薬又は抗生物質等の抗菌剤と共に使用される。理論に拘泥されることを望むものではないが、本開示は、本明細書に開示される化合物がバイオフィルムを標的とすることを提供する。抗菌薬は、それから、崩壊したバイオフィルム中の微生物細胞だけでなく残存浮遊性細胞に対しても、その効果を発揮することができる。当業者であれば理解するように、抗菌薬と本明細書に記載される化合物の併用は、抗菌薬の投薬量及び/又は投薬頻度を低減することができる。

【0129】

併用治療で使用されうる例示的な抗菌薬は、ミコナゾール、ケトコナゾール、エコナゾール、テルビナフィン、シクロピロクス、トルナフテート、セルタコナゾール、スルコナゾール、アムホテリシンb、クロロキシレノール、クリオキノール、ブテナフィン、ナフチフィン、ナイスタチン、及びクロトリマゾール等の抗真菌薬を含む。例示的な抗生物質は、ペニシリン系、テトラサイクリン系、セファロスポリン系、キノロン系、リンコマイシン系、マクロライド系、スルホンアミド系、グリコペプチド系、アミノグリコシド系、及びカルバペネム系を含む。

【0130】

本開示は、本明細書に開示される化合物を抗菌薬と共に含む組成物を提供する。当業者であれば理解するように、化合物及び抗菌薬は、別々に提供することもできる。いくつかの実施形態では、化合物及び抗菌療法は、重複する。いくつかの実施形態では、本発明の化合物を用いた療法は、抗菌療法に先行する。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、食品若しくは機能性食品として、又は食品若しくは機能性食品中に提供される。「機能性食品」という用語は、本明細書で使用される場合、それらの栄養特性のためだけではなく、健康増進又は疾患にかかるリスクの低減等の特定の機能を果たすためにも調製される食品を指す。このような機能性食品は、栄養補助食品又は(動物)食品添加物と呼ばれる場合もある。この目的のために、ミネラル、ビタミン、脂肪酸、有益な効果を有する細菌、食物繊維、及び抗酸化物質等の生物学的に活性な化合物が、そこに加えられる。このような食品は、経口摂取に適した任意の形態、例えば、液体、ゲル、粉末、丸薬、錠剤、又はゲルカプセルであってもよい。

20

【0132】

機能性食品は、動物消化物(animal digest)、例えば、清潔で未分解の動物組織の化学的及び/又は酵素的加水分解により生じる任意の材料も含みうる。機能性食品は、乾燥ビール酵母、例えば、醸造業の副産物である乾燥した不活性体も含みうる。動物消化物及び乾燥ビール酵母は、機能性食品の嗜好性を高めることが見出されている。機能性食品に存在するとき、動物消化物は、機能性食品の約10%～約90%を占め、乾燥ビール酵母は、機能性食品の約1%～約30%を占める。

【0133】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示される治療用有機硫黄化合物を、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤、及び/又は賦形剤と共に含む組成物を提供する。(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997を参照されたい)。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、健全な医学的判断の範囲内であり、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症なしに人間及び動物の組織と接触して使用するのに適しており、妥当な利益/リスク比に見合ったこれらの組成物、又は薬剤、材料、若しくは組成物の組合せ、及び/又はそれらの剤形を指す。更に、「薬学的に許容される希釈剤又は担体」という用語は、ペプチドを有する臓器、又は体の一部から、別の臓器、又は体の一部に運ぶ又は輸送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクル、例えば液体若しくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、又は封入材料を指す。

30

40

【0134】

医薬組成物は、任意の適切な経路及び様式によって投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路及び/又は様式は、所望の結果に応じて変わる。医薬組成物は、非経口、局所(眼内を含む)、経口、舌下、経皮、又は吸入による等の任意の経路による投与のために、所定の手順に従って製剤化されうる。非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、冠動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨下の注射及び注入を含む。好ましい経路は、経口又は局所投与である。

50

【0135】

本組成物は、液体、半固体、及び固体の剤形等の任意の適切な形態でありうる。本組成物は、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、トローチ剤、クリーム、又は液体製剤(特に皮膚又は目への投与用)の形態、例えば無菌の非経口溶液又は懸濁液又は噴霧剤、エアロゾル、若しくは吸入のための他の従来の方法の形態でありうる。本発明の医薬組成物は、経口、経鼻、局所(頬側及び舌下を含む)、直腸、腔内、及び/又は非経口投与に適したものを含む。特定の実施形態では、組成物は、クリーム、ゲル、軟膏、ローション、泡沫、懸濁液、噴霧剤、エアロゾル、又は粉末エアロゾルの形態の局所用組成物である。この組成物は、皮膚への投与に特に有用である。適切な組成物は、口腔ケア組成物、例えば練り歯磨き粉、歯磨き剤、歯磨き粉、歯磨きゲル、歯肉縁下ゲル、マウスリンス/マウスウォッシュ、人工唾液、義歯製品、マウススプレー、トローチ剤、口腔用錠剤、及びチューインガムも含む。

10

【0136】

本開示は、ある表面のバイオフィルムの形成若しくは増殖を予防する若しくは低減するための、且つ/又はある表面のバイオフィルムの分解若しくは低減のための、本明細書に開示される組成物のインビトロでの使用も提供する。好ましくは、本方法は、ある表面のバイオフィルム又はバイオフィルム形成を低減するためのものである。いくつかの実施形態では、本方法は、ある表面に付着したバイオフィルムを本明細書に開示される組成物と接触させる工程を含む。本組成物は、例えば洗浄組成物を含む。バイオフィルムを洗浄する(又はむしろ除去又は低減する)ための組成物は、当技術分野で知られており、界面活性剤及び酵素(例えば、プロテアーゼ及びポリサッカリダーゼ)を含みうる。

20

【0137】

任意の表面がそのような表面を被覆するように本明細書に開示される組成物を用いて処理されうる。その表面を、例えば、組成物に噴霧、浸漬、又は浸すことができる。ある表面は、ガラス、金属、多孔質、及び非多孔質の表面を含む。それは、食品産業で見られるもの、又は病院及び医療施設で見られる医療機器等の、汚染される可能性のある機器の外部と内部及び表面、並びに配管システム(例えば、洗面台の排水管)、調理台、建築材料、配管、無菌室にも関連する。ある表面は、パイプ、例えば排水管の内部又は外部、並びにスイミングプール、水槽(例えば、水産養殖用)、浄化フィルター、便器、洗面台、温室の表面も指す。ある表面は、飲料用の桶から等の水も含む。

30

【0138】

いくつかの実施形態では、その表面は、補綴装具(股関節インプラント、歯科インプラント、人工関節、ボイスプロテーゼ(voice prosthetic)、人工陰茎(penile prosthetic))、機械式心臓弁、心臓ペースメーカー、動静脈シャント、強膜バックル、カテーテル(例えば、中心静脈カテーテル、血管内カテーテル、尿路カテーテル、ヒックマンカテーテル、腹膜透析カテーテル、気管内カテーテル)、中耳腔換気用チューブ(tympanostomy tube)、気管切開チューブ、外科縫合糸、骨アンカー、骨ネジ、眼内レンズ、コンタクトレンズ、子宮内避妊器具、大動脈大腿動脈グラフト(aortofemoral graft)、又は血管グラフト等の医療機器の表面である。医療機器からの他の感染症は、腹部ドレーン管、胆道ステント、乳房インプラント、心臓ペースメーカー、髄液シャント、コンタクトレンズ、除細動器、義歯、電気透析装置、気管内チューブ、留置尿路カテーテル、子宮内避妊器具、静脈内カテーテル、人工関節、機械式心臓弁、腎瘻チューブ、整形外科用インプラント、腹膜透析カテーテル、人工心臓弁、人工関節、人工材料整形外科用デバイス(all osplastic orthopedic device)、組織充填剤、尿道ステント、人工血管、人工呼吸器関連肺炎、補助人工心臓、心室派生物(ventricular derivation)、脳室シャント、ボイスプロテーゼからのものを含む。

40

【0139】

いくつかの実施形態では、その表面は、クランプ、鉗子、ハサミ、皮膚フック(skin hook)、管、針、開創器、歯石除去器、ドリル、のみ、やすり、又は鋸等の外科用器具の表面である。

50

【0140】

本明細書で使用される場合、「含む(to comprise)」及びその活用は、その語に続く項目が含まれるが、具体的に言及されていない項目が除外されないことを意味する非限定的な意味で使用される。更に、動詞「からなる(to consist)」は、本明細書で定義される化合物又は補助化合物が、具体的に明示されたものよりも、本発明の特有の特性を変えないさらなる成分を含みうることを意味する「本質的に～からなる(to consist essentially of)」により置き換えることができる。

【0141】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書では、冠詞の文法上の目的語の1つ又は2つ以上(すなわち、少なくとも1つ)を指すために使用される。例として、「要素(an element)」は、1つの要素又は2つ以上の要素を意味する。

10

【0142】

「およそ」又は「約」という語は、数値と関連して使用されるとき(およそ10、約10)、その値が、その値の1%大きい又は小さい10の所与の値であってもよいことを好ましくは意味する。

【0143】

本明細書に開示される化合物及び組成物は、療法として且つ治療的処置において有用であり、したがって、医薬として有用であり、医薬を調製する方法において使用されうる。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト又は動物の体の処置ではない方法、及び/又は人間の生殖系列の遺伝的同一性を改変する工程を含まない方法を提供し、ここで、細胞は、ヒト生殖細胞系列ではない。

20

【0144】

本明細書で引用されるすべての特許及び文献参照は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0145】

本発明は、以下の実施例で更に説明される。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、単に本発明を明確にするためのものである。

【実施例】

【0146】

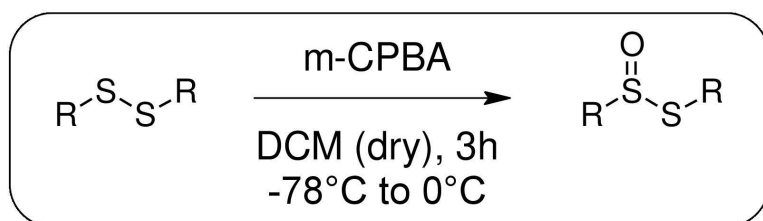
(実施例1)

チオスルフィネートの化学合成

対称脂肪族チオスルフィネートの合成のための一般手順は、よく知られている(例えば、J Am Chem Soc; 1947; 69; 1710~1713頁を参照されたい)。反応スキームは下記に示され、ここで、化合物1の場合、両方のRは、エチルであり;化合物2の場合、両方のRは、プロピルであり;化合物3の場合、両方のRは、ブチルである。

【0147】

【化8】



40

【0148】

出発物質は、以下の供給業者から入手した。ジスルフィド(ジエチルジスルフィド、ジプロピルジスルフィド、及びジブチルジスルフィド)はTCI社から、m-CPBA及び硫酸マグネシウムはSigma Aldrich社から、炭酸水素ナトリウム(sodium hydrogen bicarbonate)はThermo Fisher社から、及びジクロロメタンはRathburn社から購入した。

【0149】

50

ジスルフィド(16.36mmol)をN₂雰囲気下-78℃で乾燥ジクロロメタン(DCM、30mL)に溶解し、それから乾燥DCM(30mL)に溶解したメタ-クロロ過安息香酸(m-CPBA、16.36mmol)を滴下添加した。添加が完了したら、反応を3時間攪拌させ、ゆっくりと0℃に温めた。反応を飽和炭酸水素ナトリウムでクエンチし、得られた水溶液をDCMで3回抽出した。それから、合わせた有機画分を無水MgSO₄で乾燥させ、溶媒を減圧下で蒸発させた。その後、粗生成物を自動フラッシュクロマトグラフィー(40gシリカ、30:70%酢酸エチル:ヘプタン、20分、28mL/分)によって精製した。生成物は、KMnO₄染色を使用して薄層クロマトグラフィー(TLC)によって検出した。生成物を含む画分を合わせて、溶媒を40℃で真空中で蒸発させ、¹H-NMRによって分析される純粋な生成物(化合物1~3)を得た。

10

【0150】

化合物1: S-エチルエタンスルフィノチオエート(ジエチルチオスルフィネート)

収率: 54%, 黄色油状物として; ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): 3.25-3.05 (4H, m, O=SCH₂, SCH₂), 1.46 (3H, t, J = 7.2 Hz, O=SCH₂CH₃), 1.40 (3H, t, J = 7.6 Hz, SCH₂CH₃) ppm.

【0151】

化合物2: S-プロピルプロパン-1-スルフィノチオエート(ジ-n-プロピルチオスルフィネート)

収率: 49%, 黄色油状物として; ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): 3.18-3.00 (4H, m, O=SCH₂, SCH₂), 1.90-1.72 (4H, m, O=SCH₂CH₂, SCH₂CH₂), 1.06 (3H, t, J = 7.2 Hz, (O=SCH₂CH₂CH₃), 1.01 (3H, t, J = 7.6 Hz, SCH₂CH₂CH₃) ppm.

20

【0152】

化合物3: S-ブチルブタン-1-スルフィノチオエート(ジ-n-ブチルチオスルフィネート)

収率: 51%, 黄色油状物として; ¹H-NMR δ (400 MHz, CDCl₃): 3.10-2.90 (4H, m, O=SCH₂, SCH₂), 1.75-1.58 (4H, m, O=SCH₂CH₂, SCH₂CH₂), 1.45-1.28 (4H, m, O=SCH₂CH₂CH₂CH₃, SCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.84 (3H, t, J = 7.2 Hz, O=SCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.81 (3H, t, J = 7.6 Hz, SCH₂CH₂CH₂CH₃) ppm.

【0153】

(実施例1b)

実験デザイン:ジスルフィドの酸化は、対応するチオスルフィネート及びチオスルホネートの形成をもたらす。酸化反応では、市販のジスルフィドを使用し、mcpba(メタ-クロロ過安息香酸)を有機合成における酸化剤として使用した。これにより対応するチオスルフィネートが形成される。

30

【0154】

対称チオスルフィネートの合成のための一般手順(J Am Chem Soc; 1947; 69; 1710~1713頁)。ジスルフィド(16.36mmol)をN₂雰囲気下-78℃で乾燥DCM(=ジクロロメタン、30mL)に溶解し、乾燥DCM(30mL)に溶解したm-CPBA(メタ-クロロ過安息香酸16.36mmol)を滴下添加した。添加が完了したら、反応を3時間攪拌させ、ゆっくりと0℃まで温めた。反応を飽和炭酸水素ナトリウムでクエンチし、得られた水溶液をDCMで3回抽出した。続いて、合わせた有機画分を無水MgSO₄で乾燥させ、溶媒を減圧下で蒸発させた。その後、粗生成物を自動フラッシュによって精製した(供給業者:Teledyne Isco社)。生成物は、KMnO₄染色を使用して薄層クロマトグラフィー(TLC)によって検出した。生成物を含む画分を合わせて、溶媒を40℃で真空中で蒸発させ、¹H-NMRによって分析される純粋な生成物を得た。備考:脂肪族、F-アリアル、及び複素環式類似体では、溶媒を蒸発させるときに特に注意を払う。分解又は揮発性による蒸発を防止するために、温度を低く(約25℃)維持する。

40

【0155】

対称チオスルホネートの合成のための一般手順(Chem. Eur. J. 2015, 21, 8105)。30℃で、ジスルフィド(0.012mol)を酢酸(2.34ml)に加え、続いて過酸化水素(30% Wt、10.89ml)をおよそ5分にわたって加えた。温度を55℃に上げ、反応をこの温度で

50

およそ4時間攪拌した。反応を室温に冷却し、pHが塩基性になるまで5MのNaOHで処理した。その後、原料をDCMで3回抽出した。合わせた有機抽出物を無水MgSO₄で乾燥させ、溶媒を減圧下で蒸発させ、粗混合物を得た。その後、精製が自動フラッシュ(Teledyne ISCO社)によって行われる(table 1(表1)及び2(表2))。生成物は、KMnO₄染色を使用してTLCによって検出し、生成物を含む画分を合わせて、溶媒を真空中で蒸発させ、¹H-NMRによって分析した純粋な生成物を得た。備考:脂肪族及び複素環式では、酸化剤を加えた後、反応を40℃に設定する。

【0156】

S-プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネートを、Angew.Chem.Int.Ed., 2018, 57, 12290~12293頁に従って調製した。

10

【0157】

結果。酸化剤として過酸化水素を使用したとき、酢酸の存在下で対応するチオスルホネートが形成された。ほとんどの化合物を標準的な反応条件で合成し、概要にまとめるように良好から中程度の収率であった(Table 1(表1))。特に脂肪族及び複素環式で、反応生成物を得るために、アリール置換体と比較して、チオスルホン化において穏やかな反応条件を必要としたものもあった。ベンジル置換体は、他のアリール置換類似体と比較して反応性が高く、これが試行した反応条件で反応生成物が少なかった理由である可能性がある。複素環式類似体(ジベンゾチアゾリルジスルフィド)は、溶解性の問題により反応を受けず、不溶性の固体を伴うタールが生じた。そのチオスルフィネートの反応を、2種類の溶媒(ジクロロメタン及びクロロホルム)で試みたが、同じ結果であった。対応するチオスルホネートの反応を温度を上げて試みたが、やはり成功しなかった。フルフリルジスルフィドの酸化も、不安定性により困難であった。それは、少ない量のチオスルフィネートをもたらしたが、対応するチオスルホネートの反応ではタールが生じた。

20

合成したF-アリールチオスルフィネート/チオスルホネートを、初めに逆相クロマトグラフィーを使用して精製し、¹H NMRによって分析した(table 1(表1)及び2(表2))。

【0158】

化合物は高温では安定ではなく、ワークアップ中に分解した。したがって、それらを再合成し、シリカクロマトグラフィーによって精製した。

【0159】

30

40

50

Table 1: 対称チオスルフィネートの合成時の収率、精製、及び¹H NMRによる検出。
n.a.: 市販されているため該当なし
*: 40グラムシリカカラム; EtOAc:石油エーテルが液相

置換基	対応するチオスルフィネート	精製 フラスコクロマト グラフイーによる	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)による分析	収率 (%)/ 外観
プロピル	ジ-n-プロピルチオスルフィネート	Si 40gr, EtOAc:石油エーテル *	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/ 無色油
エチル	ジ-エチルチオスルフィネート	Si 12gr, EtOAc:石油エーテル	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
ブチル	ジ-n-ブチルチオスルフィネート	Si 40gr, EtOAc:石油エーテル	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/ 無色油
イソプロピル	S-イソプロピルプロパン-1-チオスルフィネート	Si 12gr, EtOAc:石油エーテル	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
フェニル	ジ-フェニルチオスルフィネート	C18 15.5gr, ACN: H ₂ O	δ 7.66 (dd, J = 6.8, 2.8 Hz, 2H), 7.56-7.36 (m, 8H) ppm	36/ 黄色固体
p-アリール	ビス(4-フルオロプロフェニル)チオスルフィネート	Si 40gr, EtOAc:石油エーテル	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
Cl-アリール	ビス(4-クロロプロフェニル)チオスルフィネート	C18 15.5 gr, ACN:H ₂ O	δ 7.58-7.54 (m, 2H), 7.49-7.46 (m, 2H), 7.43-7.36 (m, 4H) ppm	22/ 白色固体
CH ₃ O-アリール	ビス(4-メトキシプロフェニル)チオスルフィネート	C18 15.5gr, ACN:H ₂ O	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/ 淡黄色固体

【表 1 B】

トリル	ビス(p-トリル)チオスルフィネート	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 δ 7.40-7.34 (m, 10H), 4.35-4.30 (m, 4H) ppm	14/ 淡黄色固体
ベンジル	ジベンジルチオスルフィネート	C18 15.5gr, ACN:H2O	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	17/ 薄桃色固体
フルフリル	ジフルフリルチオスルフィネート	Si 40gr, EtOAc:石油エーテル		56/ 褐色油

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

Table 2: 対称チオスルホネートの合成の収率
n.a.: 市販されているため該当なし
*: 40グラムシリカカラム; EtOAc:石油エーテルが液相

置換基	対応するチオスルホネート	フラッシュクロマトグラフィーによる精製	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)による分析	収率 (%)/ 外観
ブチル	ジ-n-ブチルチオスルホネート	C18 15.5gr, ACN:H ₂ O	δ 3.30 t, J = 8.0 Hz, 2H, 3.13(t, J = 7.6Hz, 2H), 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	20/ 無色油
イソブチル	ジ-イソブチルチオスルホネート	Si 12 gr, EtOAc:石油エーテル	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
F-アリール	ビス(4-フルオロフェニル)チオスルホネート	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/ オフホワイトの固体
Cl-アリール	ビス(4-クロロフェニル)チオスルホネート	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/ オフホワイトの固体
CH ₃ O-アリール	ビス(4-メトキシフェニル)チオスルホネート	Si 40gr, EtOAc:石油エーテル	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/ 淡黄色固体
ベンジル	ジベンジルチオスルホネート	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

【0162】

(実施例2)

MIC及びバイオフィルムアッセイ

本実施例のMICアッセイは、浮遊性微生物の増殖阻害を測定する。本明細書に示されるように、試験した化合物のいくつかは浮遊性細菌に対して効果を示した。

【0163】

当業者には理解されるように、浮遊性微生物に対する化合物の効果は、バイオフィルムに対するそのような化合物の効果を示すものではない。これは、本明細書で以前に議論したようにいくつかの抗菌薬で実証されており、文献でもよく知られている。例えば、バイオフィルム中の細菌が従来の抗生物質に対して約1000倍高い耐性を有することを示す Royら(2018 Virulence 9:522~554頁)を参照されたい。

【0164】

浮遊性微生物に関する研究とは対照的に、本実施例のバイオフィルム根絶アッセイは、バイオフィルムに対する化合物の効果を実証する。

【0165】

バイオフィルムアッセイでの化合物の作用の主なメカニズムは、クオラムセンシング及びそれに続く細菌の接着をもたらす集団的な遺伝子スイッチ、又はバイオフィルムの三次元構造を形成する細胞外マトリックスの合成又は組立との阻害に関連すると考えられる。これらのメカニズムは、純粋な、抗菌(antibacterial/antimicrobial)「殺菌」効果とは完全に異なる。

【0166】

ある化合物がバイオフィルムアッセイで効果的であったが抗菌効果を有さない場合、その化合物は、バイオフィルムから放出された細菌が確実に死滅するように抗生物質と組み合わせることができる。これは、動物の免疫系が損なわれている場合に特に当てはまる。しかし、このような化合物はまた、特異的にバイオフィルムを標的とするのに特に有用である一方、例えば、健康な腸内細菌叢に対してはほとんど又は全く影響を与えない。このような化合物は、特に好ましい。

【0167】

10

20

30

40

50

【表 3】

Table 3: 本研究で使用した化合物とCAS番号及び供給業者。

化合物	CAS番号	供給業者
ジ・メチルジスルフィド	624-92-0	Sigma Aldrich社
ジ・エチルジスルフィド	110-81-6	Sigma Aldrich社
ジ・ <i>n</i> -プロピルジスルフィド	629-19-6	Sigma Aldrich社
ジ・ <i>n</i> -ブチルジスルフィド	629-45-8	Merck社
ジ・フェニルジスルフィド	882-33-7	Sigma Aldrich社
ジ・イソプロピルジスルフィド	4253-89-8	Acros社
ジ・ベンジルジスルフィド	150-60-7	TCI社
ビス(4-フルオロフェニル)ジスルフィド	405-31-2	Fischer Scientific社
メチルプロピルジスルフィド	2179-60-4	TCI社
ビス(4-メトキシフェニル)ジスルフィド	5335-87-5	Thermo Scientific社
ジ・ <i>p</i> -トリルジスルフィド	103-19-5	Sigma Aldrich社
ジ・フルフリルジスルフィド	4437-20-1	TCI社
ビス(4-クロロフェニル)ジスルフィド	1142-19-4	Thermo Scientific社
ジ・ <i>n</i> -ヘキシルジスルフィド	10496-15-8	市販
ジ・ <i>n</i> -デシルジスルフィド	10496-18-1	市販
ジ・(<i>n</i> -プロピル)チオスルフィネート	1948-52-3	有機合成
ビス(<i>p</i> -トリル)チオスルフィネート	6481-73-8	有機合成
ジフェニルチオスルフィネート	1208-20-4	有機合成
ジ・イソプロピルチオスルフィネート	38739-06-9	有機合成
ジ・ベンジルチオスルフィネート	16302-98-0	有機合成
ビス(4-クロロフェニル)チオスルフィネート	6481-72-7	有機合成
ビス(4-フルオロフェニル)チオスルフィネート	61169-14-0	有機合成
<i>S</i> -デシル-1-デカンチオスルフィネート	56527-90-3	有機合成
ジ・(<i>n</i> -プロピル)チオスルホネート	1113-13-9	Syncom社
ジ・メチルチオスルホネート	2949-92-0	Sigma Aldrich社
ジ・フェニルチオスルホネート	1212-08-4	Sigma Aldrich社
ジ・イソプロピルチオスルホネート	10027-69-7	有機合成
ジ・ベンジルチオスルホネート	16601-40-4	有機合成
ビス(4-クロロフェニル)チオスルホネート	1146-44-7	有機合成
ビス(4-フルオロフェニル)チオスルホネート	2905-15-9	有機合成
<i>S</i> -プロピル-4-メチルベンゼンチオスルホネート	90494-81-8	有機合成

【0168】

1.1 化合物の溶解及び希釈

エッペンドルフチューブに、table 3(表3)に示される化合物10～20mgを秤量した。正確な秤量量を記録し、80mM希釈に達するまでの溶媒の容量を計算した。初めに、Tween 80を加えることによって、容量の半分を加えた。第2段階で、もう半分の容量のDMSOを加え、フタをしたチューブを5～10回反転させ、それから少なくとも30秒間徹底的にボルテックスした。この手順の後で溶けていない材料がまだ見えた場合、チューブを37℃、150rpmの振とう機に少なくとも30分間置いた。溶けて透明な希釈物は、80mMの濃度であり、MICアッセイ(方法1.2)のために、カチオン調製済みミューラーヒントンブロス2(MHB-II)で10倍希釈した。MBECアッセイ(方法1.3)では、溶液を、0.9%生理食塩水で最終濃度2mMに希釈し、それから更に生理食塩水で1mM、0.5mM、0.25mM、及び0.125mMに希釈する必要がある。これらの希釈物を、増殖したバイオフィルムの入った96ウェルプレートに処置として加えた(方法3を参照されたい)。

【0169】

1.2 MICアッセイ

表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermis*) ATCC 35984及び緑膿菌 ATCC 27853の凍結アリコートを使用して、トリプティックソイ寒天(TSA)プレートに植菌し、37℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、同じ形態の3~5個のよく分離したコロニーをTSAプレートから選択し、3~6個のガラスビーズで0.9%生理食塩水2mLに再懸濁し、ボルテックスした。細菌懸濁液の600nmでの光学密度(OD_{600})を分光光度計(Evolution(登録商標) 201/220 紫外可視分光光度計、Thermo Fisher Scientific社)で測定し、 10^6 CFU/mLに似た0.0008の OD_{600} に希釈した。

【0170】

MICアッセイを平底96マイクロタイタープレートで行った。MHB-II、50 μ Lをカラム2~11に加え、100 μ Lをカラム12に無菌対照として加えた。8mMの試験化合物溶液(方法1)100 μ Lをカラム1に加えた。カラム1からの8mM溶液50 μ Lをカラム2に再懸濁することによって、溶液のMHB-IIでの2倍希釈系列を達成した。この工程を、カラム10まで繰り返した。カラム1中のTween 80及びDMSOのそれぞれの濃度は2.5%であり、これはプレート全体で2倍に希釈された。細菌懸濁液50 μ Lをカラム1~11に加えた。マイクロタイタープレートをマイクロプレート密封用接着性ポリエチレンフィルム(Diversified Biotech社)で密封し、37℃で24時間インキュベートした。インキュベート後、Varioskan (Thermo Fisher Scientific社)を用いて600nmでODを測定した。得られたOD値をカラム11の増殖対照に対して正規化した後に、細菌培養物の最終 OD_{600} を50%(MIC50)及び90%(MIC90)減少させる最小濃度を計算した。このアッセイを3つの独立した実験で3回繰り返した。

【0171】

1.3 MBECアッセイ

表皮ブドウ球菌 ATCC 35984及び緑膿菌 ATCC 27853の凍結アリコートを使用して、37℃、150rpmで100mLのエレンマイヤーフラスコ中トリプティックソイブロス(TSB)20mLに植菌し、一晩インキュベートした(Infors社)。一晩培養物の OD_{600} を分光光度計(Evolution(登録商標) 201/220 紫外可視分光光度計、Thermo Fisher Scientific社)で測定し、 10^8 CFU/mLに似た0.2の OD_{600} に希釈した。カラム1~11で1ウェルあたり100 μ Lをピペット操作することにより、 $OD_{600}=0.2$ の細胞懸濁液をU底形状の96ウェルプレートに播種し、カラム12は無菌対照として100 μ Lの培地で満たした。96ウェルプレートをマイクロプレート密封用接着性ポリエチレンフィルムで密封し、静置状態で37℃で48時間インキュベートした。バイオフィーム増殖期後、処置溶液(方法1)100 μ Lをバイアルに加え、1mM、0.5mM、0.25 mM、及び0.125mMの処置濃度とし、Tween 80及びDMSOの各濃度をそれぞれ0.63%、0.32%、0.16%、及び0.08%とした。同じ濃度を同じ細菌株の4つの異なるウェルに適用し、各濃度及び株について4つの複製を得た。処置は、静置状態で37℃で20時間インキュベートした。処置後、上清を注意深く除去し、バイオフィームの入ったウェルを0.9%生理食塩水200 μ Lで1回注意深く洗浄した。生理食塩水200 μ Lを加え、バイオフィームを十分に再懸濁した。十分に均一化してから20 μ Lを0.9%生理食塩水180 μ Lでの最初の希釈に使用し、これは2つ目のプレートに調製した。この希釈を、希釈段階 $10E-5$ まで継続し、 $10E-4$ 及び $10E-5$ 希釈100 μ LをTSAプレートにプレーティングした。TSAプレートを37℃で24時間インキュベートした。プレート上のコロニーを数え上げ、分配されたバイオフィームの1mLあたりのコロニー形成単位とその平均値、及び同じウェルプレートからの未処置の試料と比較した対数減少を計算した。コロニー形成単位の減少は、バイオフィームの厚さ、したがってバイオフィームに存在する細菌数と関連して起こる。したがって、バイオフィームのコロニー形成単位の著しい減少は、対数減少値が ≥ 1 と定義した。このアッセイを2つの独立した実験で2回繰り返した。

【0172】

1.4 MBICアッセイ

表皮ブドウ球菌ATCC 35984及び緑膿菌ATCC 27853の凍結アリコートを使用して、トリプティックソイ寒天(TSA)プレートに植菌し、37℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、同じ形態の3～5個のよく分離したコロニーをTSAプレートから選択し、3～6個のガラスビーズで0.9%生理食塩水2mLに再懸濁し、ボルテックスした。細菌懸濁液の光学密度を600nmで(OD₆₀₀)、分光光度計(Evolution(登録商標) 201/220 紫外可視分光光度計、Thermo Fisher Scientific社)で測定し、0.2のOD₆₀₀に希釈した。MBICアッセイを96マイクロタイタープレートで行った。TSB、50 µLをカラム2～11に加え、100 µLをカラム12に無菌対照として加えた。8mMの試験化合物溶液(方法1)100 µLをカラム1に加えた。カラム1からの8mM溶液50 µLをカラム2で再懸濁することによって、溶液のTSBでの2倍希釈系列を達成した。この工程を、カラム10まで繰り返した。カラム1中の Tween 80及びDMSOのそれぞれの濃度は2.5%であり、これはプレート全体で2倍に希釈される。細菌懸濁液50 µLをカラム1～11に加えた。マイクロタイタープレートをマイクロプレート密封用接着性ポリエチレンフィルム(Diversified Biotech社)で密封し、37℃で48時間インキュベートした。インキュベート後、上清を注意深く除去し、バイオフィルムの入ったウェルを0.9%生理食塩水100 µLで1回洗浄した。0.1MのHCl、100 µLを加え、室温で1時間インキュベートし、バイオフィルムを固定した。インキュベート後、HClを除去し、クリスタルバイオレット100 µL(水中0.1% v/v)を加え、室温で30分間インキュベートした。未結合のクリスタルバイオレットを除去し、ウェルを脱塩水100 µLで1回洗浄した。30%酢酸100 µLを加え、37℃及び150rpmで1時間インキュベートした。溶液を再懸濁し、平底96ウェルプレートに移し、吸光度を540nmで分光光度計で測定した。このアッセイを2つの独立した実験で2回繰り返した。

10

20

【0173】

結果及び考察。table 4(表4)に試験の結果が示される。

【0174】

バイオフィルムが根絶又は分解されるとき、微生物は環境中に放出される。バイオフィルムが、例えば、ヒト又は動物のインビボに存在する場合、放出された微生物は免疫系によって攻撃される可能性がある。本インビトロシステムの利点は、環境(例えば、免疫系)の影響を加えることなく、バイオフィルム及びそれぞれの微生物に対する薬剤の効果を調査する機会を与えることである。

30

【0175】

table 4(表4)では、複数の有機硫黄化合物が低いMIC値を示す一方で、MBEC値は高かった。Table 4(表4)はまた、高いMIC値及び非常に低いMBEC値を示すいくつかの化合物を示している。これは非常に驚くべき結果である。これは、表皮ブドウ球菌(*S. epidermis*)及び緑膿菌の増殖は、これらの有機硫黄化合物による影響を受けず、むしろ、これらの化合物はバイオフィルムに対して強い効果を有することを示唆している。

【0176】

40

50

【表 4 A】

Table 4. MIC及びバイオフィームアッセイの結果。MIC50及びMIC90は、試験化合物を含む異なる培養と比較して、細菌培養の最終OD600を50% (MIC50)及び90%(MIC90)減少させる最小濃度と定義した。

分類	化合物	表皮ブドウ球菌		緑膿菌		表皮ブドウ球菌		緑膿菌		表皮ブドウ球菌		緑膿菌	
		MIC50 [mM]	MIC90 [mM]	MIC50 [mM]	MIC90 [mM]	対数減少≥1のMBEC mM	対数減少≥1のMBEC mM	対数減少≥1のMBEC mM	対数減少≥1のMBEC mM	MBIC90 [mM]	MBIC90 [mM]	対数減少≥1のMBEC mM	対数減少≥1のMBEC mM
ジ・アルキルジスルフィド	ジメチルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	ジエチルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	ジ・n-プロピルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4				
	ジ・n-ブチルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				>4
	ジ・n-ペンタニルジスルフィド	0.125	>4	>4	>4	2	>4	>1	0.125				
	ジ・n-ヘキサニルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	ジ・n-セプタニルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	メチルプロピルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	ビス(4-メトキシフェニル)ジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
	ジ・n-トリルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1	>4	4		
	ジ・n-テトラリルジスルフィド	2	>4	2	>4	>4	>4	>1	>1				
	ジ・n-ペンタシルジスルフィド	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>1	>1				
ハロゲン化ジ・アルキルジスルフィド	ビス(4-クロロフェニル)ジスルフィド	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	>1	>1			>4	
	ビス(4-フルオロフェニル)ジスルフィド	0.06	0.06	0.06	0.06	0.125	0.25	>1	>1	>4			

【 0 1 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 4 B】

ジ・アルキルチオ スルフィネート	ジ・αプロピルチオスルフィネート	0.25	0.5	1	2	2	4	>4	2
	ビス(4-トリル)チオスルフィネート	0.125	0.25	0.125	0.25	1	1	>4	>4
	ジ・フェニルチオスルフィネート	1	1	1	1	2	2	>4	>4
	ジ・イソプロピルチオスルフィネート	2	2	2	4	0.5	0.125	>4	>4
	ジ・ベンジルチオスルフィネート	0.03	0.03	0.06	0.5	1	0.125	4	>4
ハロゲン化ジ・ア ルキルチオスル フィネート	ジ・デシル-1-デカンチオスルフィネート	>4	>4	>4	>4	>1	>1		
	ビス(4-クロロフェニル)チオスルフィ ネート	0.02	0.02	0.02	0.02	>1	>1		
	ビス(4-フルオロフェニル)チオスル フィネート	0.125	0.25	1	4	>1	>1		
	ジ・αプロピルチオスルホネート	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	1	2	0.5
	ジ・メチルチオスルホネート	0.25	0.25	0.25	0.5	2	2	>4	4
ジ・アルキルチオ スルホネート	ジ・フェニルチオスルホネート	1	2	2	2	2	>4		
	ジ・イソプロピルチオスルホネート	2	2	2	2	>1	>1		
	ジ・ベンジルチオスルホネート	2	4	4	>4	0.125	0.125		
	ジ・プロピル-4-メチルベンゼンチオス ルホネート	0.06	0.13	0.06	0.06	0.5	>1		
	Bis (4-クロロフェニル)チオスルホネ ート	0.03	0.06	0.25	4	>1	>1		
ハロゲン化ジ・ア ルキルチオスル ホネート	ビス(4-フルオロフェニル)チオスルホ ネート	0.25	2	2	2	>1	>1		

【0178】

(実施例3)

インビボ試験-乳房炎

本明細書に開示される化合物のインビボでの効果を実証するために、いくつかのバイオフィーム関連障害に対してインビボでいくつかの有機硫黄含有組成物を試験した。ウシ乳房炎は、世界中で毎年数百万のウシに影響を与える疾患である。この疾患は、泌乳牛の乳腺に侵入する多様な大きく異なる細菌、いくつかの場合では酵母にもよって引き起こされ、持続性感染症及び炎症反応を引き起こす。ウシ乳房炎は、様々なグラム陽性病原体及びグラム陰性病原体によって引き起こされる可能性があり、個々の病原体の蔓延は、国及び大陸間である程度異なる可能性がある。すべての形態の乳房炎の最も顕著な臨床的兆候は、乳房組織の(慢性)炎症反応によって引き起こされる、人間が消費することを目的とした乳汁中の体細胞数の望ましくない増加である。この二次的な炎症は、乳汁産生量を減少させるため、農場経営者にとって深刻な経済損失を引き起こす。ここ数十年にわたり、異なるクラスの抗生物質を含む数多くの医薬製品が開発され、乳房炎の主な感染因子を処置す

るために単独又は組み合わせて投与されてきた。これらの医薬製品は、細菌感染症と戦うために全身的に(注射により)、又は乳頭チャネル(teat channel)を介して局所的に投与される。しかし、これらの大きな努力にもかかわらず、ウシ乳房炎は、乳牛で最も蔓延している疾患のままであり、抗生物質療法は一般に一時的にのみ効果的であり、多くの場合では、乳房炎の臨床的マーカーとしての体細胞数(SCC)は高いままであった。

【0179】

乳房炎は、バイオフィーム関連障害として知られている。細菌バイオフィームの形成は、細菌バイオフィーム形成に有利に働く条件下で乳房炎病原体を培養するインビトロ実験(染色後に定量化可能であり、バイオフィーム形成を駆動する遺伝子を測定することによる)、及び感染したウシの乳房組織においてバイオフィームマトリックスを染色することによるインサイチュで実証されている。例えば、乳房炎に罹患したウシの乳房組織からのバイオフィームマトリックスを示す、Schonborn S及びKromker V (2016 Journal Veterinary Microbiology, 30;196:126~128頁)の図1である。

【0180】

ここ10年間の生物医学研究により、バイオフィーム形成が乳房感染症及びウシ乳房炎の場合でのみ起こるのではなく、ヒト及び動物の組織に侵入し持続性感染症及び炎症を引き起こす微生物の一般的な特徴であることが明らかになった。今日まで、微生物バイオフィームは、ヒト及び動物の感染症の現代の療法における主な未解決課題の1つである。下記の実施例で提供される臨床的証拠により、ウシ乳房炎及び感染した慢性創傷(例えば、UCD)等の重要なバイオフィーム疾患の治療における、いくつかの有機硫黄含有組成物の予期しなかった治療効果が明らかになった。化合物の適用が、細菌の治療及び組織の再生を示唆する、処置したウシの体細胞数の長期にわたる安定な減少に直接関連することを実証する、いくつかの野外実験が記載される。さらなる実施例は、バイオフィーム関連慢性創傷(すなわち、乳房裂皮膚炎(Udder Cleft Dermatitis)(UCD))に対する効果を説明する。一般的な抗生物質はバイオフィーム感染症に対して効果的でないことが一般に認識されているため、これらの知見は注目に値する。抗生物質に関するこれらの観察は、ヒト及び獣医学の数多くの科学論文に記載されており、それらはすべて、バイオフィームの形成が再発性及び持続性の感染症、並びに組織の炎症及び損傷の主な原因であると示唆している。本明細書に記載される化合物の、原型的なバイオフィーム感染症に対する提示された実験的(インビトロ)及びインビボ(臨床的観察)での有効性は、これらの化合物が臨床診療で効果的に使用されてバイオフィーム感染症を予防及び解決することができることを実証する。バイオフィームの形成及び解消は、分子と微生物の直接的な相互作用として起こり、したがって宿主(動物又はヒト)に依存しない。バイオフィーム形成に関与するメカニズムは細菌種間で高度に保存されているため、化合物がヒト及び動物において幅広いバイオフィーム感染症に対して効果的であることも推定される。実施例は、化合物が経口投与され、異なる部位(例えば、乳腺及びUCD)で効果を発揮できることも実証する。

【0181】

範囲

乳汁中の細胞数又は体細胞数(SCC)に対する化合物の効果を調べるために、実験を行った。試験化合物及び投与された合計投薬量がtable 5(表5)に示される。

【0182】

体細胞数(SCC)は、クォーター(quarter)にある、免疫系が認識できる病原体の量に関連している。各ウシの細胞数を乳汁産生登録(milk production registration)(MPR)で測定した。このMPRは、すべての農場で30~40日ごとに定期的に行われる。体細胞数(SCC)は、乳汁の質の主な指標である。体細胞の大多数は、通常、乳房炎を引き起こす病原体に対する免疫応答として、乳汁中に徐々に多く存在するようになる白血球(leukocyte)(白血球(white blood cell))であり、少数は、感染症が起こると乳房の内部から脱落する乳汁産生細胞である上皮細胞である。

【0183】

炎症は乳房のクォーターのうちの1つで起こることが多く、その結果この乳房において

細胞数が増加する。しかし、乳房の他のクォーターで希釈されるため、細胞数の全体的な増加は低くなる。SCCは、乳汁1mlあたりの細胞の数として定量化される。SCCは、例えば乳房炎を引き起こす病原体による(不顕性)乳房感染症の存在を示し、乳汁の質の主な指標となる。SCCと乳房炎の関係性は、Sharmaら、2011 Asian-Aust J Anim Sci 24:429～438頁で概説されている。

【0184】

SCCのデータは、乳汁産生登録(MPR)から抽出した。MPRは、個々のウシごとに産生された乳汁のすべての詳細(例えばSCC)を示すデータベースである。選択された農場のMPRは、定期的に入手できた。SCCは、乳汁1mlあたりの細胞の数として定量化される。一般的には、SCCの値が100,000以下である個体のウシは、「感染していない」ウシを示し、不顕性乳房炎による著しい産生損失はなかった。250,000を超える閾値SCCは、感染を示し、100,000～250,000の数は感染のリスクが高いことを示す。

【0185】

【表5】

Table 5. ウシに経口投与した化合物及び対応する総量。

試験化合物	Cas番号	錠剤中の総量(g)	試験したウシの数
対照	n.a.	0	1
PTSO	1113-13-9	4.5	5
ジ・n-プロピルジスルフィド	629-19-6	10	3
ジ・n-プロピルチオスルフィネート	1948-52-3	10	1
ジ・メチルチオスルホネート	2949-92-0	10	1
ジ・フェニルチオスルホネート	1212-06-4	10	1

n.a.: 該当なし

【0186】

研究デザイン

実験は90頭のウシがいる農場で行った。上記の錠剤を用いて60日間細胞数について試験を行った。

【0187】

一つの錠剤の投与のために、処置前にSCCが250,000細胞/mlを超えるウシを選択した。

【0188】

ウシの乳汁の体細胞数及び平均体細胞数は、図1に示される。参照ウシのSCCは、比較的高いままであった(図1を参照;0日目の約673と60日目の587を比較)。対照的に、ジ・n-プロピルチオスルフィネート、ジ・メチルチオスルホネート、又はジ・フェニルチオスルホネートの単回処置を受けたウシでは、SCCは著しく減少した。臨床的に顕著な効果が乳房組織で観察されたため、これは、化合物がルーメンを通過するだけでなく(ルーメン微生物への安定性を示す)、肝後血流(post hepatic blood stream)にも到達し(軽微又は重要でない肝生体内変換及び不活性化を示す)、最終的には治療に効果的な濃度で乳腺に到達することを示唆する。

【0189】

(実施例4)

インビボ試験-乳房裂皮膚炎

慢性感染症の分類の一つに、バイオフィルム形成微生物に感染した創傷がある。創傷が感染すると、微生物は、創傷に付着したままになるバイオフィルムの形成を開始する。微生物のEPS(細胞外高分子物質)の産生は、バイオフィルムが数時間以内に複雑な三次元構造を形成するのを助ける。これらの複雑な構造は、創傷の防御メカニズムに対して耐性が

ある。細菌を攻撃するために抗生物質が塗布されると、それはバイオフィルムを部分的に根絶するだけで、創傷及びその下部の組織は感染したままである可能性がある。これらのバイオフィルムは、慢性感染症及び非治癒性創傷をもたらすことが知られている。米国では、毎年約1,600万件の新たなバイオフィルムに基づいた感染症が診断されている。それ故、バイオフィルムは、創傷治癒に対する大きな障壁となっている。このような創傷に感染する病原性微生物の例は、細菌(グラム陽性細菌、例えば黄色ブドウ球菌;連鎖球菌;グラム陰性細菌、例えばトレポネーマ属種、大腸菌、ペスト菌、緑膿菌;酵母/真菌、例えばカンジダ属種(アルビカンス種)、クラドスポリウム・ヘルバルム、トリコスポロン属、ロドスポリジウム属、及びマラセチア属である。

【0190】

趾皮膚炎の例は、かぎ爪の趾皮膚炎(同義語は有毛踵イボ(hairy heel wart)、イチゴ腐蹄症(strawberry foot rot)、モルテラ口疾患(mortellaro disease)、イタリア腐蹄症(Italian foot rot)、乳頭腫性趾皮膚炎(papillomatous digital dermatitis))であり、ウシの跛行を引き起こす感染症である。

【0191】

バイオフィルム関連障害の例は、乳房裂皮膚炎(UCD)であり、これは慢性創傷に関連している。この実施例では、ジ-アルキルチオスルホネート、ジアルキルチオスルフィネート、及びジ-アルキルジスルフィドが、UCDに罹患したウシに対するこれらの効果について試験された。

【0192】

UCDは、乳房と腹壁の間、又は乳房の前部クォーター間の前接合部(anterior junction)に位置する皮膚病変である。この病変は、外観及び大きさが異なる場合があるが、肥厚した皮膚、痂皮、膿、及び容易に出血する創傷が一般的な所見である。乳房裂皮膚炎は、その解剖学的位置と、罹患したウシが疾患の一般的兆候をめったに示さないことから、検出が困難である可能性がある。UCD有病率に関する研究はほとんど発表されておらず、そのほとんどが、問題のある群れとして主に分類される、1群れ又は数群れのみを含んでいる。これらの研究における群内有病率は、0~22%の間で変化した。しかし、最近のオランダの研究では、20群れが含まれ、そのうち3群れがUCDではなく、一方で他の群れの群内有病率は、2.5~13%の間で変化した(Amersfortら、2012)。UCDの原因は不明であるが、乳房形態及び乳房浮腫(udder edema)等のいくつかの要因が役割を果たしていることが示唆されている。出産歴及びDIM(泌乳日数(days in milk))等のウシの因子も、UCDと関連している(Beattie及びTaylor、2000, J. Brit. Cattle Vet. Assoc. 8, 377~380頁)。

【0193】

病変は、後肢の趾間裂(interdigital cleft)の足底側(planter aspect)に最も一般的に確認される。トレポネーマ属種は、多数の活動性病変に日常的に存在している。病変は、触ると痛み、結果として臨床的跛行が生じる場合がある。この感染の性質は、一般にウシの群れの風土病性感染をもたらし、大きな経済的損失の原因となる。

【0194】

研究デザイン

水(対照)、試験化合物、又は参照化合物(クロロテトラサイクリン塩酸塩を含むCTC噴霧剤であり、Dechra veterinary products社から入手した)を含む様々な噴霧剤の効果を調べるために、実験を行った。

【0195】

1回の処置あたり噴霧剤0.35mLを、乳房裂に噴霧した。処置は、1日1回、t=0、t=3日、及びt=6日に行った。これらの実験の結果は、Table 7(表7)に示される。Table 6(表6)では、Table 7(表7)で使用される評価資格が説明される。

【0196】

10

20

30

40

50

【表 6】

Table 6. 乳房裂創傷の評価資格及び対応する説明。スコア1は最も酷い創傷を示し、スコア10はその創傷が完全に治癒したことを示す。

評価資格	説明
1	膿を伴う慢性で粘液性の創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、肉芽を伴う白色で敏感な創傷
2	膿を伴う慢性で粘液性の創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、白色で敏感
3	膿を伴う慢性で粘液性の創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、赤色で敏感
4	粘液性の創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、赤色で敏感
5	粘液性の創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、桃色で敏感
6	乾燥した創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、桃色で敏感
7	乾燥した創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、桃色で敏感、端からの創傷回復
8	乾燥した創傷、厚い創傷痂皮、明らかに炎症がある、桃色で敏感、端からの創傷回復、創傷が小さくなる
9	創傷はほとんど閉じている
10	創傷は完全に閉じている

10

20

【0197】

下記のTable 7(表7)に示されるように、ジ-n-プロピルジスルフィド、ジ-n-プロピルチオスルフィネート、ジ-n-ブチルチオスルフィネート、ジ-メチルチオスルホネート、ジ-n-プロピルチオスルホネート(PTSO)、及びS-ジ-フェニルチオスルホネートで処置した直後から、速い炎症の低減が観察された。その後、感染の強度が低下し、創傷が治癒した。

30

【0198】

対照的に、清潔な水を用いた対照処置では、感染の改善は観察されず、創傷は更に大きくなった。クロロテトラサイクリン塩酸塩をベースにしたCTC噴霧剤を使用した参照例は、創傷に対していかなる効果も示さなかった。

【0199】

要するに、この実施例は、特許請求の範囲にある化合物がバイオフィーム関連障害を治療することができることを明確に実証する。

40

【0200】

50

【表 7 A】

Table 7. 対照(例えば、水、Tween 80、又は参照組成物(CITC噴霧剤))又は試験化合物を塗布した後の、様々な適切な時点でのウシの創傷評価。
アスタリスク(*)は、様々な組成物を塗布した日を示す。噴霧剤中の有機磷化合物の百分率は、質量百分率に關する。

試験化合物	CAS 番号	噴霧剤中の 化合物%	ウシの数	0日	3日	6日	9日	12日	19日	28日	60日	結論
対照・水	9005-65-6	n.a.	1	2	2	2	2	2	2	2	2	効果なし*
対照・ Tween 80			2	7	7	7	7	7	7	7	7	効果なし
ジエチルプロピル ジスルフィド	629-19-6	5.0	3	9	9	9	9	9	9	9	9	正の効果
				2	2	3	3	4	5	5	5	
				2	3	3	3	4	5	5	6	
ジ-(n-ブチル) ジスルフィド	629-45-8	12.5	2	5	5	5	5	5	5	5	5	効果なし
				6	6	5	5	5	5	5	5	
ジイソプロピル ジスルフィド	4253-89-8	5.2	1	5	5	5	5	5	5	5	5	効果なし
ジフェニル ジスルフィド	882-33-7	12.5	2	7	7	6	6	6	6	6	6	効果なし
				7	7	7	7	7	6	6	6	
ジベンジル ジスルフィド	150-60-7	5	3	4	3	3	3	3	3	3	3	効果なし
				6	6	6	5	5	5	5	5	
ビス(4- メトキシフェニル) ジスルフィド	5335-87-5	3.2	2	6	6	5	5	5	5	5	6	効果なし
				5	5	5	4	4	4	4	4	

【 0 2 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 7 B】

ビス(4-フルオロフェニル)ジスルフィド	405-31-2	3.2	2	5	4	4	4	4	4	4	4	5	6	4	5	効果なし
				7	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	
ジ「p」トリルジスルフィド	103-19-5	3.2	2	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	効果なし
				4	4	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	
ジエチルチオスルフィネート	18542-39-7	20	1	8	8	7	7	7	7	7	7	6	6	7	7	効果なし
ジ「m」プロピルチオスルフィネート	1948-02-3	28.5	1	2	2	3	4	7	7	7	7	7	7	7	7	正の効果
ジ「n」ブチルチオスルフィネート	7559-55-9	20.4	1	3	3	3	4	4	6	6	6	6	6	7	7	正の効果
ジ「フェニル」チオスルフィネート	1208-20-4		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	効果なし
ビス(4-クロロフェニル)チオスルフィネート	6481-72-7	3.2	2	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	効果なし(わずかな負の効果)
				8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
ビス(4-フルオロフェニル)チオスルフィネート	61169-14-0	3.2	3	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	効果なし(わずかな負の効果)
				3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	
ジメチルチオスルホネート	2949-92-0	3.5	1	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	9	9	正の効果
				3	3	4	4	7	8	8	9	9	9	10	10	
ジ「n」プロピルチオスルホネート (PTSO)	1113-13-9	3.2	3	2	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	正の効果
				2	3	3	5	7	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
				2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	

【 0 2 0 2 】

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/10 A61P31/00 A61P31/02 A61P31/04 A61P33/00 A61P41/00 A01N25/00 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A01N A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 338 774 A1 (MIXSCIENCE [FR]) 27 June 2018 (2018-06-27) paragraph [0029]; examples 2-6 -----	1-20 21
X	US 2013/079402 A1 (BRAVO DAVID [CH] ET AL.) 28 March 2013 (2013-03-28) claims 6,8 -----	1,2,10, 15,17-19 3-9, 11-14, 16,20,21
A	WO 2012/076016 A1 (UNIV DANMARKS TEKNISKE [DK]; BJARNSHOLT THOMAS [DK] ET AL.) 14 June 2012 (2012-06-14) claims 1,5,6, 11-14 ----- -/-	1-21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 November 2022		Date of mailing of the international search report 06/12/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Trifilieff, Sylvie

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2022/050507

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/152038 A1 (RYNERSON JAMES M [US]) 8 September 2017 (2017-09-08) paragraphs [0006], [0031], [0045], [0046]; claims 1,8 -----	1-21
A	CN 106 614 167 B (UNIV SHANTOU) 15 May 2020 (2020-05-15) abstract -----	1-21
A	GB 2 589 856 A (CHRISTOPHER ROBIN THORPE [GB]) 16 June 2021 (2021-06-16) claims 1,7 -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2022/050507

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3338774 A1	27-06-2018	BR 112019012275 A2 CL 2019001747 A1 EP 3338774 A1 EP 3558294 A1 ES 2923106 T3 WO 2018115532 A1	05-11-2019 25-10-2019 27-06-2018 30-10-2019 23-09-2022 28-06-2018
US 2013079402 A1	28-03-2013	BR 112012024996 A2 CA 2795290 A1 CN 103037856 A EP 2552432 A2 FR 2958118 A1 KR 20130040858 A MX 356488 B RU 2012143827 A US 2013079402 A1 WO 2011120182 A2	24-09-2019 06-10-2011 10-04-2013 06-02-2013 07-10-2011 24-04-2013 30-05-2018 10-05-2014 28-03-2013 06-10-2011
WO 2012076016 A1	14-06-2012	AU 2011341155 A1 AU 2016203651 A1 CA 2820393 A1 CN 103328441 A EP 2649047 A1 EP 3020397 A2 ES 2571998 T3 HK 1223013 A1 JP 6088433 B2 JP 6253749 B2 JP 2014508719 A JP 2017061525 A US 2014303070 A1 US 2018360773 A1 WO 2012076016 A1	27-06-2013 16-06-2016 14-06-2012 25-09-2013 16-10-2013 18-05-2016 27-05-2016 21-07-2017 01-03-2017 27-12-2017 10-04-2014 30-03-2017 09-10-2014 20-12-2018 14-06-2012
WO 2017152038 A1	08-09-2017	NONE	
CN 106614167 B	15-05-2020	NONE	
GB 2589856 A	16-06-2021	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード (参考)

A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 0 1 P	3/00	(2006.01)	A 0 1 P	3/00
A 0 1 N	41/12	(2006.01)	A 0 1 N	41/12
A 0 1 P	1/00	(2006.01)	A 0 1 P	1/00
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 2 3 L	33/10

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- オランダ・ 8 0 4 2 ・ ペーサー ・ ズヴォレ ・ スコケルウェッヒ ・ 1 0 内
- (72)発明者 アンネ・クリスティナ・ウロンシュカ
- オランダ・ 8 0 4 2 ・ ペーサー ・ ズヴォレ ・ スコケルウェッヒ ・ 1 0 内
- (72)発明者 アンネ・ミルテ・シュッテファール
- オランダ・ 8 0 4 2 ・ ペーサー ・ ズヴォレ ・ スコケルウェッヒ ・ 1 0 内
- (72)発明者 シャイスタ・シェロゼ・コカル
- オランダ・ 8 0 4 2 ・ ペーサー ・ ズヴォレ ・ スコケルウェッヒ ・ 1 0 内

F ターム (参考) 4B018 LE01 LE02 LE03 LE04 LE05 MD01 ME09
4C084 AA19 NA05 ZA89 ZB112 ZB35
4C206 AA01 AA02 JA19 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA89 ZB35
4H011 AA01 AA03 BB03 DA13