(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-508538
(P2018-508538A)
(43)公表日　平成30年3月29日(2018.3.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 31/74	***(2006.01)***	A61K	31/74		4B065
A61K 31/78	***(2006.01)***	A61K	31/78		4C081
A61P 31/04	***(2006.01)***	A61P	31/04		4C086
A61L 29/04	***(2006.01)***	A61L	29/04	100	
A61L 31/04	***(2006.01)***	A61L	31/04	110	

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2017-546888 (P2017-546888)
(86)(22)出願日　平成28年3月2日 (2016.3.2)
(85)翻訳文提出日　平成29年11月6日 (2017.11.6)
(86)国際出願番号　PCT/AU2016/050134
(87)国際公開番号　WO2016/138558
(87)国際公開日　平成28年9月9日 (2016.9.9)
(31)優先権主張番号　2015900721
(32)優先日　平成27年3月2日 (2015.3.2)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　511307096
コモンウェルス　サイエンティフィック　アンド　インダストリアル　リサーチ　オーガニゼーション
オーストラリア国　アクトン　エーシーティー　２６０１，　クルーニーズ　ロス　ストリート
(71)出願人　516385893
モナシュ　ユニヴァーシティ
オーストラリア国　３８００　クレイトン、ウェリントン　ロード
(74)代理人　100094569
弁理士　田中　伸一郎
(74)代理人　100088694
弁理士　弟子丸　健

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バイオフィルムに有害な影響を与える方法

(57)【要約】
本発明はバイオフィルムに有害な影響を与える方法に関し、前記方法は、ポリマー骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物にバイオフィルムを暴露する工程を含む。前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

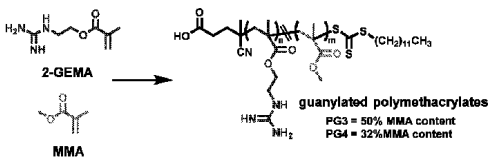


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
バイオフィルムに有害な影響を与える方法であって、骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物にバイオフィルムを暴露する工程を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記方法。
【請求項２】
ポリマーがさらに、その骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基を含み、前記第二の重合モノマー残基が、当該骨格構造からペンダントを提示する共有結合疎水性部分を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
陽イオン官能基又はその前駆官能基が窒素又はリン原子を含む、請求項1から2のいずれか1項に記載の方法。
【請求項４】
陽イオン官能基又はその前駆官能基が、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アミン、及び第四級ホスフィンから選択される、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】
陽イオン官能基又はその前駆官能基がグアニジノ及びアミジノから選択される、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６】
共有結合疎水性部分がアルキル又はアリール部分から選択される、請求項2に記載の方法。
【請求項７】
バイオフィルムが、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、スタフィロコッカス・エピデルミジス（Staphylococcus epidermidis）、コアグラーゼ陰性スタフィロコッカス、ストレプトコッカス属種（Streptococcus sp.）、結核菌（mycobacterium tuberculosis）、クレブシエラ・ニューモニアエ（Klebsiella pneumoniae）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa））、カンジダ属種（Candida sp.）及びカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）から選択される、1つ以上の微生物を含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項８】
バイオフィルムが多重微生物性バイオフィルムである、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
【請求項９】
ポリマーがグアニル化ポリメタクリレートである、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０】
ポリマーが、2-グアニジノエチルメタクリレート（2-GEMA）及びメチルメタクリレート（MMA）のランダム共重合体である、請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１１】
バイオフィルムが、カンジダ・アルビカンス及び黄色ブドウ球菌から選択される微生物の一方又は両方を含む、請求項1から10のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１２】
バイオフィルムが当該組成物に暴露された結果として、当該バイオフィルムの部分を形成する微生物が殺滅される、請求項1から11のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１３】
対象動物上に又は対象動物内に存在するバイオフィルムに有害な影響を与える方法であって、当該対象動物に当該組成物を投与することによって有効量のポリマーを含む組成物

にバイオフィルムを暴露する工程を含み、当該ポリマーが、その骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆基を含む、前記方法。

【請求項１４】

バイオフィルムがその表面又は内部に存在する対象動物への投与に適切な組成物であって、前記組成物が薬理学的に許容できる担体及び有効量のポリマーを含み、前記ポリマーがその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記組成物。

【請求項１５】

対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在に随伴する、前記存在を特徴とする、又は前記存在によって引き起こされる感染性疾患、症状又は異常の治療で用いられる場合に当該対象動物への投与に適切な組成物であって、前記組成物が薬理学的に許容できる担体及びポリマーを含み、前記ポリマーがその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記組成物。

【請求項１６】

対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在に随伴する、前記存在を特徴とする、又は前記存在によって引き起こされる感染性疾患、症状又は異常を治療する医薬の製造におけるポリマーの使用であって、前記ポリマーがその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記使用。

【請求項１７】

バイオフィルムが付着した医療器具で抗菌薬ロック療法を実施する方法であって、前記方法が、ポリマー骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物に当該バイオフィルムを暴露する工程を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記方法。

【請求項１８】

抗菌薬ロック療法で使用される抗菌薬ロック溶液であって、前記組成物が薬理学的に許容できる担体及びポリマーを含み、前記ポリマーがその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基が共有結合部分を含み、前記共有結合部分が、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む、前記溶液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は一般的にバイオフィルムに関する。特に、本発明はバイオフィルムに有害な影響を与える方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

バイオフィルムは微生物の定着凝集物又は共同体であり、前記微生物は、生物若しくは非生物表面又は境界面で互に接着し、当該微生物が分泌する細胞外重合物質（EPS）のマトリックス（当業界では時に“ぬめり”と称される）と一緒にフィルム構造を形成している。

バイオフィルムが関与する人間の感染は、重篤で生命を脅かす疾患と高い相関性がある。これは、通常の抗微生物剤に対するバイオフィルムの抵抗性、さらにまた免疫系におけ

るこれら感染の除去の効率低下による。

バイオフィルム形成に関係するありふれた微生物には、グラム陽性細菌（例えば黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、コアグラーゼ陰性スタフィロコッカス（Staphylococcus）及びストレプトコッカス属種（Streptococcus sp.））、グラム陰性細菌（例えばクレブシエラ・ニューモニアエ（Klebsiella pneumoniae）及び緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa））、及び真菌類病原体（例えばカンジダ属種（Candida sp.））が含まれる。

バイオフィルム関連感染は浮遊性微生物によって引き起こされる感染に数で優る。とりわけ真菌のカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）並びに細菌の黄色ブドウ球菌及びスタフィロコッカス・エピデルミジス（Staphylococcus epidermidis）が、最もありふれた医療器具関連感染の原因である。

アメリカ疾病予防管理センター/国立医療安全ネットワーク（National Healthcare Safety Network（NHSN））レポートによれば、黄色ブドウ球菌及びカンジダ・アルビカンスは、医療起因感染（HAI）（例えばカテーテル関連血流感染）を引き起こすもっとも蔓延している細菌及び真菌病原体である。

カンジダ種及び黄色ブドウ球菌によって引き起こされる血流感染はしばしば高い全死亡率を伴う。免疫低下患者に提供される医療器具の表面にこれらのタイプの微生物で形成されるバイオフィルムの存在は、当該患者の死亡率に高いリスク係数を与え得る。

臨床局面では、バイオフィルム関連感染は単一微生物性又は多重微生物性であり、対象動物の複数の部位で生じ得る。カンジダ血症のほぼ20%－40%の症例が報告によれば細菌血症を伴い、スタフィロコッカス種が優先的な随伴病原体であり、この傾向は増加している。

【０００３】

多重微生物性バイオフィルムでは、微生物種は互に利益を得ることができる。有利な相互作用は、黄色ブドウ球菌とC.アルビカンスとの間で観察され、例えば単一種のバイオフィルムと比較して多重微生物性増殖様式のより高い微生物量及び抗微生物剤耐性の増強である。例えば、C.アルビカンスとともに多重微生物性バイオフィルムで増殖するとき、黄色ブドウ球菌は、単一培養よりもバンコマイシン及びダプトマイシンにより耐性となる。

別の細菌種、スタフィロコッカス・エピデルミジスは、多重微生物性バイオフィルムでともに増殖するとき、抗真菌薬フルコナゾール及びアンホテリシンBの作用からC.アルビカンスを保護することが示された。多重微生物性バイオフィルムでの薬剤耐性強化は、真菌及び細菌によって分泌されるEPSの成分に起因する。バイオフィルムの薬剤耐性の主要な容疑者は、抗微生物性化合物を隔離する細胞外マトリックスの炭水化物、例えば1,3-グルカンである。

他の細胞外成分もまた抗微生物剤耐性に関係している。C.アルビカンスによって分泌される細胞表面ムチンMsb2のフラグメントは、直接結合することにより多重微生物性バイオフィルムで黄色ブドウ球菌のダプトマイシン耐性に寄与する。種間相互応答メカニズムもまた治療耐性の増強に寄与している可能性がある。例えばクオラムセンシング経路及び細菌細胞壁成分は、C.アルビカンスの形態発生及びバイオフィルム形成に影響を与える。

単一微生物感染と比較して、C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性バイオフィルムとしての増殖は、前炎症性サイトカインの上昇及び好中球（感染を制御できない）の流入を伴う、先天的な免疫応答の変化をもたらすことが見出されている。

バイオフィルムに付随する人間の健康及び関連コストの甚だしい負の関係により、効果的及び効率的にバイオフィルムを処理することができる抗微生物剤の開発で喫緊の社会経済的要請が存在する。

【発明の概要】

【０００４】

本発明はしたがって、バイオフィルムに有害な影響を与える方法を提供し、前記方法は、ポリマー骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物にバイオフィルムを暴露する工程を含む。前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示

し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆陽イオン官能基を含む。
驚くべきことに、本発明にしたがって用いられるポリマーは、有利には強力な抗微生物剤として機能しバイオフィルムに有害な影響を発揮することが見出された。例えば、前記ポリマーへのバイオフィルムの暴露は、バイオフィルムに包埋された及び/又はバイオフィルムの部分を形成する微生物を殺滅することが見出された。本発明にしたがって用いられるポリマーは、バイオフィルムの治療について、特にin vitro及びin vivo設定で通常的な抗真菌薬及び抗菌剤の有効性よりも性能が優れていることが見出された。さらにまた、本発明のポリマーの使用は有利には、多重微生物性バイオフィルム、例えばカンジダ・アルビカンス及び黄色ブドウ球菌を含む多重微生物性バイオフィルムに包埋された及び/又は前記多重微生物性バイオフィルムの部分を形成する微生物の殺滅に高度に有効であることが見出された。
便宜的に、本発明にしたがって用いられるポリマーは、本明細書では抗微生物剤又は抗バイオフィルム剤と称することがある。
【０００５】
ある実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーは、ポリマーの骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基を含み、前記第二の重合モノマー残基は当該骨格構造からペンダントを提示する共有結合疎水性部分を含む。
本発明にしたがって用いられるポリマーが第一及び第二の両重合残基を含む場合、本発明はしたがって、定着バイオフィルムに有害な影響を与える方法に関して記載することができ、前記方法は、骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一及び第二の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物とバイオフィルムを接触させる工程を含む。前記第一の重合モノマー残基は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆陽イオン官能基を含む、共有結合部分を含み、前記第二の重合モノマー残基は、当該骨格構造からペンダントを提示する共有結合疎水性部分を含む。
ある実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーは共重合体である。当該共重合体は、ランダム共重合体、交互共重合体、ブロック共重合体、又は統計共重合体であり得る。
本発明にしたがって有害な影響を受けるバイオフィルムは単一微生物性又は多重微生物性バイオフィルムであり得る。本発明の方法は、驚くべきことに多重微生物性バイオフィルムに有害な影響を与えることに有効であることが見出された。
ある実施態様では、バイオフィルムは多重微生物性バイオフィルムである。
別の実施態様では、バイオフィルムは、グラム陽性細菌及び真菌病原体を含む多重微生物性バイオフィルムである。
さらに別の実施態様では、（本発明にしたがって用いられる）ポリマーが当該バイオフィルムが暴露される唯一の抗微生物剤である。換言すれば、ある実施態様では、バイオフィルムは、（本発明にしたがって用いられる）当該ポリマー以外の他の抗微生物に暴露されない。
【０００６】
したがって、ある実施態様では、組成物は、（本発明にしたがって用いられる）当該ポリマー以外の他の抗微生物剤を含まない。
本発明にしたがって有害な影響を受けるバイオフィルムは、グラム陽性細菌（例えば黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・エピデルミジス、コアグラーゼ陰性スタフィロコッカス、ストレプトコッカス属種及び結核菌（mycobacterium tuberculosis）、グラム陰性菌（例えばクレブシエラ・ニューモニアエ及び緑膿菌）、及び真菌類病原体（例えばカンジダ属種及びカンジダ・アルビカンス）から選択される1つ以上の微生物を含むか、又は本質的に前記から成ることができる。
ある実施態様では、本発明にしたがって有害な影響を受けるバイオフィルムは、カンジダ・アルビカンス及び黄色ブドウ球菌から選択される一方又は両方の微生物を含むか、又は本質的に前記から成る。
本発明の方法は、特に対象動物上又は対象動物内に存在するバイオフィルムに有害な影

響を与えるために有効であり得る。そのような事例では、本発明はさらに対象動物上又は対象動物内に存在するバイオフィルムに有害な影響を与える方法を提供し、前記方法は、当該対象動物に当該組成物を投与することによって、有効量のポリマーを含む組成物にバイオフィルムを暴露する工程を含み、ここで、当該ポリマーは、その骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆基を含む。

本発明はまた、バイオフィルムがその表面又は内部に存在する対象動物への投与に適切な組成物を提供し、前記組成物は薬理学的に許容できる担体及び有効量のポリマーを含み、前記ポリマーはその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

【０００７】

本発明の組成物は典型的には、対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在に随伴する、前記を特徴とする、又は前記によって引き起こされる感染性疾患、症状又は異常を有する当該対象動物に投与されるであろう。

したがって、本発明はまた、対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在に随伴する、前記存在を特徴とする、又は前記存在によって引き起こされる感染性疾患、症状又は異常の治療に用いられるときに、当該対象動物への投与に適切な組成物を提供し、前記組成物は薬理学的に許容できる担体及びポリマーを含み、前記ポリマーはその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明はさらに、バイオフィルムに有害な影響を与える医薬の製造におけるポリマーの使用を提供し、前記ポリマーはその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明はまた、対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在に随伴する、前記存在を特徴とする、又は前記存在によって引き起こされる感染性疾患、症状又は異常を治療する医薬の製造におけるポリマーの使用を提供し、前記ポリマーはその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

ある実施態様では、製造される医薬はポリマー及び薬理学的に許容できる担体を含む。

【０００８】

別の実施態様では、当該ポリマーは、対象動物上に又は対象動物内に存在するバイオフィルムの部分を形成する微生物を殺滅する医薬の製造で用いられる。

本発明のポリマーを含む組成物は、有利には効果的で効率的なロック溶液として機能することが見出された。

したがって、本発明はさらに、バイオフィルムが付着した医療器具で抗微生物ロック療法を実施する方法を提供し、前記方法は、骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物に当該バイオフィルムを暴露する工程を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明はさらに抗微生物ロック療法で使用される抗微生物ロック溶液を提供し、前記組成物は薬理学的に許容できる担体及びポリマーを含み、前記ポリマーはその骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含み、前記第一の重合モノマー残基は共有

結合部分を含み、前記共有結合部分は、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ｉｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明の更なる特徴及び実施態様は下記でより詳細に記載される。

本発明の実施態様は以下の非限定的な図面を参照して本明細書に記載される。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】グアニル化ポリメタクリレートPG3及びPG4の形態にある、本発明の使用に適切なポリマーの構造を示す。当該ポリマーは、モノマーの2-グアニジノエチルメタクリレート（2-GEMA）及びメチルメタクリレート（MMA）から合成された。

【図２】真菌由来細胞外マトリックスは黄色ブドウ球菌の多重微生物性バイオフィルムへの連携を促進することを示す。（A）黄色ブドウ球菌-C.アルビカンス混合バイオフィルムの走査電子顕微鏡検査（SEM）。スケールバー＝５μｍ。単一培養バイオフィルムのSEMは図6Aを参照されたい。（B）C.アルビカンスバイオフィルム由来細胞外マトリックスの存在下又は非存在下で増殖した黄色ブドウ球菌の単一培養バイオフィルム。（C）C.アルビカンスDAY185野生型株又はbgl2ΔΔ変異株によって形成された多重微生物性バイオフィルム中の黄色ブドウ球菌CFUを、実施例のセクションに記載したように生存数定量を用いて決定した。細菌細胞数はバイオフィルム中のC.アルビカンス数に対して相対的に表現した。エラーバーは、3組で実施した3回の独立した生物学的繰返しに基づく標準偏差を示す。

【図３】本発明のポリマーは、C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌の多重微生物性バイオフィルムの殺滅に有効であることを示す。種々の抗微生物剤で処理した黄色ブドウ球菌並びにC.アルビカンスの単一微生物性及び多重微生物性バイオフィルムのCLSM再構成。CLSM再構成は、生細胞（SYTO-9、緑色）及び死細胞（PI、赤色）の3D染色パターンを示す。24時間かけて定着した黄色ブドウ球菌及び/又はC.アルビカンスによって形成されたバイオフィルムをRPMI-1640で調製した抗微生物剤に18時間暴露し、続いてBacLight生細胞/死細胞生存性キット（3.35μM SYTO-9及び20μMヨウ化プロピジウム）で染色した。実験を2回実施し、代表的な画像を示す。

【図４】本発明のポリマーは、真菌-細菌混合バイオフィルムの根絶において従来の抗微生物剤の組合せよりも性能が優れていることを示す。抗微生物剤暴露時の黄色ブドウ球菌-C.アルビカンス多重微生物性バイオフィルム中の細胞の生存。Log%生存は、統計分析のための生存細胞パーセンテージの対数フォーマットである。例えば、-2のlog%生存は、抗微生物剤処理後に残存する最初の集団の約1%（10^{-2}）を意味する。log%生存が低ければ低いほど、抗微生物剤の定着バイオフィルム殺滅有効性は良好である。実験を2組ずつ3回の生物学的繰返しで実施し、平均及び標準偏差が示される。

【図５】本発明のポリマーに対するC.アルビカンスのバイオフィルムの感受性における細胞外マトリックスの役割を示す。C.アルビカンスDAY185野生型又はbgl2ΔΔ変異体によって形成された単一微生物性バイオフィルムに対するグアニル化ポリメタクリレートの有効性を、PG3、PG4又はフルコナゾール（コントロール）の存在下若しくは非存在下で一晩定着のバイオフィルムを処理することによって試験した。薬剤に暴露した定着バイオフィルムのCFUを無薬剤増殖培地に暴露したバイオフィルムのCFUで割ることによって、定着バイオフィルムにおける残留パーセンテージを計算した。実験を3組ずつ3回の生物学的繰返しで実施し、平均及び標準偏差が示される。

【図６】多重微生物性バイオフィルム形成の評価を示す。（A）C.アルビカンス及び黄色ブドウ球菌のどちらかの単一微生物性バイオフィルムの走査電子顕微鏡検査。スケールバー＝５μｍ。（B）半定量性CVアッセイは、黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスはRPMI-1640で相乗的に単一微生物性及び多重微生物性バイオフィルムを形成することを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

【図７】野生型及びbgl2変異体の定着バイオフィルムにおける遺伝子発現を示す。RT-PCRは、ALS3、ALS1、HWP1、EAP1及びBCR1（C.アルビカンスの表面結合アドヘシン及びバイオフィルム形成の転写調節因子をコードする）の発現レベルでWTとbgl2変異体の間で相違がないことを示した。

【発明を実施するための形態】
【００１０】
定義
本発明の理解を容易にするために、多数の述語及び表現を下記に定義する。他の述語及び表現もまた当文書で後に定義する。
冠詞“ａ”及び“ａｎ”は、本明細書では当該冠詞の文法的目的語の1つ又は2つ以上（すなわち少なくとも1つ）を指すために用いられる。例えば、“ａ ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ（微生物）”と言えば、1つの微生物又は2つ以上の微生物を意味することが意図される。
本明細書で用いられる“約”という用語は、当業者が、同じ機能的結果を達成するという観点で当該列挙された値と等価と考え得るある範囲の数字を言うと理解される。
本明細書及び下記の特許請求の範囲を通して、文脈が特段に指示しない限り、“ｃｏｍｐｒｉｓｅ（含む）”という語及び変型（例えば、“ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ”及び“ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ”）は、記載されている整数若しくは工程又は整数若しくは工程群を包含するが、ただし他の任意の整数若しくは工程又は整数若しくは工程群を排除しない含意と理解されるであろう。
本明細書で用いられるように、“バイオフィルム”という用語は、微生物の定着凝集物又は共同体を指し、前記微生物は、生物若しくは非生物表面又は境界面で互に接着し、当該微生物が分泌する細胞外重合物質（ＥＰＳ）（当業界では時に“ぬめり”と称される）のマトリックスと一緒にフィルム様構造を形成する。一切の誤解を避けるために、“バイオフィルム”という用語は、単なる微生物集合体又は浮遊生物状態の微生物を指すことは意図されない。当業者は、公知の技術を用いて定着バイオフィルムの存在を容易に検出できる。
【００１１】
本明細書で具体的な微生物を“含む”バイオフィルムと言うとき、当該バイオフィルムはそのような微生物を含み得るか、本質的にそのような微生物から成り得るか（すなわち問題の微生物が当該バイオフィルムの微生物の優先的な種又は型である）、又はそのような微生物から成り得る（すなわち問題の微生物が当該バイオフィルムの微生物の唯一の種又は型である）ことを意味することが意図される。
本明細書で“微生物”という用語又は関連用語、例えば“微生物性”及び“微生物性生物”という用語は、古細菌又は真核生物のドメイン内に含まれる、顕微鏡的生物として存在する任意の生物を意味することが意図される。したがって、前記用語は、原核細胞若しくは真核細胞又は顕微鏡的サイズを有する生物を包含することが意図され、細菌、古細菌及び全ての種の真正細菌とともに真核微生物、例えば酵母及び真菌を含む。
したがって、“バイオフィルム形成微生物”という表現は、バイオフィルム（単一微生物性及び多重微生物性バイオフィルムを含む）を形成することができる任意の微生物を指す。
バイオフィルムに“有害な影響を与える”又は“有害な影響を受ける”バイオフィルムという表現によって、当該バイオフィルムの生存性が何らかの方法で損なわれることを意味することが意図される。例えば、あるバイオフィルムの部分を形成する生存微生物数が減少したら、当該バイオフィルムは有害な影響を受けている。その増殖が阻害され、抑制され、遅延し又は予防されるとしたら、バイオフィルムはまた有害な影響を受けていよう。
本発明のある実施態様にしたがえば、バイオフィルムに“有害な影響を与える”という表現は、当該バイオフィルムの部分を形成する微生物の殺滅を意味することが意図される。
【００１２】
バイオフィルムの“部分を形成する”微生物は、当該バイオフィルムの表面に存在するか又はその中に包埋され得る。
本明細書で用いられるように、“抗微生物剤”という表現は、単独で又は他の薬剤と併用されて、1つ以上の微生物種を殺滅するか又は増殖を阻害することができる任意の薬剤を意味することが意図される。

本発明にしたがって用いられるポリマーの組成物にバイオフィルムを“暴露する”と言うとき、当該バイオフィルムを当該組成物又はポリマーと接触させることを意味することが意図される。バイオフィルムと組成物又はポリマーとの接触は任意の適切な手段によって達成でき、組成物又はポリマーのバイオフィルムへの適用、及び当該バイオフィルムを含む対象動物への組成物又はポリマーの投与を含む。この関係では、“暴露”、“投与”及び“接触”という用語並びに前記の文法的変型は当明細書を通して互換的に用いることができる。

本明細書で用いられるように、“有効量”という表現は、所望の結果（本発明の事例では、バイオフィルムに有害な影響を与えること）を達成するために十分なある物質（例えば本発明にしたがって用いられるポリマーを含む組成物）の量を指す。所望の結果を達成するために必要な正確な量は、多様な要件にしたがって変動するであろう。前記要件は例えば、対象動物又は考慮される状況、バイオフィルムの組成、組成物に暴露されるバイオフィルムの体積又はサイズ、バイオフィルムが存在する環境、及びバイオフィルムの組成物への暴露に役立つ手段である。有効量は1回以上の適用、投与又は投薬で提供でき、特定の処方物、投与ルート又は適用方法に限定されることは意図されない。したがって、正確な“有効量”を指定することは実際的ではない。具体的な事情を考慮しながら、日常的な実験により当業者は容易に“有効量”を決定できよう。

【００１３】

本明細書で“対象動物”と言えば、ヒト、霊長動物（例えばサル）、家畜動物（例えばヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ及びヤギ）、実験動物（例えばマウス、ウサギ、ラット及びモルモット）、コンパニオン動物（例えばイヌ及びネコ）、拘束野生動物（例えばライオン、トラ、シマウマ、カンガルー、及びシカ）を包含することは理解されるべきである。本発明の関係では、“対象動物”という用語は一般的にヒト及び非ヒト動物を指し、前記ヒト及び非ヒト動物は、バイオフィルムによって引き起こされる症状に対してこれから治療を受けるか又は既に治療を受けている。

“治療”（treatmen, treat, treating）という用語は、対象動物が具体的な症状から完全に回復するまで治療されることを必ずしも暗示しないことは理解されるべきである。したがって、治療は、目下の症状の重篤度の軽減、具体的な症状の徴候の緩和、又は具体的な症状の進行の予防そうでなければそのリスクの低下を含む。

本明細書で用いられるように、“投与”という用語は、薬品、プロドラッグ若しくは他の薬剤又は施療的処置（例えば本発明にしたがって用いられる組成物又はポリマー）を生理学的な系（例えば対象動物又はin vivo、in vitro若しくはex vivoにおける細胞、組織及び器官）に与える作業を指す。投与ルートには、呼吸器、気管内、鼻咽頭、静脈内、腹腔内、皮下、頭蓋内、皮内、筋肉内、眼内、髄腔内、大脳内、鼻内、輸液、経口、直腸、静脈内点滴パッチ及び移植ルートが含まれるが、ただしこれらに限定されない。本発明にしたがって用いられる組成物又はポリマーはまたバイオフィルムに直接投与又は適用される。

【００１４】

本明細書で用いられる“医薬的に許容できる”又は“薬理学的に許容できる”という表現は、対象動物に投与されたときに有害な作用、例えば毒性、アレルギー性又は類似の反応を実質的に生じない組成物を指す。

“医薬的に許容できる”又は“薬理学的に許容できる”担体又は組成物という表現は、対象動物への投与に本来適切な物質あることが意図される。換言すれば、担体それ自体、本発明にしたがって用いられるポリマー、担体を含む本発明の組成物、及び当該組成物の任意の他の構成成分の対象動物への投与が、許容できない毒性（アレルギー応答及び病的状態を含む）もたらさない。担体は液体、ゲル又は固体基剤であり得る。

単なる参考として、当業者は、“医薬的に許容できる”又は“薬理学的に許容できる”ということを、連邦政府又は州政府の規制庁によって承認されたもの、又はUS局方に列挙されたもの、又は動物（特に人間）での使用に一般的に認識された他の薬物類と考えることができる。

そうは言っても、対象動物に投与される組成物の適切性、及び与えられた物質が薬理学的に適切であるか否かは、選択される投与様式にある程度左右されることは当業者には理解されるであろう。したがって、与えられた組成物が対象動物への投与に適切であるか否か、又は薬理学的に許容できるか否かを評価するときには、投与様式を考慮する必要があり得る。

【００１５】

薬理学的に許容できる液体担体の例には、リン酸緩衝食塩水溶液、水、乳剤（例えば油中水又は水中油乳剤）、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール及び流動ポリエチレングリコールなど）、植物油、及び前記の組合わせが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

薬理学的に許容できる固体担体の例には金属、セラミック、プラスチック、布地、及び前記の組合わせが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

使用できる他の適切な医薬的に許容できる物質には安定化剤及びアジュバントが含まれる。

本明細書で用いられる“医療器具”には、対象動物の体表で、体内で又は体を貫通して用いられる任意の素材又は器具が含まれる。そのような使用は例えば、特定の疾患、症状又は損傷のために対象動物の医療処置の過程で生じ得る。医療器具には、例えばインプラント、創傷治療器具及び薬剤デリバリー器具のような物品が含まれるが、ただしこれらに限定されない。医療用インプラントの例には、尿道カテーテル、血管カテーテル、透析用シャント、創傷排液チューブ、皮膚縫合糸、人工血管、埋め込み可能な手段、眼内装置、心臓弁などが含まれる。創傷治療器具の例には、創傷包帯、生物学的移植素材、テープ縫合包帯（tape closures and dressings）、及び手術用被布が含まれるが、ただしこれらに限定されない。薬剤デリバリー器具の例には針、薬剤デリバリー皮膚絆創膏、薬剤デリバリー粘膜絆創膏及び医療用スポンジが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本発明の組成物は医療器具であるか、又は医療器具の部分であり得る。

〔発明を実施するための形態〕

【００１６】

本発明の方法は、バイオフィルムを本明細書に記載の組成物に暴露する工程を含む。バイオフィルムは当該組成物に暴露されたとき有害な影響を受ける。バイオフィルムは、その増殖が予防又は阻害されることによって、又はバイオフィルムの部分を形成する生存性微生物の数の減少によって有害な影響を示すことができる。

換言すれば、本発明にしたがって用いられる組成物はバイオフィルムに対して細胞増殖抑制性又は細胞傷害性である。

組成物がバイオフィルムに対して細胞増殖抑制性であるとは、バイオフィルムを形成する微生物が増殖若しくは複製を妨げられるか又は阻害されることを意味する。

組成物がバイオフィルムに対して細胞傷害性であるとは、バイオフィルムの部分を形成する生存性微生物の数が減少することを意味する（例えば、バイオフィルムの部分を形成する微生物が殺滅される）。

ある実施態様では、したがって、本発明はバイオフィルムの部分を形成する微生物を殺滅する方法を提供し、前記方法は本明細書に概略する特色を含む。

本発明にしたがって用いられる組成物はポリマーそれ自体であるか、或いはポリマーは適切な担体と組み合わせて提供され得る。担体は薬理学的に許容できる担体であり得る。担体は、液体、ゲル又は固体基剤であり得る。担体が液体又はゲルの形態であるとき、ポリマーは典型的には当該液体若しくはゲルに溶解又は分散されるであろう。担体が固体基剤の形態であるとき、ポリマーは当該基剤内に吸収されるか、及び/又は当該基剤上にコーティングを形成する。固体基剤は多孔性であり得る（すなわち空隙又は穴を含む）。

【００１７】

本発明にしたがって用いられる組成物は、骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む。

“エチレン性不飽和モノマーの重合残基”という表現は、ポリマー鎖を提供するエチレ

ン性不飽和モノマーの遊離ラジカルの重合の結果として形成される反応残基を意味することが意図される。遊離ラジカル重合に能動的に参加するのは、当該モノマーのエチレン性不飽和基である。そのようなモノマー反応は、そうして形成されるポリマー鎖の骨格構造内に炭素-炭素セグメントすなわち残基（-C-C-）を提供するであろうということは当業者には理解されるであろう。本発明にしたがって用いられるポリマーはしたがって付加ポリマーと言うことができる（すなわち縮合ポリマーではない）。

本発明にしたがって用いられるポリマーは共有結合部分を含む第一の重合モノマー残基を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。当該部分はしたがって共有結合し、ペンダント形成では-C-C-セグメントと共有結合するであろう。陽イオン官能基又はその前駆官能基は典型的には、骨格構造から除外される少なくとも1つの原子であろう（すなわち当該ポリマー鎖の炭素基本骨格構造とペンダント陽イオン官能基又はその前駆官能基との間には少なくとも1つの原子が存在するであろう）。したがって、共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）当該骨格構造から除外される少なくとも1つの原子（或いは少なくとも2つ又は3つの原子）である陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明にしたがって用いられるポリマーは、簡略に図解すれば下記構造Aを含むことができる。式中、

【００１８】

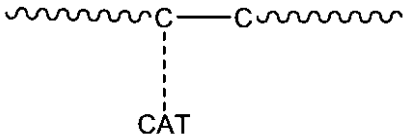
【化１】

【００１９】

はポリマー骨格の残余を表し、C-Cはエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基に由来する炭素-炭素セグメントを表し、さらに“-----”は、ペンダントの形成において原子と当該部分（CAT）の炭素-炭素（C-C）セグメントとの共有結合を表す。当該部分（CAT）は典型的には当該骨格構造から除外される少なくとも1つの原子であろう。ポリマーは、一般的には複数の第一の重合モノマー残基をその骨格構造とともに含むであろう。

【００２０】

【化２】



(A)

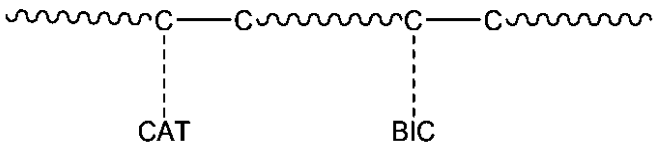
【００２１】

エチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基に加えて、本発明のポリマーは、エチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基を含むことができる。前記第二の重合モノマー残基は、ポリマーの骨格構造からペンダントを提示する共有結合疎水性部分を含む。典型的には、疎水性部分もまた骨格構造から除外される少なくとも1つの原子であろう。

本発明にしたがって用いられるポリマーが、エチレン性不飽和モノマーの第一及び第二の重合残基の両方を含む場合、ポリマーは下記構造（B）によって簡略化して示すことができ、上記に概略した構造（A）に加えて、構造（B）はさらに、エチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基に由来する炭素-炭素セグメント（C-C）を含み、ペンダントの形成で前記残基と疎水性部分（BIC）が共有結合する。ポリマー（B）は、一般的に複数の第一及び第二の両重合モノマー残基をその骨格構造内に含み、したがって共重合体、例えばランダム共重合体であろう。

【００２２】

【化３】



(B)

【００２３】

本発明にしたがって用いられるポリマーはしたがって、ポリマーの骨格構造からペンダント、（ｉ）陽イオン官能基又はその前駆官能基含む共有結合部分（CAT）及び場合によって（ｉｉ）共有結合疎水性部分（BIC）を提示する。

陽イオン官能基は陽性荷電を保有することは当業者には理解されるであろう。当業者はまた陽イオンとして存在し得る官能基の範囲を理解しているであろう。例えば、陽イオン官能基は一般的には窒素及び/又はリン原子を含むであろう。

陽イオン官能基の形態にあるとき、当該官能基は陽性荷電を保有する。“その前駆官能基”はしたがって、典型的には中性状態で存在し、例えば求電子剤の付加又は除去により陽イオンに変換され得る官能基である。“前駆官能基”はしたがって典型的には中性であるが、電荷を付加することができ、例えばpH依存性プロトン付加（例えば生理学的pHで）又は四級化を介して陽イオンを形成して対応する陽イオン官能基を得ることができる。

ある実施態様では、陽イオン官能基又はその前駆官能基は、アミン、ホスフィン及びオニウム（例えばアンモニウム及びホスホニウム）官能基から選択される。

さらに別の実施態様では、陽イオン官能基又はその前駆官能基は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、アンモニウム（すなわち第四級アミン）及びホスホニウム（すなわち第四ホスフィン）官能基から選択される。

別の実施態様では、陽イオン官能基又はその前駆官能基はグアニジン及びアミジノから選択される。

【００２４】

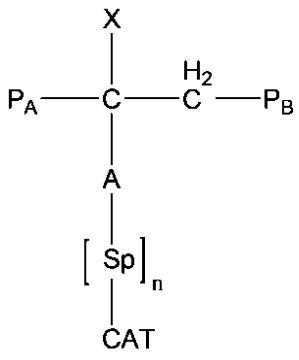
当該ペンダント及び共有結合疎水性部分は、当業者に公知の適切な疎水性部分によって提供され得る。例えば、疎水性部分は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルアルケニル、アルキルアルキニル、アルキルアリール、アルキルカルボシクリル、アルキルヘテロシクリル、アルキルヘテロアリール、アルキルアルケニルアルキル、アルキルアルキニルアルキル、アルキルアリールアルキル、アルキルアシルアルキル、アリールアルキルアリール、アリールアルケニルアリール、アリールアルキニルアリール、アリールカルボシクリル、アリールヘテロシクリル及びアリールヘテロアリールから選択できる。

さらに別の実施態様では、共有結合疎水性部分はC_{1-18}アルキル及びC_{6-18}アリールから選択される。

本発明にしたがって用いられるポリマーは、エチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基が下記の一般式（I）で表される構造を有するものということができる：

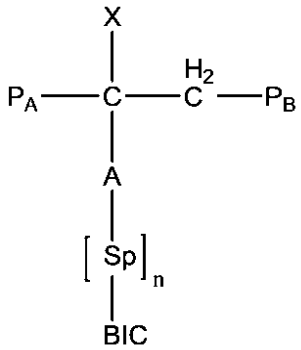
【００２５】

【化４】



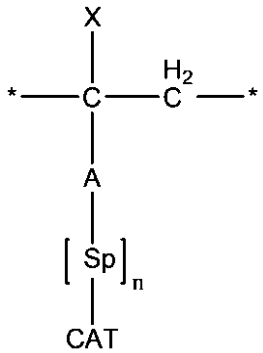
(I)

【００２６】
式中、
P_A及びP_B（前記は同じ又は異なるものである）はポリマー骨格構造の残余を表し；
XはH及び任意的に置換されていてもよいC_{1-6}アルキルから選択され；
Aは、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように、前記二重結合を活性化できる部分であり；
Spはスペーサー部分であり；
nは0又は1であり；さらに
CATは陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む部分である。
【００２７】
同様に、本発明にしたがって用いられるポリマーは、エチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基が下記の一般式（II）で表される構造を有するものということができる：
【００２８】
【化５】



(II)

【００２９】
式中、
P_A及びP_B（前記は同じ又は異なるものである）はポリマー骨格構造の残余を表し；
XはH及び任意的に置換されていてもよいC_{1-6}アルキルから選択され；
Aは、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように、前記二重結合を活性化できる部分であり；
Spはスペーサー部分であり；
nは0又は1であり；さらに
BICは疎水性部分である。
“一般式（I）で示される”構造を有するエチレン性不飽和部分の第一の重合残基と言うとき、下記一般式（I^*）の特定の残基を強調する意図があることは当業者には理解されるであろう：
【００３０】
【化６】



(I*)

【００３１】
式中、X、A、Sp、CATは上記で定義したとおりであり、さらに

【００３２】
【化７】
———*
【００３３】
は、ポリマーの骨格構造又は鎖の残余の原子と*で共役される共有結合を表す。
P_A及びP_Bは、（ａ）ポリマー骨格構造をより明確に表すために、さらに（ｂ）共有結合された（CAT）のペンダント形成の図解を容易にするために一般式（Ｉ）で示されている。
一般式（Ｉ）によって表されるエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基は、部分（CAT）がポリマー骨格構造からどのように除外される少なくとも1つの原子であるかを図解する（すなわちCATは少なくともAによって骨格構造から引き離される）。
一般的には、本発明にしたがって用いられるポリマーは複数のそのような重合残基を含むであろう。そのような事例では、各重合残基は同じでも異なっていてもよい。
同じような理論的解釈が、“一般式（ＩＩ）に示される”構造を有するエチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基にも当てはまる。
【００３４】
本発明にしたがって用いられるポリマーとの関係で“その骨格構造内に含む”という表現はしたがって、エチレン性不飽和モノマーの重合残基（例えば一般式（Ｉ）の-C-C-成分を提供するもの）が、当該ポリマー鎖の残余（例えば一般式（Ｉ）のP_A及びP_B）と一緒になって、互いに連結された原子列を形成してポリマー鎖（直鎖又は分枝し得る）を形成することを意味することが意図される。換言すれば、エチレン性不飽和モノマーの重合残基それ自体はポリマー骨格構造からペンダントしていない。しかしながら、陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む当該部分は、ポリマー骨格構造からペンダントしているであろう（疎水性部分がそうであるように）。例えば、一般式（Ｉ）の関係では、式（Ｉ）のエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基（-C-C-）はポリマー骨格構造からペンダントしていない。しかしながら、式（Ｉ）の-A-$[Sp]_n$-CAT成分はポリマー骨格構造からペンダントしている。当該部分（CAT）はまた骨格構造から除外される少なくとも1つの原子である。
本明細書に記載する一般式で、XはH及び任意的に置換されていてもよいC_{1-6}アルキルから選択される。ある実施態様では、XはH及びCH_3から選択される。
本明細書に記載する一般式の二価基“-A-”は、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように前記二重結合を活性化できる部分である。一般式（Ｉ）及び（ＩＩ）の関係で、エチレン性不飽和部分の重合残基は一般式（ＩＩＩ）のモノマーの重合残基であり、したがって重合を起こすために活性化を必要とするエチレン性不飽和二重結合は式（Ｉ）及び（ＩＩ）にはもはや残っていないことは当業者には理解されるであろう。したがって、“～できる”という語は、式（Ｉ）－（ＩＩＩ）の関係ではA基の具体的な特性を指すために用いられ、エチレン性不飽和二重結合の存在それ自体の必要性を指してはいない（式（ＩＩＩ）には二重結合がもちろん存在しているが）。
【００３５】
エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合に加わるために十分に反応性であるように、それら二重結合は典型的には活性化を必要とすることは当業者には理解されるであろう。一般的には、そのような活性化は、活性化基を適切な近さにある二重結合と共有結合により連結して十分な活性化を促進することによって達成される。
エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように、当該二重結合を活性化できる部分Aの範囲を当業者はさらに理解しているであろう。一般的には、Aは芳香族含有又はヘテロ原子含有部分から選択されるであろう。例えば、Aは、カルボニル若しくはカルボニル含有官能基（例えばエステル、無水物、アミド若しくはイミド、エーテル官能基）、又は芳香族官能基（例えばフェニレン基）から選択できる。
ある実施態様では、Aは、カルボニル、エーテル、エステル、アミド、無水物、イミド及び任意的に置換されていてもよいアリーレンから選択される二価部分である。
さらに別の実施態様では、Aは、カルボニル(*-C(O)-)、エーテル(*-O-)、エステル(*-O

-C(O)-)、アミド(*-(Rz)N-C(O)-)、無水(*-C(O)-O-C(O)-)、イミド(*-C(O)-(Rz)N-C(O)-)、及び任意的に置換されていてもよいアリーレン(*-Ar-)から選択される二価部分であり、式中RzはH又はC_1-C_6アルキルであり、Arはアリーレンであり、*は、SP又はn＝0のときのCAT、BIC及びMとの連結点を示す。

n＝0のとき、Aは、CATと一緒になって、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように当該二重結合を活性化できる部分を形成することができる。例えば、n＝0のとき、Aはカルボニル部分であり、CATは-(Rz)N-基を含むことができ（式中RzはH又はC_1-C_6アルキル）、それによってアミド官能基と一緒になって-A-CATを形成できる。

【００３６】

したがって、Aは、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように、単独で又はn＝0のときはCAT、BIC若しくはMと一緒に当該二重結合を活性化できる部分と定義できる。

ある実施態様では、n＝1のとき、Aは、カルボニル、エーテル、エステル、アミド、無水物、イミド、及び任意的に置換されていてもよいアリーレンから選択される二価部分であり得る。

さらに別の実施態様では、n＝1のとき、Aは、カルボニル(*-C(O)-)、エーテル(*-O-)、エステル(*-O-C(O)-)、アミド(*-(Rz)N-C(O)-)、無水(*-C(O)-O-C(O)-)、イミド(*-C(O)-(Rz)N-C(O)-)、及び任意的に置換されていてもよいアリーレン(*-Ar-)（式中RzはH又はC_1-C_6アルキルであり、Arはアリーレンであり、*は、SPとの連結点を示す）から選択される二価部分であり得る。

本明細書で定義する一般式の二価基“-$[Sp]_n$-”はスペーサー部分である。一切の疑義を避けるために、“n”が0のときは、スペーサー部分Spは当該式には存在せず、したがって部分Aは部分CAT、BIC又はMに直接連結されることが意図される。さらにまた、“n”が1のときは、スペーサー部分は当該一般式に存在し、したがってスペーサー部分は部分A及びCAT、BIC又はMと架橋することが意図される。スペーサー部分Spは、それが存在するときには、CAT、BIC又はMのポリマー骨格構造までの距離を増加させるために機能することができる。

【００３７】

スペーサー部分Spの性質に関しては特に制限はない。適切なスペーサー部分Spの例には以下から選択される基の任意的に置換されていてもよい二価型が含まれる：アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アシル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルアルケニル、アルキルアルキニル、アルキルアリール、アルキルアシル、アルキルカルボシクリル、アルキルヘテロシクリル、アルキルヘテロアリール、アルキルオキシアルキル、アルケニルオキシアルキル、アルキニルオキシアルキル、アリールオキシアルキル、アルキルオキシアシルアルキル、アルキルチオアルキル、アルケニルチオアルキル、アルキニルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルアルケニルアルキル、アルキルアルキニルアルキル、アルキルアリールアルキル、アルキルアシルアルキル、アリールアルキルアリール、アリールアルケニルアリール、アリールアルキニルアリール、アリールアシルアリール、アリールアシル、アリールカルボシクリル、アリールヘテロシクリル、アリールヘテロアリール、アルケニルオキシアリール、アルキニルオキシアリール、アリールオキシアリール、アルキルチオアリール、アルケニルチオアリール、アルキニルチオアリール、アリールチオアリール、及びポリオキシアルキレン。

部分又は官能基をそこから選択できる本明細書の基を定義するリストで、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、カルボシクリル、ヘテロアリール、及びヘテロシクリル部分はそれぞれ任意的に置換され得る。一切の疑義を避けるために、与えられた基がそのような部分の2つ以上を含む場合（例えばアルキルアリール）、そのような部分はそれぞれ場合によって1つ、2つ、3つ又は4つ以上の本明細書で定義する置換基で置換され得る。

【００３８】

本明細書で用いられる“ポリオキシアルキレン”という用語は、オキシアルキレンユニットから構築されるオリゴマー又はポリマーを意味することが意図される。ポリオキシアルキレンは分枝していても直鎖でもよい。

ポリオキシアルキレンを特徴づけるときは、当該ポリマーを形成するオキシアルキレンユニットの数を記載することがときには便利である。本発明にしたがって用いられるポリオキシアルキレンは一般的には2から約50、又は2から約25のオキシアルキレンユニット、又は2から約15のオキシアルキレンユニットを含むであろう。

ポリオキシアルキレンの関係では、本明細書で用いられる“オキシアルキレン”という用語は、二価の$-O(CR^XR^Y)_i-$基を意味することが意図される。前記式中、R^X及びR^Yは、各々独立に水素及び任意的に置換されていてもよいアルキルであり、iは1から10の範囲の整数である。一般的には、R^X及びR^Yは、水素及び任意的に置換されていてもよいC_{1-6}アルキルから各々独立に選択され、iは2、3及び4から選択される整数である。i＞1のとき、（CR^XR^Y）の各々は同じでも異なっていてもよい。例えば、オキシアルキレンユニットがオキシエチレンユニットであるとき、R^X及びR^Yはともに水素でi＝2である（すなわち$-O(CH_2)_2-$）。オキシアルキレンユニットがオキシプロピレンユニットである場合、i＝2であり、最初の“i”のR^X及びR^Yはともに水素で第二の“i”のR^X及びR^Yはそれぞれ水素及びメチルであり得る（すなわち$-OCH_2CH(CH^3)-$）。

ポリオキシアルキレン内のオキシアルキレン基又はユニットの各々は同じでも異なっていてもよい。換言すれば、ポリオキシアルキレンはホモポリマーでも共重合体（ランダム共重合体又はブロック共重合体を含む）でもよい。オキシアルキレンユニットはアルキレンオキシド（例えばエチレンオキシド、プロピレンオキシド又はブチレンオキシド）から誘導できる。

【００３９】

適切なスペーサー部分Spのさらに別の例には、任意的に置換されていてもよいC_{1-18}アルキル、C_{6-18}アリール、C_{1-18}アルキル-C(O)-、C_{6-18}アリール-C(O)-、及び$-(-O(CR^XR^Y)_i-)_r-$（式中R^X、R^Y、iは本明細書で定義され、ｒは2－15の範囲の整数である）が含まれる。

n＝1のとき、SpはBICと一緒になって疎水性部分を形成できる。例えば、n＝1のとき、Sp及びBICはアルキルであり、したがって-Sp-BICは一緒に疎水性部分を形成できる。

本明細書で定義するように、-CATは陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

ある実施態様では、-CATは窒素、リン及び前記の組み合わせから選択される1つ以上の原子を含む。

さらに別の実施態様では、-CATはアミン、ホスフィン、オニウム及び前記の組み合わせから選択される官能基を含む。

別の実施態様では、-CATは第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、アンモニウム、ホスフィン、及び前記の組み合わせから選択される官能基を含む。

さらにまた別の実施態様では、-CATはグアニジン及びアミジノから選択される。

【００４０】

ペンダント-BIC基は、当業者に公知の任意の適切な疎水性部分によって提供できる。例えば、-BICは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルアルケニル、アルキルアルキニル、アルキルアリール、アルキルカルボシクリル、アルキルヘテロシクリル、アルキルヘテロアリール、アルキルアルケニルアルキル、アルキルアルキニルアルキル、アルキルアリールアルキル、アルキルアシルアルキル、アリールアルキルアリール、アリールアルケニルアリール、アリールアルキニルアリール、アリールカルボシクリル、アリールヘテロシクリル及びアリールヘテロアリールから選択できる。

ある実施態様では、-BICはC_{1-18}アルキル及びC_{6-18}アリールから選択される。

本発明にしたがって用いられるポリマーはホモポリマー又は共重合体であり得る。ホモポリマーの場合には、ただ1つのタイプのエチレン性不飽和モノマーがポリマーの調製に用いられることは当業者には理解されるであろう。

共重合体の場合には、2つ以上の異なるエチレン性不飽和モノマーがポリマーの調製に用いられることは当業者には理解されるであろう。

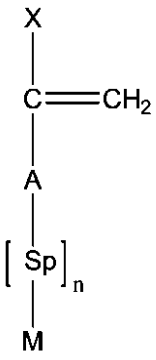
ホモポリマーの場合には、したがって一般式（I）及び（II）のP_A及びP_Bが同じであることは理解されるであろう。

【００４１】

本発明にしたがって用いられるポリマーの調製に用いられるエチレン性不飽和モノマーは下記一般式（III）を含み、前記一般式によって表すことができる：

【００４２】

【化８】



(III)

【００４３】

式中、

XはH及び任意的に置換されていてもよいC_{1-6}アルキルから選択され；

Aは、エチレン性不飽和二重結合が遊離ラジカル重合を起こすことができるように、前記二重結合を活性化できる部分であり；

Spはスペーサー部分であり；

nは0又は1であり；さらに

Mは本明細書で定義するCAT又はBICである。

ある実施態様では、式（III）のMはCATである。

別の実施態様では、式（III）のMはBICである。

式（III）のMがCATであるとき、エチレン性不飽和モノマーは、式（I）で表される第一の重合残基を提供するであろう。同様に、式（III）のMがBICであるとき、エチレン性不飽和モノマーは、式（II）で表される第二の重合残基を提供するであろう。

【００４４】

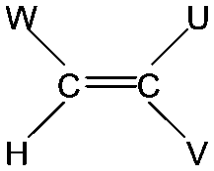
本発明にしたがって用いられるポリマーは一般的には、一般式（I）で表される多数の第一の重合残基を含むであろう。ポリマーはまた一般的には、多数の一般式（II）で表される第二の重合残基を、それが存在する場合には含むであろう。一般式（I）及び（II）の関係では、第一及び第二のエチレン性不飽和モノマーのそのような多数の重合残基は、典型的には、P_A及びP_Bによって表されるポリマー骨格構造の部分又は全てを形成するであろう。本発明にしたがって用いられるポリマーのポリマー骨格構造の部分を形成するエチレン性不飽和モノマーの重合残基は、典型的には遊離ラジカルの重合プロセスを介して形成される。エチレン性不飽和モノマーの遊離ラジカルの（共）重合性を決定する因子は当業界では詳しく記載されている。例えば以下を参照されたい：Greenlee, R.Z., in Polymer Handbook 3rd edition (Brandup, J, and Immergut.E.H.Eds) Wiley: New York, 1989, p II/53。

下記でより詳細に記載するように、本発明にしたがって用いられるホモポリマー型のポリマーは、MがCATである式（III）の同じ構造のモノマーを重合することによって調製できる。本発明にしたがって用いられる共重合体型のポリマーは、MがCATである式（III）の異なる構造のモノマーを重合することによって、又はMがCATである式（III）のモノマーを1つ以上の他の適切な共重合可能なエチレン性不飽和モノマーと一緒に重合することによって調製できる。適切な共重合可能なエチレン性不飽和モノマーの例には、MがBICで

ある一般式（III）のモノマー及び下記式（IV）の他のエチレン性不飽和モノマーが含まれるであろう：

【００４５】

【化９】



(IV)

【００４６】

式中、

U及びWは、$-CO_2H$、$-CO_2R^1$、$-COR^1$、$-CSR^1$、$-CSOR^1$、$-COSR^1$、$-CONH_2$、$-CONHR^1$、$-CONR^1{}_2$、水素、ハロゲン、及び任意的に置換されていてもよいC_1-C_4アルキルから独立に選択されるか、又はU及びWは一緒になってラクトン、無水物又はイミド環を形成し、前記はそれ自体任意的に置換することができ、ここで前記任意の置換基はヒドロキシ、$-CO_2H$、$-CO_2R^1$、$-COR^1$、$-CSR^1$、$-CSOR^1$、$-COSR^1$、-CN、$-CONH_2$、$-CONHR^1$、$-CONR^1{}_2$、$-OR^1$、$-SR^1$、$-O_2CR^1$、$-SCOR^1$、及び$-OCSR^1$から独立に選択され；

Vは水素、R^1、$-CO_2H$、$-CO_2R^1$、$-COR^1$、$-CSR^1$、$-CSOR^1$、$-COSR^1$、$-CONH_2$、$-CONHR^1$、$-CONR^1{}_2$、$-OR^1$、$-SR^1$、$-O_2CR^1$、$-SCOR^1$、及び$-OCSR^1$から選択され、ここでR^1又は各R^1は、それぞれ独立に任意的に置換されていてもよいアルキル、任意的に置換されていてもよいアルケニル、任意的に置換されていてもよいアルキニル、任意的に置換されていてもよいアリール、任意的に置換されていてもよいヘテロアリール、任意的に置換されていてもよいカルボシクリル、任意的に置換されていてもよいヘテロシクリル、任意的に置換されていてもよいアリールアルキル、任意的に置換されていてもよいヘテロアリールアルキル、任意的に置換されていてもよいアルキルアリール、任意的に置換されていてもよいアルキルヘテロアリール、及び任意的に置換されていてもよいポリマー鎖から選択される。

式（IV）のR^1又は各R^1はまた、それぞれ独立に以下から選択できる：任意的に置換されていてもよいC_1-C_{22}アルキル、任意的に置換されていてもよいC_2-C_{22}アルケニル、任意的に置換されていてもよいC_2-C_{22}アルキニル、任意的に置換されていてもよいC_6-C_{18}アリール、任意的に置換されていてもよいC_3-C_{18}ヘテロアリール、任意的に置換されていてもよいC_3-C_{18}カルボシクリル、任意的に置換されていてもよいC_2-C_{18}ヘテロシクリル、任意的に置換されていてもよいC_7-C_{24}アリールアルキル、任意的に置換されていてもよいC_4-C_{18}ヘテロアリールアルキル、任意的に置換されていてもよいC_7-C_{24}アルキルアリール、任意的に置換されていてもよいC_4-C_{18}アルキルヘテロアリール、及び任意的に置換されていてもよいポリマー鎖。

ある実施態様では、（式（IV）中の）R^1はそれぞれ独立に、任意的に置換されていてもよいC_1-C_6アルキルから選択できる。

式（IV）中のR^1のための任意的置換基の例には、アルキレンオキシジル（エポキシ）、ヒドロキシ、アルコキシ、アシル、アシルオキシ、フォルミル、アルキルカルボニル、カルボキシ、スルホン酸、アルコキシ-又はアリールオキシ-カルボニル、イソシアナート、シアノ、シリル、ハロ、アミノから選択されるもの（前記の塩及び誘導体を含む）が含まれる。ポリマー鎖の例には、ポリアルキレンオキシド、ポリアリーレンエーテル及びポリアルキレンエーテルから選択されるものが含まれる。

式（IV）のモノマーの例には、無水マレイン酸、N-アルキルマレイミド、N-アリールマレイミド、ジアルキルフマレート及びシクロ重合性モノマー、アシレート及びメタクリレートエステル、アクリル及びメタクリル酸、スチレン、アクリルアミド、メタクリルアミド、及びメタクリロニトリル、これらのモノマーの混合物、並びにこれらのモノマーと他のモノマーとの混合物が含まれる。

【００４７】

式（IV）のモノマーの他の例には以下が含まれる：メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、プロピルメタクリレート（全ての異性体）、ブチルメタクリレート（全ての異性体）、2-エチルヘキシルメタクリレート、イソボルニルメタクリレート、メタクリル酸、ベンジルメタクリレート、フェニルメタクリレート、メタクリロニトリル、アルファ-メチルスチレン、メチルアクリレート、エチルアクリレート、プロピルアクリレート（全ての異性体）、ブチルアクリレート（全ての異性体）、2-エチルヘキシルアクリレート、イソボルニルアクリレート、アクリル酸、ベンジルアクリレート、フェニルアクリレート、アクリロニトリル、スチレン、機能性メタクリレート、グリシジルメタクリレートから選択されるアクリレート及びスチレン、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート（全ての異性体）、ヒドロキシブチルメタクリレート（全ての異性体）、N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、N,N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、トリエチレングリコールメタクリレート、無水イタコン酸、イタコン酸、グリシジルアクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシプロピルアクリレート（全ての異性体）、ヒドロキシブチルアクリレート（全ての異性体）、N,N-ジメチルアミノエチルアクリレート、N,N-ジエチルアミノエチルアクリレート、トリエチレングリコールアクリレート、メタクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-tert-ブチルメタクリルアミド、N-n-ブチルメタクリルアミド、N-メチロールメタクリルアミド、N-エチロールメタクリルアミド、N-tert-ブチルアクリルアミド、N-n-ブチルアクリルアミド、N-メチロールアクリルアミド、N-エチロールアクリルアミド、ビニル安息香酸（全ての異性体）、ジエチルアミノスチレン（全ての異性体）、アルファ-メチルビニル安息香酸（全ての異性体）、ジエチルアミノアルファ-メチルスチレン（全ての異性体）、p-ビニルベンゼンスルホン酸、p-ビニルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩、トリメトキシシリルプロピルメタクリレート、トリエトキシシリルプロピルメタクリレート、トリブトキシシリルプロピルメタクリレート、ジメトキシメチルシリルプロピルメタクリレート、ジエトキシメチルシリルプロピルメタクリレート、ジブトキシメチルシリルプロピルメタクリレート、ジイソプロポキシメチルシリルプロピルメタクリレート、ジメトキシシリルプロピルメタクリレート、ジエトキシシリルプリピルメタクリレート、ジブトキシシリルプロピルメタクリレート、ジイソプロポキシシリルプロピルメタクリレート、トリメトキシシリルプロピルアクリレート、トリエトキシシリルプロピルアクリレート、トリブトキシシリルプロピルアクリレート、ジメトキシメチルシリルプロピルアクリレート、ジエトキシメチルシリルプロピルアクリレート、ジブトキシメチルシリルプロピルアクリレート、ジイソプロポキシメチルシリルプロピルアクリレート、ジメトキシシリルプロピルアクリレート、ジエトキシシリルプリピルアクリレート、ジブトキシシリルプロピルアクリレート、ジイソプロポキシシリルプロピルアクリレート、酢酸ビニル、酪酸ビニル、安息香酸ビニル、塩化ビニル、フッ化ビニル、臭化ビニル、無水マレイン酸、N-フェニルマレイミド、N-ブチルマレイミド、N-ビニルピロリドン、N-ビニルカルバゾール、ブタジエン、エチレン及びクロロプレン。このリストは網羅的ではない。

【００４８】

一般式（III）のエチレン性不飽和モノマーは、一般式（IV）のエチレン性不飽和モノマーの範囲内に含まれ得ることは当業者には理解されるであろう。明瞭にするために、本発明にしたがって用いられるポリマーが一般式（III）及び（IV）のモノマーから調製されると記載される場合には（すなわちそのように形成されたポリマーが共重合体である場合には）、一般式（IV）のモノマーから選択されるモノマーの範囲は、一般式（III）の範囲内に既に含まれるモノマーをもちろん排除することが意図される。

一般式（I）及び（III）の関係では、P_A及びP_Bは各々、同じか又は異なることがあるポリマー鎖を表し、ここで前記各々は、別個に第一及び/又は第二の重合モノマー残基、1つ以上の他の重合モノマー残基、及びその組み合わせを含むことができる。例えば、P_A及びP_Bは各々、同じか又は異なることがあるポリマー鎖を表し、ここで前記各々は、独立に、一般式（III）、一般式（IV）及びその組み合わせから選択されるエチレン性不飽和モノマーの重合モノマー残基を含むことができる。

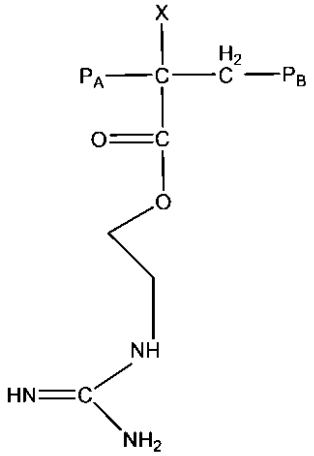
ある実施態様では、エチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基は本明細書に記載の一般式（I）で表される構造を有し、式中Aはエステルであり、SpはC_{1-6}アルキルであり、CATはグアニジノ及びアミジノから選択される。

さらに別の実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーはさらに、その骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基を含み、ここで第二の重合残基は、本明細書に定義する一般式（II）で表される構造を有し、式中Aはエステルであり、nは0であり、BICはC_{1-6}アルキルである。

さらにまた別の実施態様では、エチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基は下記一般式（V）で表される構造を有する：

【００４９】

【化１０】



(V)

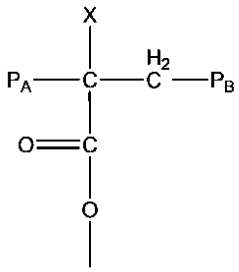
【００５０】

式中、P_A、P_B及びXは本明細書で定義したとおりである。

別の実施態様では、エチレン性不飽和モノマーの第二の重合残基は下記一般式（VI）で表される構造を有する：

【００５１】

【化１１】



(VI)

【００５２】

式中、P_A、P_B及びXは本明細書で定義したとおりである。

本発明にしたがって用いられるポリマーの分子量に関して特に制限はない。ポリマーの数平均分子量（Mn）は、概ね約2,000から約250,000、例えば約3,000から約100,000の範囲であるだろう。ポリマーのMnはゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）を用いて決定される。

ある実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーは、1.5未満又は1.4未満又は1.2未満の分散性（D）を有する。

本明細書で用いられるように、ポリマーの分散性（D）は下記の等式（1）にしたがって決定される：

$$D = Mw/Mn \qquad (1)$$

式中、Mwは量平均分子量であり、Mnは本明細書で定義したとおりである。

【００５３】
本発明にしたがって用いられるポリマーは、一般式（III）によって表される構造を有するエチレン性不飽和モノマーを、場合によって一般式（IV）のエチレン性不飽和モノマーと組み合わせて、エチレン性不飽和モノマーの遊離ラジカル重合によって重合する工程を含む方法によって調製できる。一般式（IV）のエチレン性不飽和モノマーが用いられる場合、前記モノマーはもちろん一般式（III）のモノマーの範囲内に含まれない構造を有するであろう。本発明にしたがえば、ポリマーは、少なくとも一般式（III）のモノマー（MはCATである）を重合することによって調製される必要がある。換言すれば、そのようにして形成されたポリマーは、エチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基をその骨格構造内に取り込む必要がある。
ある実施態様では、第一の重合モノマー残基は2-グアニジノエチルメタクリレート残基である。
さらに別の実施態様では、第二の重合モノマー残基はメチルメタクリレート残基である。
さらにまた別の実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーは、2-グアニジノエチルメタクリレートとメチルメタクリレートの共重合体である。
本発明にしたがって用いられるポリマーは、存在するエチレン性不飽和モノマーの重合残基の総量に対して、約1モル%から100モル%の第一の重合残基（又は一般式（I））をその骨格構造内に含むことができる。ある実施態様では、第一の重合残基（又は一般式（I））の量は、存在するエチレン性不飽和モノマーの重合残基の総量に対して、約10モル%から約90モル%、又は約20モル%から約80モル%、又は約30モル%から約70モル%、又は約40モル%から約70モル%、又は約50モル%から約70モル%の範囲である。
エチレン性不飽和モノマー（又は式（II））の第二の重合残基は、それが存在する場合には、存在するエチレン性不飽和モノマーの重合残基の総量に対して、一般的には約10モル%から約90モル%、又は約20モル%から約80モル%、又は約30モル%から約70モル%、又は約40モル%から約70モル%、又は約50モル%から約70モル%の範囲の量で当該ポリマー骨格構造内に含まれるであろう。
同様に、一般式（IV）のエチレン性不飽和モノマーに由来する重合残基は、それが存在するときには、存在するエチレン性不飽和モノマーの重合残基の総量に対して、一般的には約モル5%から約60モル%、又は約5モル%から約50モル%、又は約5モル%から約40モル%、又は約5モル%から約30モル%の範囲の量で当該ポリマー骨格構造内に含まれるであろう。
【００５４】
本発明にしたがって用いられるポリマーを調製する、遊離ラジカル重合によるエチレン性不飽和モノマーの重合は遊離ラジカル源からの開始を必要とし得る。開始ラジカル源は、遊離ラジカルを発生させる適切な任意の手段によって提供できる。前記手段は、例えば適切な化合物の熱誘発ホモリティック切断（熱開始剤、例えば過酸化物、ペルオキシ酸エステル又はアゾ化合物）、レドックス開始系、光化学開始系、又は高エネルギー照射（例えば電子ビーム、X線又はガンマ照射）である。
本発明にしたがって用いられるポリマーを形成する、モノマーの遊離ラジカル重合は、通常的な遊離ラジカル重合によって又はいわゆるリビング遊離ラジカル重合によって進行させることができる。リビング重合は当業界では一般的に連鎖重合の1つの形態とみなされ、前記では不可逆的な連鎖終了は実質的に存在しない。リビング重合の重要な特色は、モノマー及び重合を促進する反応条件が提供されている間は、ポリマー鎖は伸長し続けるということである。
モノマーの遊離ラジカル重合がリビング重合技術によって生じる場合、いわゆるリビング重合剤を使用することが一般的に必要であろう。“リビング重合剤”とは、エチレン性不飽和モノマーのリビング重合に加わり、これを制御又は媒介してリビングポリマー鎖（すなわちリビング重合技術にしたがって形成されたポリマー）を形成することができる化合物を意味する。
遊離ラジカルのリビング重合技術の例には、イニファータ重合、安定遊離ラジカル媒介

重合（SFRP）、原子移動ラジカル重合（ATRP）、及び可逆性付加-断片化連鎖移転（RAFT）重合が含まれる。

ある実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーはイニファータ重合によって調製される。

さらに別の実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーはSFRPによって調製される。

別の実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーはATRPによって調製される。

さらに別の実施態様では、本発明にしたがって用いられるポリマーはRAFT重合によって調製される。

【００５５】

エチレン性不飽和モノマーの遊離ラジカル重合を実施するための技術、装置及び試薬は当業者には一般的に周知され、本発明の使用に適切なポリマーの調製で有利に利用され得る。

本発明にしたがって用いられるポリマーは、担体の液体中で十分に可溶性であるか又は容易に分散できるように有利に調製されて、バイオフィルムに有害な影響を与える適切な量のポリマーを含む組成物が提供され得る。例えば、液体形の組成物は1000mg/Lまでのポリマーを含むことができる。ある実施態様では、液体形の組成物は約10mg/Lから約500mg/Lのポリマー、又は約50mg/Lから約300mg/Lのポリマーを含むことができる。

本発明にしたがって用いられるポリマーは、驚くべきことにかつ有益なことに、バイオフィルムに有害な影響を与える強力な抗微生物剤として機能することが見出された。したがって、当該ポリマーは抗バイオフィルム剤であると言うことができる。実際的観点から、本発明にしたがって用いられるポリマー又は当該ポリマーを含む組成物は、バイオフィルムの増殖を阻害するか又は予防することによって、及び/又はバイオフィルムの部分を形成する生存微生物の数を減少させることによってバイオフィルムに有害な影響を与える。バイオフィルムはまた、当該バイオフィルムの部分を形成する微生物を殺滅することによって有害な影響を与えることができる。

したがって、本発明はバイオフィルムに有害な影響を与える方法を提供し、前記方法は、バイオフィルムの増殖の阻害又は予防、バイオフィルムの部分を形成する生存微生物の数の減少、及び/又はバイオフィルムの部分を形成する微生物の殺滅を含む。

ある実施態様では、バイオフィルムの部分を形成する微生物の少なくとも10%、又は少なくとも20%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%が死滅する。

【００５６】

本発明の方法は、特に対象動物上に又は対象動物内に存在するバイオフィルムに有害な影響を与えるために適切である。前記目的のために、本発明はまた、当該対象動物への投与のために、又はバイオフィルムに有害な影響を与える医薬の製造における当該ポリマーの使用のために適切な組成物を提供する。

本発明にしたがえば、バイオフィルムは、本明細書に記載のポリマー又は当該ポリマーを含む組成物に暴露されることによって有害な影響を受ける。バイオフィルムの当該組成物又はポリマーへの暴露は、当業者に公知の任意の適切な手段によって達成できる。前記手段は、当該ポリマー又は組成物によるコーティング、含浸、噴霧、或いはバイオフィルム又はバイオフィルムが付着する表面の接触を含む。そのような暴露は、バイオフィルムを含む対象動物への当該組成物又はポリマーの投与の結果として生じ得る。

本発明にしたがって有害な影響を与えることができるバイオフィルムの性質又は位置に関しては特に制限はない。例えば、バイオフィルムは対象動物の内部又は表面に存在することができる。バイオフィルムはまた、無生物（例えば医療器具）の表面に存在することができる。

対象動物への投与の関係では、本発明の組成物は対象動物の身体表面に適用することができる。前記表面は対象動物にとって内在性であっても外在性であってもよい。例えば、

バイオフィルムは、ヒト組織の表面（すなわち生物的表面）、例えば角膜又は硝子体液に定着していることがある。組成物の対象動物への投与が、当然、対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの本発明にしたがって用いられるポリマーへの暴露を生じることは意図される。投与は、当業者が適切と考える任意のルートによって達成できる。投与ルートの例には本明細書で規定されるものが含まれる。対象動物への組成物の投与は、1回又は2回以上（2、3、4、5又は6回以上、又は所望の結果を達成するために必要な回数を含む）、任意の適切な間隔で実施できる。

【００５７】

バイオフィルムを形成する微生物のタイプに関して特に制限はない。例えば、バイオフィルムは、グラム陽性細菌（例えば黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・エピデルミジス、コアグラーゼ陰性スタフィロコッカス、ストレプトコッカス属種及び結核菌）、グラム陰性菌（例えばクレブシエラ・ニューモニアエ及び緑膿菌）、及び真菌類病原体（例えばカンジダ属種及びカンジダ・アルビカンス）から選択される1つ以上の微生物を含むか、又は本質的に前記から成ることができる。

ある実施態様では、バイオフィルムは、1つ以上のグラム陽性細菌、例えば黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・エピデルミジス、コアグラーゼ陰性スタフィロコッカス、ストレプトコッカス属種及び結核菌を含むか、又は本質的に前記から成ることができる。

別の実施態様では、バイオフィルムは、カンジダ・アルビカンス及び黄色ブドウ球菌から選択される微生物の一方又は両方を含むか、又は本質的に前記から成ることができる。

バイオフィルムは単一微生物性又は多重微生物性バイオフィルムであり得る。本発明の方法は、驚くべきことに多重微生物性バイオフィルムに有害な影響を与えることに特に有効であることが見出された。

多重微生物性バイオフィルムでは、混合微生物種が共生関係で存在し、時には互に利益を得る。例えば、有利な相互関係は黄色ブドウ球菌とC.アルビカンスとの間で観察され、例えば、単一種のバイオフィルムと比較して多重微生物性増殖様式ではより高い微生物量及び抗微生物剤耐性の増強が観察されている。さらにまた、C.アルビカンスとバイオフィルムを形成するとき、黄色ブドウ球菌はバンコマイシン及びダプトマイシンに単培養の場合よりも耐性になる。別の細菌種、スタフィロコッカス・エピデルミジスは、バイオフィルムで一緒に増殖するとき、C.アルビカンスを抗真菌薬フルコナゾール及びアンホテリシンBの作用から保護することが示された。多重微生物性バイオフィルムの薬剤耐性強化は、真菌及び細菌によって分泌される細胞外バイオフィルムマトリックスの成分に起因している。

【００５８】

概して、従来の多くの抗微生物剤はバイオフィルム、特に多重微生物性バイオフィルムに対して貧弱な有効性を示す。本明細書に記載及び例示するポリマーは、有利には単一微生物性及び多重微生物性バイオフィルムの両方に対して強力な抗微生物特性を示す。これらのポリマーのバイオフィルムに対する有効性は浮遊性増殖と比較すればほんのわずかしか低下せず、したがって通常のバイオフィルム抵抗メカニズムは適用されないことを示唆している。注目すべきことには、当該ポリマーによって示される抗微生物特性は、唯一の抗微生物剤として当該ポリマーを用いて導き出すことができる。

理論に拘束されないが、ポリマーの強力な抗微生物特性は、天然に存在する抗微生物ペプチド（AMP）の分子構造を模倣する当該ポリマーの分子構造に少なくとも部分的に由来すると考えられる。AMPは、それらの広域抗微生物活性、人間の細胞に対する低毒性、及び従来知られている耐性メカニズムに対する低感受性により、新規な抗生物質の開発の有望な指標と認識されてきた。しかしながら、必要とされるタンパク質が典型的には薬物動態的に不安定であり大規模生産が高価であるために、それらの実際的な応用には幾分限界がある。本発明にしたがって用いられるポリマーはAMPの多くの所望される特性を示すが、AMPとは異なり生産が安定かつ安価であり、適用に対応してより容易に化学的に改変できる。

本発明にしたがって用いられるポリマーは有利にはヒトの細胞への低毒性を示した。

【００５９】
本発明の方法及び組成物はバイオフィルムに有害な影響を与えるために提供されるが、対象動物へのそれらの投与は、典型的には感染疾患及び症状の治療、予防及び進行中の管理のために利用されるであろう（前記疾患及び異常は対象動物内又は対象動物上のバイオフィルムの存在を伴う、バイオフィルムの存在を特徴とする、又はバイオフィルムの存在によって引き起こされる疾患及び異常である）。例えば、対象動物内又は対象動物上の定着バイオフィルムの存在を伴う微生物関連感染症は、医療器具（静脈及び尿道カテーテル、心臓弁及びステント、補綴器具、管類、インプラント（例えば乳房インプラント及び眼内レンズ）が含まれるが、ただしこれらの限定されない）の使用に伴う感染症だけでなく、義歯性口内炎、バイオフィルム関連角膜炎及び感染性眼内炎も含む。
本明細書に記載及び例示するポリマーはバイオフィルムに有害な影響を与える唯一の抗微生物剤として用いることができるが、所望の場合には、ポリマーを当該バイオフィルムに有害な影響を与える1つ以上の抗微生物剤と組み合わせて用いることができる。
ある実施態様では、本発明はさらに、有効量のポリマーを含む組成物及び1つ以上の他の抗微生物剤にバイオフィルムを暴露する工程を含む。そのような場合には、当該暴露は、同時に又は異なる時に実施できる（すなわち暴露は同時又は連続的であり得る）。
1つ以上の他の抗微生物剤が用いられる場合には、それらの薬剤をポリマーを含む組成物と共同処方しても、或いは別々の組成物として処方してもよい。1つ以上の他の抗微生物剤が異なる組成物として提供される場合には、本明細書に記載する同じ若しくは異なるルート又は手段で、それらを対象動物に投与するか又はバイオフィルムに暴露することができる。
他の適切な抗微生物剤の例には、抗真菌薬（例えばアゾール、エキノキャンディン、ポリエン、フルオサイトシン）及び抗生物質（例えばペニシリン（ペニシリンG）、ペニシリナーゼ耐性β-ラクタム（オキサシリン及びメチシリン）、フルオロキノロン（シプロフロキサシン）、リファマイシン（リファンピシン）、グリコペプチド（バンコマイシン）、及びリポペプチド（ダプトマイシン））が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【００６０】
本発明にしたがって用いられるポリマーを含む組成物の処方は、もちろん用いられる適用及び/又は投与技術に左右されるであろう。例えば、組成物は、液体、鼻用スプレー、点眼液、シロップ、懸濁物、クリーム、散剤、錠剤、ペースト、ローション又はゲルの形態で処方できる。
ポリマーを含む組成物はさらに1つ以上の担体、希釈剤又は賦形剤を含むことができる。
ある実施態様では、そのような担体又は賦形剤は薬理学的に許容できる。そのような適切な担体、希釈剤又は賦形剤の例には以下が含まれる：食塩水溶液、脱塩又は蒸留水、鉱物油、例えば流動パラフィン、軟パラフィン又はスクアラン、植物系油、例えばトウモロコシ油、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、落花生油、ヒマワリ油又はココナッツ油、シリコーン油、例えばポリシロキサン、アルコール、例えばエタノール又はイソプロパノール、ポリマー、例えばポリオール、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、天然ポリマー、例えばアルジネート、デンプン及びデキストラングルカン、ゼラチン又はグリセリン、脂肪酸エステル、例えばパルミチン酸イソプロピル、又はオレイン酸エチル、寒天、アラビアゴム、ワセリン、セルロース及びアルキルセルロース誘導体、並びに固体基質（例えば金属、プラスチック、セラミック又は前記の組み合わせから製造されるもの）。

【００６１】
本発明の方法又は組成物で用いられるポリマーの量は、所望の結果（本発明のばあいにはバイオフィルムに有害な影響を与えること）を達成するために有効な量であろう。所望の結果を達成するために要求される正確な量は複数の要件にしたがって変動する（例えば、対象動物又は考慮されるべき状況、バイオフィルムの組成、組成物に暴露されるべきバ

イオフィルムの体積又はサイズ、バイオフィルムが存在する環境、及び組成物へのバイオフィルムの暴露が実施される手段）。

ポリマーを含む組成物が固体形で、例えば錠剤又はカプセル形で提供される場合、ポリマーは、約0.01%（w/w）から約60 %（w/w）、又は約0.01%（w/w）から約40%（w/w）、又は約0.5%（w/w）から約20%（w/w）、又は約1%（w/w）から約15%（w/w）、又は約1%（w/w）から約10%（w/w）の範囲の濃度で提供され得る。

ポリマーを含む組成物が液体形で提供される場合、ポリマーは1000mg/mLまで、例えば約10mg/mLから約1000mg/mL、又は約10mg/mLから約500mg/mL、又は約10mg/mLから約300mg/mL、又は約50mg/mLから約300mg/mLの範囲の量で提供され得る。

当業者は、用いるためにもっとも適切な濃度を日常的な実験で容易に決定できる。

本発明にしたがって用いられる組成物が、例えばバイオフィルムを伴う感染疾患又は症状の治療で対象動物へ投与するために処方される場合、組成物は典型的には対象動物に治療的に有効な量で投与されるであろう。当業者は前記を達成するために適切な投薬量及び投与レジメンを決定することができ、前記は、治療される又は診断を下された具体的な症状、症状の重篤度とともに、対象動物の大雑把な齢、健康状態及び体重に左右され得る。具体的な投薬量は経験的に決定するか、或いは例えば動物実験又は以前の人間での研究から推定することができる。ポリマーそれ自体の適切な投薬量は、1回の投薬に付き約0.1ng/kg体重から1g/kg体重の範囲内であり得る。投薬量は、1回の投薬に付き1μgから1g/kg体重の範囲であり得る。例えば、投薬量は、1回の投薬に付き1mgから1g/kg体重の範囲である。ある実施態様では、投薬量は、1回の投薬に付き1mgから500mg/kg体重の範囲であり得る。別の実施態様では、投薬量は、1回の投薬に付き1mgから250mg/kg体重の範囲であり得る。さらにまた別の実施態様では、投薬量は、1回の投薬に付き1mgから100mg/kg体重の範囲、例えば1回の投薬に付き50mg/kg体重までであり得る。

本発明の組成物は単回投与として又は一連の投与として投与することができる。

【００６２】

本発明のポリマーを含む組成物は、有効なロック溶液として機能することが示された。病菌汚染カテーテル及び他のインプラント器具のサルベージは、当該器具の除去が好ましい選択肢ではない臨床状況で重要である。前記は、いわゆる“抗菌薬ロック療法”（ALT）によって達成でき、これは、器具を抗微生物剤で処理して当該器具に付着したバイオフィルムを形成する微生物の殺滅を伴う。

エタノールALTは、器具関連血流感染では第一線選択肢として推奨されている。しかしながら、これは、病菌汚染が比較的病毒性が弱い微生物（例えばコアグラーゼ陰性スタフィロコッカス（CoNS）によって、又は器具の維持が認可されている他の微生物によって引き起こされるときにのみ推奨される。米国感染症協会の臨床手引きは病菌汚染器具の除去を推奨している（例えば黄色ブドウ球菌又はC.アルビカンスによるバイオフィルム関連感染症例における中心静脈カテーテル（CVC））。器具の再挿入は静脈へのアクセスが制限される患者では困難なことがあり、器具設置に伴う有病率及び死亡率リスクが高いために、器具サルベージの要求はしばしばリスクを上回る。したがって、バイオフィルムを標的とする抗微生物ロック溶液はカテーテル救済の重要な選択肢である。高濃度の抗真菌剤（例えばアンホテリシンB又はカスポファンギン）がALTで用いられ、カンジダ単一バイオフィルムに対しては活性が示されたが、前記薬剤は、細菌も含む多重微生物性バイオフィルムには有効でないであろう。エタノールは、C.アルビカンス又は黄色ブドウ球菌によって引き起こされるカテーテル関連血流感染（CRBSI）のためのロック溶液として個々にin vitroで試験されている。In vitro試験は、エタノールがC.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性バイオフィルムに対してロック溶液として有効であることを示した。エタノールは多くの利点を有するが、今ではその安全性について懸念が存在する。患者の健康に関する副作用が報告されている（全身毒性、頭痛、浮遊感、めまい、不整脈、疲労感、吐き気、局所静脈刺激を含む）。さらにまた、エタノールの使用は、器具の損傷、管腔閉塞及びいくつかの事例では血栓症を生じ得る。

本発明のポリマーを含む組成物は、有利には通常のロック溶液の使用に伴う1つ以上の

問題を克服することができる。

【００６３】

したがって、本発明はさらにバイオフィルムが付着した医療器具に対して抗菌薬ロック療法を実施する方法を提供し、前記方法は、骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーの有効量を含む組成物に当該バイオフィルムを暴露する工程を含む。前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（ｉ）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明はさらに抗菌薬ロック療法で使用される抗菌薬ロック溶液を提供し、前記組成物は、薬理学的に許容できる担体及びポリマー骨格構造内にエチレン性不飽和モノマーの第一の重合残基を含むポリマーを含む。前記第一の重合モノマー残基は共有結合部分を含み、前記共有結合部分は、（i）当該骨格構造からペンダントを提示し、さらに（ii）陽イオン官能基又はその前駆官能基を含む。

本発明の抗菌薬ロック溶液は、典型的には、バイオフィルムが付着した医療器具に対して抗菌薬ロック療法を実施するために用いられるであろう。抗菌薬ロック溶液へのバイオフィルムの暴露は、有利には本明細書に記載するようにバイオフィルムに有害な影響を与えるであろう。

【００６４】

本明細書で用いられるように、“アルキル”という用語は、単独又は合成語として用いられて、直鎖、分枝又は環状アルキル、好ましくはC_{1-20}アルキル（例えばC_{1-10}又はC_{1-6}）を指す。直鎖及び分枝アルキルの例には以下が含まれる：メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、1,2-ジメチルプロピル、1,1-ジメチル-プロピル、ヘキシル、4-メチルペンチル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、1,2,2-トリメチルプロピル、1,1,2-トリメチルプロピル、ヘプチル、5-メチルヘキシル、1-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルペンチル、4,4-ジメチルペンチル、1,2-ジメチルペンチル、1,3-ジメチルペンチル、1,4-ジメチル-ペンチル、1,2,3-トリメチルブチル、1,1,2-トリメチルブチル、1,1,3-トリメチルブチル、オクチル、6-メチルヘプチル、1-メチルヘプチル、1,1,3,3-テトラメチルブチル、ノニル、1-、2-、3-、4-、5-、6-又は7-メチルオクチル、1-、2-、3-、4-又は5-エチルヘプチル、1-、2-又は3-プロピルヘキシル、デシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-及び8-メチルノニル、1-、2-、3-、4-、5-又は6-エチルオクチル、1-、2-、3-又は4-プロピルヘプチル、ウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-又は9-メチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-又は7-エチルノニル、2-、3-、4-又は5-プロピルオクチル、1-、2-又は3-ブチルヘプチル、1-ペンチルヘキシル、ドデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-又は10-メチルウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-又は8-エチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-又は6-プロピルノニル、1-、2-、3-又は4-ブチルオクチル、1-2-ペンチルヘプチルなど。環状アルキルの例には、単環式及び多環式アルキル基、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシルなどが含まれる。アルキル基が一般的に“プロピル”、“ブチル”などと称される場合、前記は、適切な場合には任意の直鎖、分枝及び環状異性体のいずれかを指すことができると理解されるであろう。アルキル基は、本明細書で定義する1つ以上の任意的置換基によって任意的に置換され得る。

【００６５】

本明細書で用いられる“アルケニル”という用語は、少なくとも1つの炭素対炭素二重結合を含む、直鎖、分枝又は環状炭化水素残基から形成される基を指し、前記には、以前に定義したようにエチレン性一不飽和、二不飽和又は多不飽和アルキル又はシクロアルキル、好ましくはC_{2-20}アルケニル（例えばC_{2-10}又はC_{2-6}）が含まれる。アルケニルの例には、ビニル、アリル、1-メチルビニル、ブテニル、iso-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ペンテニル、シクロペンテニル、1-メチル-シクロペンテニル、1-ヘキセニル、3-ヘ

キセニル、シクロヘキセニル、1-ヘプテニル、3-ヘプテニル、1-オクテニル、シクロオクテニル、1-ノネニル、2-ノネニル、3-ノネニル、1-デセニル、3-デセニル、1,3-ブタジエニル、1,4-ペンタジエニル、1,3-シクロペンタジエニル、1,3-ヘキサジエニル、1,4-ヘキサジエニル、1,3-シクロヘキサジエニル、1,4-シクロヘキサジエニル、1,3-シクロヘプタジエニル、1,3,5-シクロヘプタトリエニル、及び1,3,5,7-シクロオクタテトラエニルが含まれる。アルケニル基は、本明細書で定義する1つ以上の任意的置換基によって任意的に置換され得る。

本明細書で用いられるように、“アルキニル”という用語は、少なくとも1つの炭素対炭素三重結合を含む、直鎖、分枝又は環状炭化水素残基から形成される基を指し、前記には、以前に定義したようにエチレン性一不飽和、二不飽和又は多不飽和アルキル又はシクロアルキルが含まれる。炭素原子の数が指定されないかぎり、前記用語は好ましくはC_{2-20}アルキニル（例えばC_{2-10}又はC_{2-6}）を指す。例には、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、及びブチニル異性体並びにペンチニル異性体が含まれる。アルキニル基は、本明細書で定義する1つ以上の任意的置換基によって任意的に置換され得る。

【００６６】

“ハロゲン”（“ハロ”）という用語はフッ素、塩素、臭素又はヨウ素（フルオロ、クロロ、ブロモ又はヨード）を指す。

“アリール”（“カルボアリール”）とう用語は、芳香族炭化水素環系の単一、多核、共役及び縮合残基のいずれかを指す（例えばC_{6-24}又はC_{6-18}）。アリールの例にはフェニル、ビフェニル、テルフェニル、クアテルフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、アントラセニル、ジヒドロアントラセニル、ベンゾアントラセニル、ジベンゾアントラセニル、フェナントレニル、フルオレニル、ピレニル、イデニル、アズレニル、クリセニルが含まれる。好ましいアリールにはフェニル及びナフチルが含まれる。アリール基は、本明細書で定義する1つ以上の随意の置換基によって任意的に置換されていてもよいか又は置換されないことがある。“アリーレン”という用語はアリールの二価形を指すことが意図される。

“カルボシクリル”という用語には、非芳香族単環式、多環式、縮合又は共役炭化水素残基のいずれか、好ましくはC_{3-20}（例えばC_{3-10}又はC_{3-8}）が含まれる。環は飽和されていてもよく（例えばシクロアルキル）、或いは1つ以上の二重結合（シクロアルケニル）及び/又は1つ以上の三重結合（シクロアルキニル）を有していてもよい。特に好ましいカルボシクリル部分は、5－6員環又は9－10員環系である。適切な例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロデシル、シクロノニル、シクロデシル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロオクテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキサジエニル、シクロオクタテトラエニルインダニル、デカリニル及びインデニルが含まれる。カルボシクリル基は、本明細書で定義する1つ以上の随意の置換基によって任意的に置換され得る。“カルボシクリレン”という用語はカルボシクリルの二価形を指すことが意図される。

本明細書で用いられるもっとも広い意味での“ヘテロ原子”又は“ヘテロ”という用語は、環式有機基のメンバーであり得る炭素以外の任意の原子を指す。ヘテロ原子の具体的な例には、窒素、酸素、硫黄、リン、ホウ素、ケイ素、セレン及びテルル、特に窒素、酸素及び硫黄が含まれる。

【００６７】

“ヘテロシクリル”という用語は、単独又は合成語として用いられるときには、単環式、多環式、縮合又は共役炭化水素残基、好ましくはC_{3-20}（例えばC_{3-10}又はC_{3-8}）のいずれかを含み、ここで1つ以上の炭素原子はヘテロ原子によって置き換えられて非芳香族残基を提供する。適切なヘテロ原子にはO、N、S、P及びSe、特にO、N及びSが含まれる。2つ以上の炭素原子が置き換えられる場合には、2つ以上の同じヘテロ原子によって、又は異なるヘテロ原子によって置き換えられ得る。ヘテロシクリル基は飽和されていても部分的に不飽和であってもよい（すなわち1つ以上の二重結合を有する）。特に好ましいヘテロシクリルは5－6員及び9－10員ヘテロシクリルである。ヘテロシクリル基の適切な例には

以下が含まれ得る：アジリジニル、オキシラニル、チエラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、2H-ピロリル、ピロリジニル、ピロリニル、ピペリジル、ピペラジニル、モルフォリニル、インドリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、チオモルフォリニル、ジオキサニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピロリル、テトラヒドロチオフェニル、ピラゾリニル、ジオキサラニル、チアゾリジニル、イソキサゾリジニル、ジヒドロピラニル、オキサジニル、チアジニル、チオモルフォリニル、オキサチアニル、ジチアニル、トリオキサニル、チアジアジニル、ジチアジニル、トリチアニル、アゼピニル、オキセピニル、チエピニル、インデニル、インダニル、3H-インドリル、イソインドリニル、4H-キノラジニル、クロメニル、クロマニル、イソクロマニル、ピラニル及びジヒドロピラニル。ヘテロシクリル基は、本明細書で定義する1つ以上の随意の置換基によって任意的に置換され得る。“ヘテロシクリレン”という用語はヘテロシクリルの二価形を指すことが意図される。

“ヘテロアリール”という用語は、単環式、多環式、縮合又は共役炭化水素残基のいずれかを含み、ここで1つ以上の炭素原子はヘテロ原子によって置き換えられて芳香族残基を提供する。好ましいヘテロアリールは3－20の還原子、例えば3－10の環原子を有する。特に好ましいヘテロアリールは5－6及び9－10員の二環式環系である。適切なヘテロ原子にはO、N、S、P及びSe、特にO、N及びSが含まれる。2つ以上の炭素原子が置き換えられる場合には、2つ以上の同じヘテロ原子によって、又は異なるヘテロ原子によって置き換えられ得る。ヘテロアリール基の適切な例には以下が含まれ得る：ピリジル、ピロリル、チエニル、イミダゾリル、フラニル、ベンゾチエニル、イソベンゾチエニル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、インドリル、イソインドリル、ピラゾリル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリジニル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、1,5-ナフチリジニル、キノザリニル、キナゾリニル、キノリニル、オキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、トリアゾリル、オキサジアゾリル、オキサトリアゾリル、トリアジニル及びフラザニル。ヘテロアリール基は、本明細書で定義する1つ以上の随意の置換基によって任意的に置換され得る。“ヘテロアリーレン”という用語はヘテロアリールの二価形を指すことが意図される。

【００６８】

“アシル”という用語は、単独で又は合成語でC=O部分を含む基を指す（カルボン酸、エステル又はアミドではない）。好ましいアシルにはC(O)-R^eが含まれ、ここでR^eは水素又はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、カルボシクリル若しくはヘテロシクリル残基である。アシルの例には以下が含まれる：ホルミル、直鎖若しくは分枝アルカノイル（例えばC_{1-20}）、例えばアセチル、プロパノイル、ブタノイル、2-メチルプロパノイル、ペンタノイル、2,2-ジメチルプロパノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、ヘプタデカノイル、オクタデカノイル、ノナデカノイル及びイコサノイル；シクロアルキルカルボニル、例えばシクロプロピルカルボニル、シクロブリツカルボニル、シクロペンチルカルボニル及びシクロヘキシルカルボニル；アロイル、例えばベンゾイル、トルオイル及びナフトイル；アラルカノイル、例えばフェニルアルカノイル（例えばフェニルアセチル、フェニルプロパノイル、フェニルブタノイル、フェニルイソブチリル、フェニルペンタノイル及びフェニルヘキサノイル）及びナフチルアルカノイル（例えばナフチルアセチル、ナフチルプロパノイル及びナフチルブタノイル）；アラルケノイル、例えばフェニルアルケノイル（例えばフェニルプロペノイル、フェニルブテノイル、フェニルメタクリロイル、フェニルペンテノイル及びフェニルヘキセノイル）、及びナフチルアルケノイル（例えばナフチルプロペノイル、ナフチルブテノイル及びナフチルペンテノイル）；アリールオキシアルカノイル、例えばフェノキシアセチル及びフェノキシプロピオニル；アリールオキシアルカノイル、例えばフェノキシアセチル及びフェノキシプロピオニル；アリールチオカルバモイル、例えばフェニルチオカルバモイル；アリールグリオキシロイル、例えばフェニルグリオキシロイル及びナフチルグリオキシロイル；アリールスルホニル、例えばフェニ

ルスルホニル及びナフチルスルホニル；ヘテロシクリックカルボニル；ヘテロシクリックアルカノイル、例えばチエニルアセチル、チエニルプロパノイル、チエニルブタノイル、チエニルペンタノイル、チエニルヘキサノイル、チアゾリルアセチル、チアジアゾリルアセチル及びテトラゾリルアセチル；ヘテロシクリックアルケノイル、例えばヘテロシクリックプロペノイル、ヘテロシクリックブテノイル、ヘテロシクリックペンテノイル及びヘテロシクリックヘキセノイル；並びにヘテロシクリックグリオキシロイル、例えばチアゾリグリオキシロイル及びチエニルグリオキシロイル。R^e残基は、本明細書に記載するように任意的に置換され得る。

【００６９】

“スルホキシド”という用語は単独で又は合成語で$S(O)R^f$基を指し、式中、R^fは、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、カルボシクリル、及びアラルキルから選択される。好ましいR^fの例には、C_{1-20}アルキル、フェニル及びベンジルが含まれる。

“スルホニル”という用語は単独で又は合成語で$S(O)_2$-R^f基を指し、式中、R^fは、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、カルボシクリル、及びアラルキルから選択される。好ましいR^fの例には、C_{1-20}アルキル、フェニル及びベンジルが含まれる。

“スルホンアミド”という用語は単独で又は合成語で$S(O)NR^fR^f$基を指し、式中、各R^fは、それぞれ独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、カルボシクリル、及びアラルキルから選択される。好ましいR^fの例には、C_{1-20}アルキル、フェニル及びベンジルが含まれる。ある実施態様では、少なくとも1つのR^fは水素である。別の実施態様では、両方のR^fが水素である。

“アミノ”という用語は本明細書では当業界で理解されるそのもっとも広い意味で用いられ、式NR^aR^bの基を含む。前記式中、R^a及びR^bは、それぞれ独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、カルボシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリールアルキル及びアシルから選択される。或いはまたR^a及びR^bは、それらに結合する窒素と一緒になって単環式又は多環式環系、例えば3－10員環、特に5－6及び9－10員系を形成できる。“アミノ”の例には以下が含まれる：NH_2、NHアルキル（例えばC_{1-20}アルキル）、NHアリール（例えばNHフェニル）、NHアラルキル（例えばNHベンジル）、NHアシル（例えば$NHC(O)C_{1-20}$アルキル、NHC(O)フェニル）、Nアルキルアルキル（各アルキル（例えばC_{1-20}）は同じでも異なっていてもよい）及び5又は6員環（場合によって1つ以上の同じ又は異なるヘテロ原子（例えばO、N及びS）を含む）。

【００７０】

“アミド”という用語は本明細書では当業界で理解されるそのもっとも広い意味で用いられ、式$C(O)NR^aR^b$の基を含む（式中、R^a及びR^bは上記のように定義される）。アミドの例には以下が含まれる：$C(O)NH_2$、C(O)NHアルキル（例えばC_{1-20}アルキル）、C(O)NHアリール（例えばC(O)NHフェニル）、C(O)NHアラルキル（例えばC(O)NHベンジル）、C(O)NHアシル（例えば$C(O)NHC(O)C_{1-20}$アルキル、C(O)NHC(O)フェニル）、C(O)Nアルキルアルキル（各アルキル（例えばC_{1-20}）は同じでも異なっていてもよい）及び5又は6員環（場合によって1つ以上の同じ又は異なるヘテロ原子（例えばO、N及びS）を含む）。

“カルボキシエステル”という用語は本明細書では当業界で理解されるそのもっとも広い意味で用いられ、式CO_2R^gの基を含む。前記式中、R^gは、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、カルボシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アラルキル、及びアシルを含む基から選択できる。カルボキシエステルの例には、CO_2C_{1-20}アルキル、CO_2アリール（例えばCO_2フェニル）、CO_2アラルキル（例えばCO_2ベンジル）が含まれる。

本明細書で用いられるように、“アリールオキシ”という用語は酸素架橋を介して結合する“アリール”基を指す。アリールオキシ置換基の例にはフェノキシ、ビフェニルオキシ、ナフチルオキシなどが含まれる。

本明細書で用いられるように、“アシルオキシ”という用語は、酸素原子を介して“アシル”基が続いて結合した“アシル”基を指す。“アシルオキシ”の例には、ヘキシルカ

ルボニルオキシ（ヘプタノイルオキシ）、シクロペンチルカルボニルオキシ、ベンゾイルオキシ、4-クロロベンゾイルオキシ、デシルカルボニルオキシ（ウンデカノイルオキシ）、プロピルカルボニルオキシ（ブタノイルオキシ）、オクチルカルボニルオキシ（ノナノイルオキシ）、ビフェニルカルボニルオキシ（例えば4-フェニルベンゾイルオキシ）、ナフチルカルボニルオキシ（例えば1-ナフトイルオキシ）などが含まれる。

本明細書で用いられるように、“アルキルオキシカルボニル”という用語は、カルボニル基を介して結合した“アルキルオキシ”基を指す。“アルキルオキシカルボニル”基の例にはブチルホルメート、sec-ブチルホルメート、ヘキシルホルメート、オクチルホルメート、デシルホルメート、シクロペンチルホルメートなどが含まれる。

本明細書で用いられるように、“アリールアルキル”という用語は、芳香環で置換された直鎖又は分枝鎖アルカンから形成される基を指す。アリールアルキルの例にはフェニルメチル（ベンジル）、フェニルエチル及びフェニルプロピルが含まれる。

本明細書で用いられるように、“アルキルアリール”という用語は、直鎖又は分枝アルカンで置換されたアリール基から形成される基を指す。アルキルアリールの例にはメチルフェニル及びイソプロピルフェニルが含まれる。

【００７１】

本明細書では、“任意的に置換されていてもよい”は、ある基が1つ、2つ、3つ又は4つ以上の有機及び無機基で置換又は縮合される（それによって縮合多環式基を形成する）ことがあるか又はそのようなことがないことを意味するために用いられる。前記有機又は無機基には以下から選択される基が含まれる：アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アシル、アラルキル、アルカリル、アルクヘテロシクリル、アルクヘテロアリール、アルクカルボニル、ハロ、ハロアルキル、ハロアルケニル、ハロアルキニル、ハロアリール、ハロカルボシクリル、ハロヘテロシクリル、ハロヘテロアリール、ハロアシル、ハロアラルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルケニル、ヒドロキシアルキニル、ヒドロキシカルボシクリル、ヒドロキシアリール、ヒドロキシヘテロシクリル、ヒドロキシヘテロアリール、ヒドロキシアシル、ヒドロキシアラルキル、アルコキシアルキル、アルコキシアルケニル、アルコキシアルキニル、アルコキシカルボシクリル、アルコキシアリール、アルコキシヘテロシクリル、アルコキシヘテロアリール、アルコキシアシル、アルコキシアラルキル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、アラルキルオキシ、ヘテロアリールオキシ、ヘテロシクリルオキシ、アシルオキシ、ハロアルコキシ、ハロアルケニルオキシ、ハロアルキニルオキシ、ハロアリールオキシ、ハロカルボシクリルオキシ、ハロアラルキルオキシ、ハロヘテロアリールオキシ、ハロヘテロシクリルオキシ、ハロアシルオキシ、ニトロ、ニトロアルキル、ニトロアルケニル、ニトロアルキニル、ニトロアリール、ニトロヘテロシクリル、ニトロヘテロアリール、ニトロカルボシクリル、ニトロアシル、ニトロアラルキル、アミノ（NH_2）、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、アラルキルアミノ、ジアラルキルアミノ、アシルアミノ、ジアシルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、ヘテロアリールアミノ、カルボキシ、カルボキシエステル、アミド、アルキルスルホニルオキシ、アリールスルフェニルオキシ、アルキルスルフェニル、アリールスルフェニル、チオ、アルキルチオ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、アリールチオ、アラルキルチオ、カルボシクリルチオ、ヘテロシクリルチオ、ヘテロアリールチオ、アシルチオ、スルホキシド、スルホニル、スルホンアミド、アミノアルキル、アミノアルケニル、アミノアルキニル、アミノカルボシクリル、アミノアリール、アミノヘテロシクリル、アミノヘテロアリール、アミノアシル、アミノアラルキル、チオアルキル、チオアルケニル、チオアルキニル、チオカルボシクリル、チオアリール、チオヘテロシクリル、チオヘテロアリール、チオアシル、チオアラルキル、カルボキシアルキル、カルボキシアルケニル、カルボキシアルキニル、カルボキシカルボシクリル、カルボキシアリール、カルボキシヘテロシクリル、カルボキシヘテロアリール、カルボキシアシル、カルボキシアラルキル、カルボキシエステルアルキル、カルボキシエステルアルケニル、カルボキシエステルアルキニ

ル、カルボキシエステルカルボシクリル、カルボキシエステルアリール、カルボキシエステルヘテロシクリル、カルボキシエステルヘテロアリール、カルボキシエステルアシル、カルボキシエステルアラルキル、アミドアルキル、アミドアルケニル、アミドアルキニル、アミドカルボシクリル、アミドアリール、アミドヘテロシクリル、アミドヘテロアリール、アミドアシル、アミドアラルキル、ホルミルアルキル、ホルミルアルケニル、ホルミルアルキニル、ホルミルカルボシクリル、ホルミルアリール、ホルミルヘテロシクリル、ホルミルヘテロアリール、ホルミルアシル、ホルミルアラルキル、アシルアルキル、アシルアルケニル、アシルアルキニル、アシルカルボシクリル、アシルアリール、アシルヘテロシクリル、アシルヘテロアリール、アシルアシル、アシルアラルキル、スルホキシドアルキル、スルホキシドアルケニル、スルホキシドアルキニル、スルホキシドカルボシクリル、スルホキシドアリール、スルホキシドヘテロシクリル、スルホキシドヘテロアリール、スルホキシドアシル、スルホキシドアラルキル、スルホニルアルキル、スルホニルアルケニル、スルホニルアルキニル、スルホニルカルボシクリル、スルホニルアリール、スルホニルヘテロシクリル、スルホニルヘテロアリール、スルホニルアシル、スルホニルアラルキル、スルホンアミドアルキル、スルホンアミドアルケニル、スルホンアミドアルキニル、スルホンアミドカルボシクリル、スルホンアミドアリール、スルホンアミドヘテロシクリル、スルホンアミドヘテロアリール、スルホンアミドアシル、スルホンアミドアラルキル、ニトロアルキル、ニトロアルケニル、ニトロアルキニル、ニトロカルボシクリル、ニトロアリール、ニトロヘテロシクリル、ニトロヘテロアリール、ニトロアシル、ニトロアラルキル、シアノ、スルフェート、ホスフェート、トリアリールメチル、トリアリールアミノ、オキサジアゾール、及びカルバゾール基。場合によって実施される（随意の）置換はまた、鎖又は環の-CH_2-基が、-O-、-S-、-NR^a-、-C(O)-（すなわちカルボニル）、-C(O)O-（すなわちエステル）、及び-C(O)NR^a-（すなわちアミド）から選択される基によって置き換えられる場合を指すためにも用いられ得る（前記式中、R^aは本明細書で定義したとおりである）。

【００７２】

好ましい任意的置換基には以下が含まれる：アルキル（例えばC_{1-6}アルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル又はシクロヘキシル）、ヒドロキシアルキル（例えばヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシプロピル）、アルコキシアルキル（例えばメトキシメチル、メトキシエチル、メトキシプロピル、エトキシメチル、エトキシエチル、エトキシプロピルなど）、アルコキシ（例えばC_{1-6}アルコキシ、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、シクロプロポキシ、シクロブトキシ）、ハロ、トリフルオロメチル、、トリクロロメチル、トリブロモメチル、ヒドロキシ、フェニル（前記はそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロ$OC(O)C_{1-6}$アルキル及びアミノで置換され得る）、ベンジル（ここでベンジルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロ、$OC(O)C_{1-6}$アルキル及びアミノで置換され得る）、フェノキシ（ここでフェニルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロ$OC(O)C_{1-6}$アルキル及びアミノで置換され得る）、ベンジルオキシ（ここでベンジルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロ$OC(O)C_{1-6}$アルキル及びアミノで置換され得る）、アミノ、アルキルアミノ（例えばC_{1-6}アルキル、例えばメチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノなど）、ジアルキルアミノ（例えばC_{1-6}アルキル、例えばジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ）、アシルアミノ（例えば$NHC(O)CH_3$）、フェニルアミノ（ここでフェニルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロ$OC(O)C_{1-6}$アルキル及びアミノで置換され得る）、ニトロ、ホルミル、-C(O)-アルキル（例えばC_{1-6}アルキル、例えばアセチル）、O-C(O)-アルキル（例えばC_{1-6}アルキル、例えば

アセチルオキシ）、ベンゾイル（ここでフェニル基はそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロOC(O)C_{1-6}アルキル及びアミノで置換され得る）、CH_2のC=O、CO_2H、CO_2アルキル（例えばC_{1-6}アルキル、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル）による置き換え、CO_2フェニル（ここでフェニルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロOC(O)C_{1-6}アルキル及びアミノで置換され得る）、$CONH_2$、CONHフェニル（ここでフェニルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロOC(O)C_{1-6}アルキル及びアミノで置換され得る）、CONHベンジル（ここでベンジルはそれ自体さらに例えばC_{1-6}アルキル、ハロ、ヒドロキシ、ヒドロキシC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシ、ハロC_{1-6}アルキル、シアノ、ニトロOC(O)C_{1-6}アルキル及びアミノで置換され得る）、CONHアルキル（例えばC_{1-6}アルキル、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルアミド）、CONHジアルキル（例えばC_{1-6}アルキル）、アミノアルキル（例えばHNC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルキルHN-C_{1-6}アルキル-、及び(C_{1-6}アルキル)$_2$N-C_{1-6}アルキル-）、チオアルキル（例えばHSC_{1-6}アルキル-）、カルボキシアルキル（例えばHO_2C C_{1-6}アルキル-）、カルボキシエステルアルキル（例えばC_{1-6}アルキルO_2CC_{1-6}アルキル-）、アミドアルキル（例えば$H_2N(O)CC_{1-6}$アルキル-、H(C_{1-6}アルキル)N(O)CC_{1-6}アルキル-）、ホルミルアルキル（例えば$OHCC_{1-6}$アルキル-）、アシルアルキル（例えばC_{1-6}アルキル(O)CC_{1-6}アルキル-）、ニトロアルキル（例えばO_2NC_{1-6}アルキル-）、スルホキシデアルキル（例えばR(O)SC_{1-6}アルキル、例えばC_{1-6}アルキル(O)SC_{1-6}アルキル-）、スルホニルアルキル（例えばR(O)$_2SC_{1-6}$アルキル-、例えばC_{1-6}アルキル(O)$_2SC_{1-6}$アルキル-）、スルホンアミドアルキル（例えば$_2$HRN(O)SC_{1-6}アルキル、H(C_{1-6}アルキル)N(O)SC_{1-6}アルキル-）、トリアリールメチル、トリアリールアミノ、オキサジアゾール、及びカルバゾール。

下記の非限定的実施例を参照しながら本発明をこれから説明するであろう。

【実施例】

【００７３】

材料と方法

株及び増殖条件

野生型C.アルビカンスDAY185（ura3Δ::λimm434/ura3-Δ::λimm434, ARG4:URA3:arg4::hisG/arg4::hisG his1::hisG::pHIS1/his1::hisG）及び黄色ブドウ球菌ATCC25923を、C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性バイオフィルムのモデル微生物として用いた。両株は周知の単一微生物性バイオフィルム形成微生物である。C.アルビカンスbgl2ホモ接合変異株は、Arron Mitchell博士の研究室で作製された細胞壁変異体ライブラリーから得た。BGL2遺伝子は1,3-ベータ-グルコシルトランスフェラーゼ（Bgl2p）をコードする。C.アルビカンスのBgl2の欠損は、バイオフィルムマトリックスにおける1,3-ベータ-グルカンレベルの低迷をもたらす。株は-80℃の15%（v/v）グリセロールで保存し、作業用ストックとして栄養寒天プレート（NA、Oxoid（黄色ブドウ球菌用））又はYPDプレート（2%ペプトン、1%酵母抽出物、2%グルコース、80mg/Lウリジン（黄色ブドウ球菌用））で線培養した。前記作業用ストックは4℃（黄色ブドウ球菌）又は室温（C.アルビカンス）で保存し、2週間毎に交換した。

抗微生物剤

以下の4つの第一線抗生物質及び3つの抗真菌薬をこれらの実施例で用いた：抗スタフィロコッカス剤は、オキサシリン（β-ラクタム）、バンコマイシン（グリコペプチド）、シプロフロキサシン（フルオロキノロン）、リファンピシン（リファマイシン）を含み、抗カンジダ剤は、フルコナゾール（アゾール）、アンホテリシンB（ポリエン）及びカスポファンギン（エキノキャンディン）を含んでいた。カスポファンギンを除く全薬剤をシグマ-アルドリッチ社（Sigma-Aldrich, Sydney, Australia）から購入した。カスポファンギンはメルク社（Merck & Co.）から入手した。2つのグアニル化ポリメタクリレート（

PG3（含有物50% MMA及び50% 2-GEMA）及びPG4（32% MMA及び68% 2-GEMA)と称する）のストック溶液は文献（Polymer Chemistry 2014, 5, 5813-5822）に記載されたように蒸留水で調製した。

バイオフィルムのアッセイ及び定量

細菌性、真菌性及び多重微生物性バイオフィルム培養を、定量目的のために96ウェルマイクロプレートで、さらに顕微鏡検査のためにシリコンディスク上で実施した。簡単に記せば、細菌及び真菌の一晩培養を栄養ブロス（NB）及びYPDブロスでそれぞれ増殖させ、さらに増殖培地（RPMI-1640）に1x10^6CFU/mLの細胞密度で希釈した。前記希釈細菌及び/又は真菌懸濁物の100μLを、平底96ウェルの組織培養処理ポリスチレン（TCPS）マイクロプレートの各ウェルにピペットで加え、穏かに撹拌（75rpm）しながら37℃で24時間インキュベートした。インキュベーション後、前記懸濁物を吸引し、マイクロウェルをウェル当たり110μLのPBSで2回洗浄して非付着性細胞を除去した。バイオフィルムの生物体量を定量的に査定するために、バイオフィルムを含むマイクロプレートを60℃オーブンで1時間熱固定し、続いて1%（w/v）のクリスタルバイオレット（CV）で10分間染色した。続いてウェル中のCV溶液を廃棄し、マイクロプレートを4回洗浄して過剰な染色液を除去した。95%エタノール＋5%酢酸の200μLを各ウェルに加え、マイクロプレートを室温で15分間インキュベートした。各ウェルから前記溶液の100μLを新しいマイクロプレートに移した。形成されたバイオフィルムの量は、Tecan Infinite M200プレートリーダーを用い600nmで光学密度を読み取ることによって決定した。また別には、マイクロウェルをPBSで洗浄して非付着性細胞を除去した後、100μLのPBSを各ウェルに加え、無菌的ピペットチップでバイオフィルムを破砕した。続いて、バイオフィルムを含むマイクロプレートを音波処理浴（42kHz）で10分間音波処理した。続いて、マイクロウェルの底を再度破砕し当該ウェルの中身をエッペンドルフチューブに移し、30秒（最大速度）で4回ボルテックスした。続いて前記懸濁物を連続希釈し、トリプチカーゼ大豆寒天（TSA）＋アンホテリシンB（2.5mg/L）プレート（黄色ブドウ球菌を選別するため）又はYPD＋バンコマイシン（2mg/L）プレート（C.アルビカンスを選別するため）にプレートして、当該バイオフィルム中のそれぞれの種の細胞数を決定した。

【００７４】

バイオフィルムの顕微鏡検査

細菌性、真菌性及び多重微生物性バイオフィルム培養を顕微鏡検査目的のためにシリコンディスクで実施した。無菌的シリコンディスクを成牛血清で予め一晩被覆した後で、RPMI-1640中に懸濁させた黄色ブドウ球菌及び/又はC.アルビカンス（それぞれの微生物約10^{6}CFU/mL）の1mLを含む24ウェルマイクロプレートの各ウェルに移し、その後37℃で一晩インキュベートした。続いて、前記シリコンディスクを0.9%食塩水で洗浄して浮遊性微生物を除去した。走査電子顕微鏡検査（SEM）のために、グルタルアルデヒド（2.5%、v/v）及び1%四酸化オスミウムを用いバイオフィルムを室温で固定し、徐々に濃度を高めたエタノール及びヘキサメチルジシラザン（HMDS）で脱水した。サンプルをBalzers SCD005スパッタ被覆装置で金被覆し、日立S570走査電子顕微鏡で観察した。共焦点レーザー走査顕微鏡（CLSM）のためには、抗微生物剤に暴露した後で、バイオフィルムをBacLight生細胞/死細胞生存性キット（BacLight Live/Dead Viability kit, L7007, Invitrogen）で37℃、30分間暗所で染色した。0.9%食塩水で2回洗浄後、直ちにバイオフィルムの構造を調べた。同時二重波長励起に伴う人工産物を最小限にするために、全サンプルを連続的にフレームずつ初めに488nm、続いて561nmでスキャンした。全ての画像化実験で63倍の油浸対物レンズを用いた。

浮遊性細胞の抗微生物剤感受性試験

CLSIガイドラインM07-A9（黄色ブドウ球菌用）及びM27-A3（C.カンジダ用）のブロスマイクロ希釈法を用いて、抗菌及び抗真菌剤の最小阻止濃度（MIC）を決定したが、ただしMuller-Hintonブロスを抗菌剤MIC試験用RPMI-1640に置き換えた。RPMI-1640で調製した2倍連続希釈薬剤の100μLを96ウェルマイクロプレートのウェルに添加した。指数関数的に増殖させた培養をRPMI-1640で、C.アルビカンスについては約1x10^3CFU/mL、黄色ブドウ球

菌については約1ｘ10^6CFU/mLの密度に希釈し、100μLを各ウェルに添加した。マイクロプレートを35℃で黄色ブドウ球菌については18時間、C.アルビカンスについては48時間インキュベートした。細菌及び真菌の増殖をミラーリーダーで補助しながら肉眼で調べた。抗菌剤のMICは、完全な増殖阻害を生じる最低濃度と定義した。抗真菌剤のMICは、アンホテリシンB又はポリマーについては識別可能な増殖を妨げる最低濃度として、フルコナゾール及びカスポファンギンについては真菌の増殖の少なくとも50%を阻害する最低濃度として（前記はCLSI M27-A3プロトコルの0又は2のスコアに対応する）判定した。

【００７５】

バイオフィルム細胞の抗微生物剤感受性試験

黄色ブドウ球菌又はC.アルビカンスの単一性バイオフィルムを上述のように96ウェルマイクロプレートで生成した。一晩インキュベートした後、細胞懸濁物を吸引し、ウェルを100μL PBS/ウェルで2回洗浄して非付着性細胞を除去した。200μLの抗微生物剤を各ウェルに添加し、この処理を黄色ブドウ球菌については18時間、C.アルビカンスについては48時間続けた。前記処理の後、懸濁物を除去し、マイクロウェルをPBSで2回洗浄した。200μLの2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-5-[(フェニルアミノ)カルボニル]-2H-テトラゾリウムヒドロキシド（XTT、0.5mg/L）溶液を各ウェルに添加し、マイクロプレートを37℃で2時間、暗所でインキュベートした。100μLのXTT溶液を新しいマイクロプレートに移し、OD_{492}で判定した。また別に、バイオフィルムに対する抗微生物剤の有効性は抗微生物剤への暴露後の生存数の減少を基準に決定した。抗微生物剤を含まない培養（無薬剤バイオフィルムの細胞密度）に対する生存細胞（抗微生物剤処理後の細胞密度）（ｘ100）を計算した。

多重微生物性浮遊培養及びバイオフィルムに対する抗微生物剤組合せの効果

多重微生物性バイオフィルムに対する通常的抗微生物剤組合せの有効性を決定するために、100μLの体積の単独RPMI-1640又は1つの抗スタフィロコッカス剤及び1つの抗カンジダ剤を含むRPMI-1640（合計12の組合せ）を定着多重微生物性バイオフィルムに添加した（表1）。抗微生物剤の濃度は、筋肉内、静脈内又は経口用調製物について最高の血清達成濃度を基準に選択した（表1参照）。カスポファンギンのC.アルビカンス殺滅及び阻害におけるパラドックス的作用を回避するために、この薬剤については最高血清達成濃度の12mg/Lを入れ換えて4mg/Lの濃度を用い、その抗真菌有効性を担保した。定着多重微生物性バイオフィルムを抗微生物剤溶液又は単独RPMI-1640とともに35℃でインキュベートした後、当該溶液をウェルから吸引し、バイオフィルムを3回PBSで洗浄した。バイオフィルムの生存細胞の定量は、以前に記載されたように生存計測方法によって実施した。抗微生物剤処理ウェルと無処理ウェルの細胞数における差を用いて、多重微生物性バイオフィルムに対する抗微生物剤組合せの有効性を算出した。並行して、黄色ブドウ球菌（1ｘ10^6CFU/mL）及びC.アルビカンス（1ｘ10^6CFU/mL）の浮遊性多重微生物培養を調製し、同じセットの抗微生物剤組合せで処理した。浮遊性培養とバイオフィルムとの間で公正な比較を提供するため、これらの微生物について1ｘ10^6CFU/mLの密度を選択し、これにより各々の種の同じ接種材料を同じ量の抗微生物剤でチャレンジされる。

【００７６】

表1：試験で用いた抗微生物剤の組合せ及びそれらの濃度*

抗生物質(mg/L)	抗真菌剤(mg/L)		
＋	フルコナゾール	アンホテリシンB	カスポファンギン
オキサシリン (16)	(8)	(2)	(4)
バンコマイシン(40)	(8)	(2)	(4)
シプロフロキサシ(4.5)	(8)	(2)	(4)
リファンピシン(10)	(8)	(2)	(4)

*：最高血清達成濃度は、抗生物質についてはManual of Clinical Microbiology（第10版）で、フルコナゾールについてはBrammerらの論文（Brammer et al., 1990）[59]で、アン

ホテリシンBについてはClinical Infectious Diseases: A Practical Approach（389ページ）に記載された。カスポファンギンについては、最高血清達成濃度の12mg/Lを入れ換えて4mg/Lの濃度を用い、そのパラドックス的作用を回避した。

【００７７】

バイオフィルムマトリックスの単離

文献（PLoS pathogens 2012, 8:e1002848）に報告された方法にしたがって、細胞外マトリックスをカンジダ又は多重微生物性バイオフィルムから単離した。6ウェルのTCPSマイクロプレートで培養を48時間37℃で増殖させることによって、バイオフィルムを定着させた。各ウェルから上清を注意して除去し、バイオフィルムを無菌的蒸留水で1回洗浄した。1mLの蒸留水を各ウェルに添加し、細胞スクレーパーを用いてバイオフィルムを取り出した。前記工程を3回繰り返した。続いて、除去したバイオフィルムを含む懸濁物を50mLのファルコンチューブに移し、ブランソンソニケーターで10分間音波処理した（一定のデューティサイクル、出力20%）。懸濁物を最高速度で2分間ボルテックスし（4x30秒）、その後で6000rpmで15分間遠心分離した（5回）。細胞外マトリックスを含む懸濁物を取り出し、-20℃で保存した。TSAプレートで再増殖試験を実施し、前記バイオフィルムが生存性細胞を含まないことを実証した。

C.アルビカンス及び多重微生物性バイオフィルムマトリックスがグアニル化ポリメタクリレートポリマーを封鎖するか否かを決定するために、浮遊性細胞の抗微生物剤感受性試験でC.アルビカンス/黄色ブドウ球菌を接種する前に、単離したマトリックス素材をポリマー及び増殖培地とともに96ウェルプレートで2時間インキュベートした。結果を同時に実施した標準的感受性試験の結果と比較した。フルコナゾールをC.アルビカンスバイオフィルムマトリックスによる抗微生物活性減弱を示す陽性コントロールとして用いた。C.アルビカンスバイオフィルムマトリックス素材をまたRPMI-1640への補充物質として用い、黄色ブドウ球菌バイオフィルム増殖に対するC.アルビカンスバイオフィルムマトリックスの影響を査定した。

並行して、野生型DAY185及びbgl2ΔΔ変異株で予め一晩形成したC.アルビカンスバイオフィルムを、サブバイオフィルムMIC（32mg/L）でPG3及びPG4に、又はポリマー無し増殖培地に24時間暴露した。C.アルビカンスDAY185及びbgl2ΔΔ変異株はバイオフィルム構造が相違し、bgl2ΔΔ変異株は細胞外マトリックス中により少ないβ-1,3グルカンを含むバイオフィルムを形成する。生存性計測を実施した。バイオフィルムに対するポリマーの有効性は、ポリマー無し増殖培地に暴露したバイオフィルムのCFUで割ったポリマー処理バイオフィルムのCFUとして算出した。野生型及び変異体バイオフィルムに対するポリマーの有効性の相違は、バイオフィルムマトリックス素材によるポリマーの可能な封鎖性を反映する。

【００７８】

遺伝子発現分析

C.アルビカンスバイオフィルムを6ウェルのマイクロプレートでRPMI-1640により24時間増殖させ、バイオフィルム細胞を収集した。ホットフェノール法を用いてRNAを抽出し、DNaseI（Ambion）で全RNAを処理して夾雑DNAを除去した。800ngのカンジダ全RNAを200ngの哺乳動物全RNA（コントロールのスパイクとして）とともに用いて、Superscript III（Invitrogen）により逆転写を実施した。ロシュ社（Roche）のライトサイクラーLC480リアルタイムPCR系でファストスタートユニバーサルSybrグリーンマスター（Fast-Start universal Sybr Green Master（Roche））を用い定量的PCRを実施し、絶対的定量によって分析した。転写物の発現レベルは、まず初めにコントロールの哺乳動物GAPDHスパイクにより、続いてC.アルビカンスのSCR1遺伝子コントロールにより標準化した。4つから8つの生物学的複製物を用い、その各々について2つの技術的複製物を用いた。この実験に用いた全てのqPCRプライマーの配列を下記の表S1に示す。

【００７９】

表S1：定量的PCRに使用したプライマー

プライマー	配列(5’-3’)
mGAPDH	F: CTTTGTCAAGCTCATTTCCTG R: GCCATGAGGTCCACCACC
SCR1	F:TTTAGCATAACCACTGGAGGGAAGC R:GAGTTGCAACACTAGATACCGCACT
BGL2/orf19.4565	F: GCTGCTGAAGCTGAAGGATT R: GTGGAGACGGAAATCTTTGG
ALS1/orf19.5741	F: ACCAATCCAGTTCCAACTGTGGCA R: TGGATGCTGATTCATGAGAACCGCT
ALS3/orf19.1816	F: ACTTCCACAGCTGCTTCCACTTCT R: TCCACGGAACCGGTTGTTGCT
HWP1/orf19.1321	F: AATCCTCCTCAACCTGATCAGCCTG R: AGCTGGAGTTGTTGGCTTTTCTGGA
EAP1/orf19.1401	F: TGCCCCAGGTACTGAAACCACTC R: AGTGCCTGGGATAACGGGTTGAG
BCR1/orf19.723	F: TACCTCCATTGCCACCAATACCTGC R: AGTGGTGGCTGTCCATGTTGTTGT

【００８０】

カテーテルロック溶液としてのポリマーの有効性試験

カテーテル抗菌薬ロックに続いて再増殖アッセイを実施して、多重微生物性バイオフィルムに対するカテーテルロック溶液（CLS）として本発明にしたがって用いられるポリマー及びエタノールの有効性を試験した。24時間予め形成させた96ウェルマイクロプレートのバイオフィルムを抗微生物剤に18時間暴露した。前記抗微生物剤は、10%から80%の範囲の濃度のエタノール及びPG3及びPG4と称する本発明のポリマー（64－1024mg/L）を含む。バイオフィルムを食塩水で3回洗浄し、残留する抗微生物剤を除去した。続いて、200μLの体積のTSBを各ウェルに添加し、マイクロプレートをさらに48時間35℃でインキュベートした。マイクロプレートシェーカー（速度2）（Titreteck, Flow laboratories, Germany）を用いてバイオフィルムの残存する一切の生細胞の増殖及び遊離を促進した。48時間後、マイクロプレートの各ウェルの内容物150μLをU底マイクロプレートに移し、濁度を肉眼で調べた。清澄ウェルに該当する抗微生物剤の最低濃度を、CLSとして良好に使用される最低バイオフィルム根絶濃度（MBEC）と定義した。

統計分析

C.アルビカンス/黄色ブドウ球菌によって形成されるバイオフィルムの細胞数の相違を分析するために、データを常用対数様式に変換し、ウインドウズ用Minitab 16を用いて一元配置分散分析試験を有意差レベル0.05（p値）で実施した。

【００８１】

結果

多重微生物性バイオフィルムの発育におけるC.アルビカンスバイオフィルムマトリックスの役割

多重微生物性バイオフィルムにおける黄色ブドウ球菌とC.アルビカンスとの結びつきは以前に報告された。増殖条件及び株の経歴が、バイオフィルム実験（多重微生物性C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成を含む）に主要な影響を与えることが知られている。本明細書で概略する実験条件下で形成された多重微生物性バイオフィルムは、したがってC.アルビカンスと黄色ブドウ球菌との強い結びつきを実証するために評価された。成牛血清で被覆した生体医療用シリコーン上に形成されたバイオフィルムの高解像SEM画像化は、黄色ブドウ球菌は単独ではこれらの条件下で貧弱なバイオフィルムしか形成できないが、C.アルビカンスと同時にインキュベートするとき、これら2つの種は密集し

た多重微生物性バイオフィルムへと増殖することを示した（図2A及びB並びに図S1A）。半定量性CV系バイオフィルム測定は、多重微生物性バイオフィルムの生物体量は単一性バイオフィルムの合計よりも大きいことを示した（図S1B）。黄色ブドウ球菌の細胞数は、多重微生物性バイオフィルムで増殖したとき、単一性バイオフィルムでの細胞数と比較して約2倍に増加し、一方、C.アルビカンス細胞の数は同じ数を維持した（表S1）。これらの多重微生物性バイオフィルムの特徴は以前のデータと一致し、本明細書で概略した実験条件下での激しい多重微生物性バイオフィルムの増殖を示している。黄色ブドウ球菌の存在は、多重微生物性バイオフィルムをいっそうせん断力（洗浄）耐性にし、C.アルビカンス単一性バイオフィルムと比較して、バイオフィルムのマイクロタイタープレート又はシリコーンディスクへのより強固な付着を可能にすることが示された。このことは、C.アルビカンスは黄色ブドウ球菌のバイオフィルムへの結合を助けるだけでなく、黄色ブドウ球菌の関与は多重微生物性バイオフィルムに構造的利点（例えば物理的な力に対する抵抗性の強化）を提供することを示している。

【００８２】

多重微生物性バイオフィルムにおける黄色ブドウ球菌とC.アルビカンスとの相互作用は、C.アルビカンスの菌糸形成能力に依存し、菌糸表面タンパク質Als3がこの相互作用に必要である。多重微生物性バイオフィルムでは、黄色ブドウ球菌の存在はC.アルビカンス菌糸に限定されず、いくつかの黄色ブドウ球菌塊がバイオフィルム足場の細胞間空隙で明瞭であった（図2A）。C.アルビカンスバイオフィルムマトリックスは、黄色ブドウ球菌を多重微生物性バイオフィルムに組み込むために別の接着因子として機能する可能性が提案される。この提案に一致して、C.アルビカンスから単離されたマトリックス素材の存在下で増殖した黄色ブドウ球菌単一性バイオフィルムは、C.アルビカンスバイオフィルムマトリックスの非存在下のCFU計測数と比較して有意に高いCFU計測数（1.5倍）に達した（表2）。走査電子顕微鏡検査はこの結論を支持し、C.アルビカンスバイオフィルムマトリックスの存在下では、黄色ブドウ球菌は、マトリックス非存在下のバイオフィルムよりも顕著に明瞭なバイオフィルムを形成できることを示した（図2B）。マトリックスは血清被覆シリコーンディスクに付着し、細菌のための“接着剤”として機能できるように思われた。次に、C.アルビカンスバイオフィルムマトリックス変異体を用いて、黄色ブドウ球菌のバイオフィルムへの組み込みにおける真菌バイオフィルムマトリックスの関与について試験した。バイオフィルムマトリックスでβ-1,3グルカンレベルの低下を示すC.アルビカンス細胞壁再構築変異体が報告されている。そのような変異体の1つ（bgl2ΔΔ）はBGL2遺伝子が不活化されている（前記遺伝子は、β-1,3グルカン再構築に必要なグルコシル-トランスフェラーゼをコードする）。重要なことには、bgl2ΔΔ変異体は菌糸が豊富なバイオフィルムを形成することが報告され、ALS3（他の菌糸特異的細胞壁タンパク質）のバイオフィルム発現レベル及びバイオフィルム調節因子BCR1は、野生型とbgl2ΔΔバイオフィルムとの間で変化はなかった（図7）。野生型と変異C.アルビカンスバイオフィルムの黄色ブドウ球菌細胞取り込み能力を直接比較するために、値はC.アルビカンス細胞当たりの黄色ブドウ球菌CFUとして表した。図2Cに示すように、C.アルビカンスbgl2ΔΔ株によって形成された多重微生物性バイオフィルム足場は、野生型C.アルビカンスDAY185と比較して少量の黄色ブドウ球菌細胞を引き寄せた（図2C）。この結果は、真菌によって分泌される細胞外バイオフィルムマトリックスは、混合バイオフィルムの黄色ブドウ球菌の結合に寄与するという考えを支持する。

【００８３】

表2：C.アルビカンスバイオフィルムの存在下/非存在下で増殖した黄色ブドウ球菌バイオフィルムの細胞計測

−C.アルビカンス バイオフィルムマトリックス	+C.アルビカンス バイオフィルムマトリックス
(26.67±8.5) x 10^3 CFU	(40.67±5.1) x 10^3 CFU
P=0.003	

【００８４】

従来の抗微生物薬及び薬剤組合わせより性能が優る効果的な抗バイオフィルム剤としての本発明のポリマー

多数の公表研究と一致して、黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスの両微生物は、単一性バイオフィルムとして増殖するとき大半の第一線抗微生物剤に対して高度に耐性となり、アンホテリシンB及びカスポファンギンのみがC.アルビカンスバイオフィルムに対してそれらの活性を維持した（表3）。実施例で用いた2つのグアニル化ポリマー（PG3及びPG4）は、黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスのバイオフィルムに対して強力な活性を示した（表3）。バイオフィルムMIC_{80}は黄色ブドウ球菌に対しては129mg/L、C.アルビカンスに対しては64mg/Lであり、それらの浮遊細胞MICよりもそれぞれ16及び4倍高かった（表3）。単一性バイオフィルムに対するグアニル化ポリマーの有効性はCLSM及び生存性細胞についてのBacLight生細胞/死細胞染色によって確認され、これらのポリマーは従来の抗真菌薬及び抗菌薬よりも性能が優れていることが示された（図3）。

【００８５】

表3：単一種培養として異なる様式で増殖した黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスの抗微生物剤感受性

黄色ブドウ球菌			C.アルビカンス		
	浮遊細胞MIC (mg/L)	バイオフィルム MIC(mg/L)		浮遊細胞MIC (mg/L)	バイオフィルム MIC(mg/L)
オキサシリン	0.06	＞1024	フルコナゾール	0.5	＞1024
バンコマイシン	1	＞1024	アンホテリシンB	1	1
シプロフロキサシン	0.25	＞1024	カスポファンギン	1	0.12
リファンピシン	0.015	＞1024			
PG3	8	128	PG3	16	64
PG4	8	128	PG4	16	64

【００８６】

グアニル化ポリマーの抗バイオフィルム剤としての潜在能力をさらに評価するために、多重微生物性バイオフィルムに対するそれらの有効性を判断し、それらの活性を通常的な抗菌薬及び抗真菌薬の組み合わせと比較した。まず初めに、浮遊細胞様式又はバイオフィルムとしてそれぞれ増殖させたC.アルビカンス及び黄色ブドウ球菌の多重微生物性培養の12の抗菌剤/抗真菌剤組み合わせに対する感受性を試験した。抗微生物剤は最高の血清達成濃度で用いた（表1参照）。浮遊細胞性C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性培養は抗菌剤/抗真菌剤の12の組み合わせ全てに対して感受性であり（図4A）、少なくとも99.9%の黄色ブドウ球菌及び90%のC.アルビカンスが死滅した（図4A）。しかしながら、C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性バイオフィルムをチャレンジしたときは12の組み合わせのうちシプロフロキサシン/カスポファンギンを除くいずれも双方性抗微生物有効性を示さなかった（図4B）。シプロフロキサシン及びカスポファンギンの組み合わせは最良の性能発揮薬で、黄色ブドウ球菌細胞数を99.6%及びC.アルビカンスを66.6%減少させた（図4B）。PG3及びPG4は、通常的な抗微生物剤組合せと比較して128mg/Lの濃度ではるかに強力な抗バイオフィルム有効性を示した（図3及び4B）。PG3は、バイオフィルムに

存在する黄色ブドウ球菌の99.98%及びC.アルビカンス細胞の90%を殺滅し、PG4は、94%の黄色ブドウ球菌及び87%のC.アルビカンス細胞を殺滅した。以前に我々は、前記濃度ではポリマーはin vitroでヒトの細胞に対して低毒性を示すことを明らかにした。

【００８７】

バイオフィルムマトリックス素材は本発明のポリマーを封鎖するが、感受性に対する影響は小さい

バイオフィルム（細菌性、真菌性及び多重微生物性）の抗微生物剤耐性の増強に対する主要な寄与因子は細胞外マトリックス素材である。本発明にしたがって用いられるグアニル化ポリマーのバイオフィルムMICは浮遊細胞MICよりも少し高いだけであるが、ただしこの相違は繰返し観察され、このことは、バイオフィルム増殖様式がこれらの化合物に対していくらかの抵抗性を付与することを示唆している。細胞外バイオフィルムマトリックスがこの効果を媒介しているか否かを試験するために、C.アルビカンスバイオフィルムマトリックス又は多重微生物性バイオフィルムマトリックスの存在下で浮遊性黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンス細胞に対するグアニル化ポリマーの抗微生物感受性を試験した。この条件下で、フルコナゾール（陽性コントロール薬剤）は、C.アルビカンスに対してそのMICの16倍増加を示した。黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスに対するPG3及びPG4の最小阻止濃度もまたそれぞれ4倍及び2倍増加した（表4）。MICのこれらの増加は小さいが、ただしそれら増加は高い再現性を有する。MICレベルの上昇は、細胞外バイオフィルム素材がこれらポリマーの活性を抑制するか、或いはバイオフィルムマトリックスが当該基質への浮遊性細胞の付着及び“より抵抗性を有する”単層の形成を促進するかのいずれかであることが示唆された。この点をさらに明らかにするために、我々はC.アルビカンスbgl2ΔΔ変異株を用いた。前記変異株は、バイオフィルム細胞外マトリックスでより低レベルのβ-1,3グルカンを示し、フルコナゾールに対しより感受性である。このアッセイを実施するために、我々は、PG3及びPG4についてはサブ-バイオフィルムMIC（32mg/L）を用い、野生型バイオフィルムとbgl2ΔΔ変異バイオフィルムとの間の一切の相違を検出した。図5に示すように、バイオフィルムの細胞外マトリックスのβ-1,3グルカンの低下は、C.アルビカンスバイオフィルムに対するPG4の有効性の有意な増加をもたらし、一方、PG3に対する影響は存在しなかった（図5）。

【００８８】

表4：バイオフィルムマトリックスの存在下又は非存在下における黄色ブドウ球菌及びC.アルビカンスの抗微生物剤感受性（MIC）

【００８９】

	黄色ブドウ球菌(mg/L)				C.アルビカンス(mg/L)		
	培地のみ	C.アルビカンスバイオフィルムマトリックス	多重微生物性バイオフィルム		培地のみ	C.アルビカンスバイオフィルムマトリックス	多重微生物性バイオフィルム
バンコマイシン	2	1	2	フルコナゾール	0.5	8	8
PG3	8	32	32	PG3	16	32	32
PG4	8	32	32	PG4	16	32	32

【００９０】

抗菌薬ロック溶液としての本発明のポリマー

病菌汚染カテーテルのサルベージは、カテーテル除去が好ましい選択肢ではない臨床状況で重要である。これはいわゆる“抗菌薬ロック療法”又はALTによって達成でき、汚染微生物を殺滅するために抗微生物剤によるカテーテルの処理を伴う。C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌多重微生物性バイオフィルムに対する有効なロック溶液としてエタノールが報告されているが、ALTにおけるエタノールの適用は副作用によって阻まれている。我々は本明細書で、本発明の適用の1つはカテーテルロック剤であることを示す。多重微生物性バイオフィルムを96ウェルマイクロプレートで形成し、続いて、エタノール又はグアニル化ポリメタクリレートをバイオフィルムに適用して一晩暴露した。表5に示すように、128mg/LのPG3又は256mg/LのPG4が、多重微生物性バイオフィルムによって病菌汚染された

バイオマテリアルのサルベージに有効で、C.アルビカンス-黄色ブドウ球菌バイオフィルムを効果的に根絶した。この効果を20%エタノールの一晩暴露と比較した（表5）。最小バイオフィルム根絶濃度（MBEC）のPG3及びPG4は非常に低いヒト細胞毒性を示し、カテーテルロック溶液でエタノールの代替物として用いることが可能であろう。

【００９１】

表5：単一/多重微生物性24時間バイオフィルムに対するカテーテルロック溶液としてのポリマーのMBEC

	エタノール(V/V)	PG3 (mg/L)	PG4 (mg/L)
黄色ブドウ球菌	20%	128	256
C.アルビカンス	20%	128	256
多重微生物性	20%	128	256

【００９２】

長期創傷包帯としての本発明のポリマー

ポリマーは、創傷への安定/有効な投与を提供するために標準的製薬プロトコルにしたがって処方できる。時間の経過にしたがってポリマーを創傷へ持続放出させるために、典型的にはポリマーを適切なマトリックス中に分散できよう。典型的なマトリックスには、いくつかを挙げればアルジネート、キトサン、デンプン、グルカン、ゼラチンが含まれよう。

本明細書における以前の刊行物（又は前記に由来する情報）又は公知の事柄に関するいずれの引用も、当該以前の刊行物（又は前記に由来する情報）又は公知の事柄が、本明細書が関係する分野の通常的な一般的知識の部分を構成することを承認若しくは容認又示唆するものと解釈してはならない。

【図１】

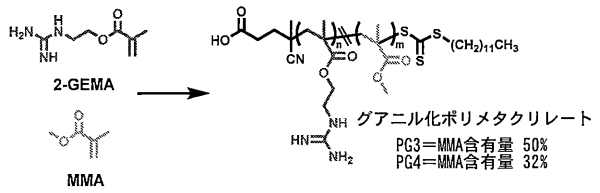


Figure 1

【図２】

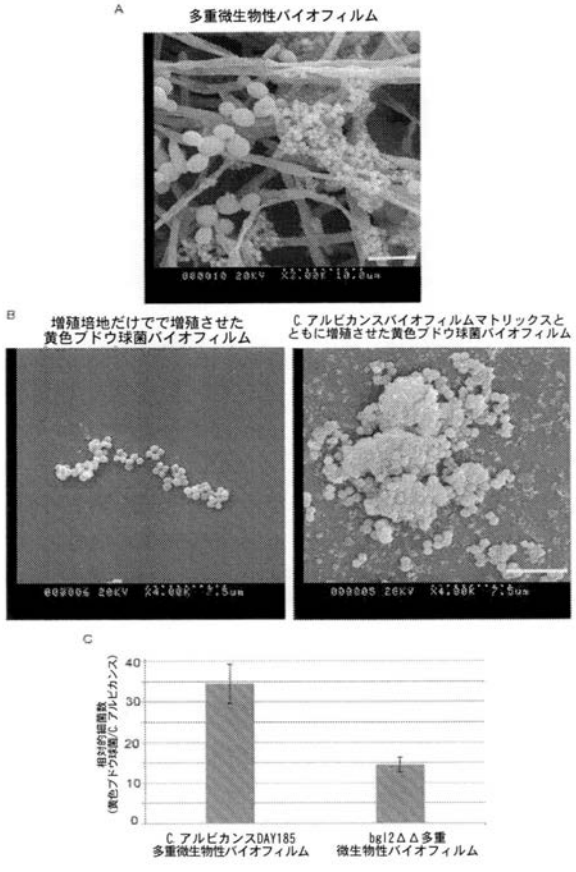


Figure 2

【図３】

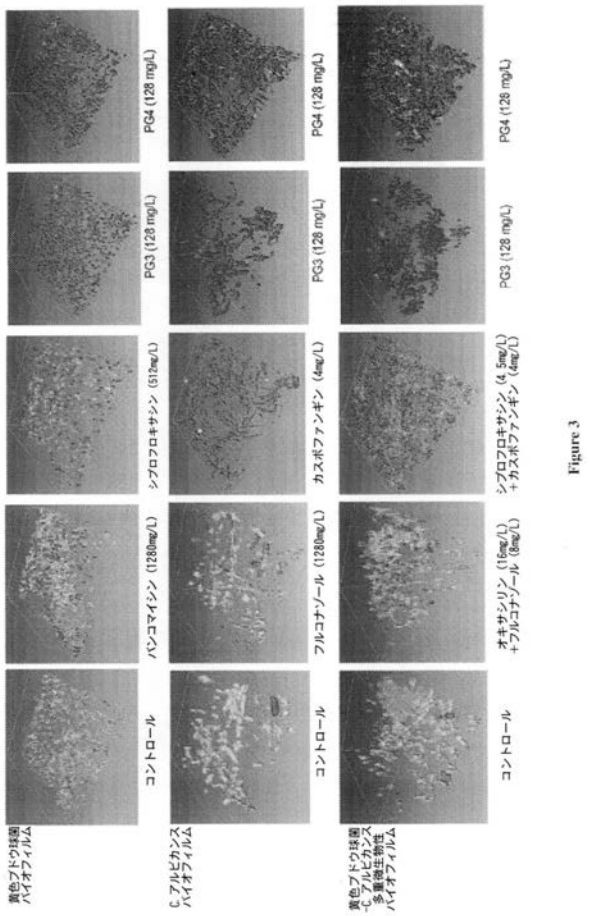


Figure 3

【図４】

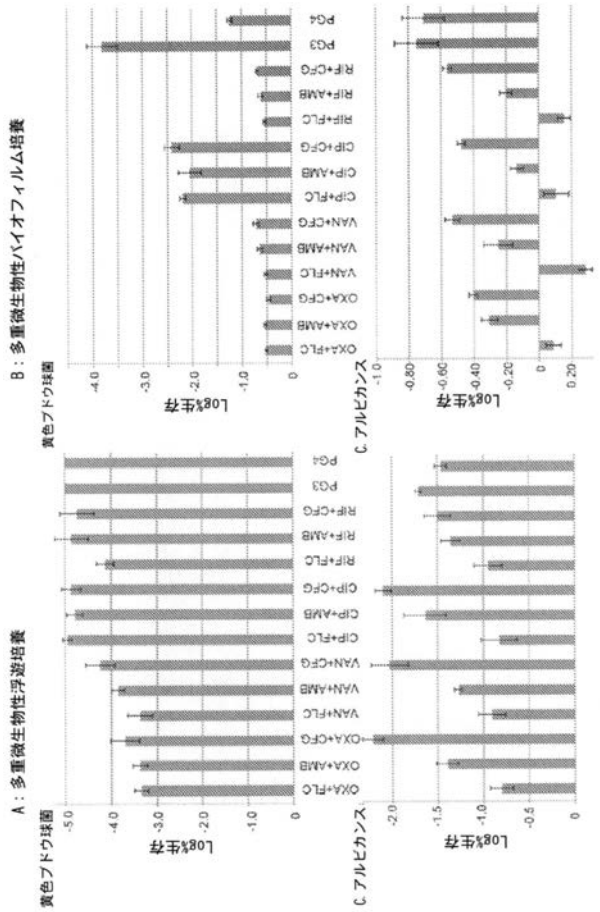


Figure 4

【図５】

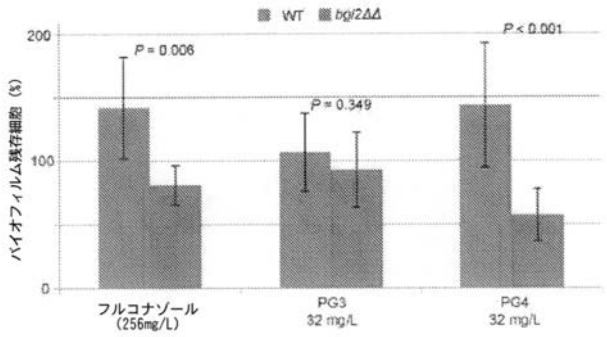


Figure 5

【図６】

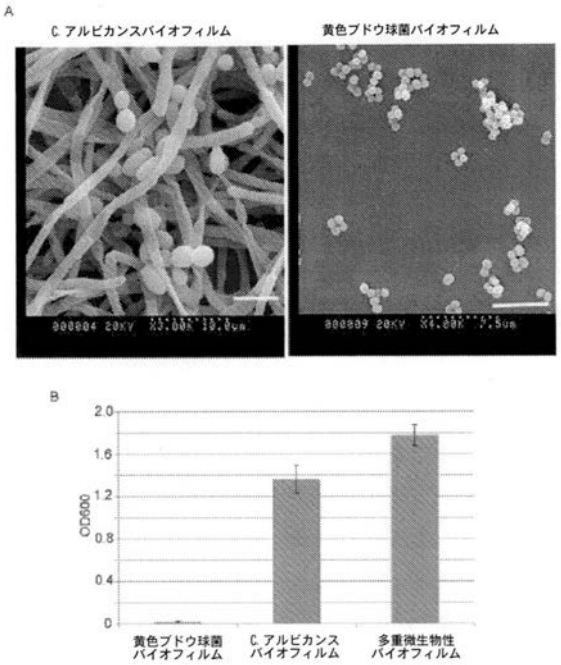


Figure 6

【図７】

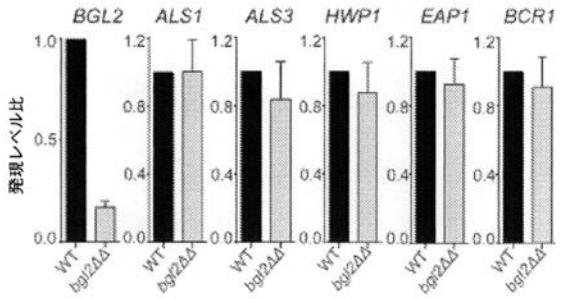


Figure 7

【配列表】
2018508538000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2016/050134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 29/04 (2006.01) ***A61K 31/785 (2006.01)*** ***A61K 31/155 (2006.01)*** ***A61K 31/13 (2006.01)*** ***A61P 31/04 (2006.01)*** ***A61L 2/18 (2006.01)***

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)

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)

Databases consulted: CAPlus, CABA, EMBASE, FSTA, BIOSIS, MEDLINE, EPODOC, WPIAP, Google Patents, Espacenet

Keywords: (BIOFILM, ANTIMICROBIAL, GUANIDINE, AMINO, POLYMER, METHACRYLATE) and similar terms

Applicant and inventor name search in internal databases provided by IP Australia; NOSE, INTESS, Espacenet, Google Scholar and Google Patents

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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	Date of mailing of the international search report
11 April 2016	11 April 2016
Name and mailing address of the ISA/AU	**Authorised officer**
AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Michael Bradshaw AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262256164

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2016/050134

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/AU2016/050134
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOCOCK, K. et al. 'Guanylated Polymethacrylates: A Class of Potent Antimicrobial Polymers with Low Hemolytic Activity', Biomacromolecules, 2013, Vol. 14, No.11, pages 4021-4031 pp.4022, 4023, 4025	1-18
X	WO 2002/085542 A1 (MASSACHUSETTS INSITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 31 October 2002 pg.43 ln.5, pg.43 ln.7, formula 1	1, 3-5, 7, 8 and 11-18
X	US 2013/0150451 A1 (SALAMONE et al.) 13 June 2013 [0024], [0026]	1, 3-5, 7, 8 and 11-18
X	US 2010/0285084 A1 (YANG ET AL) 11 November 2010 [0010], [0025], [0026], [0032], [0095]	1, 3-5, 7, 8 and 11-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/AU2016/050134

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2002/085542 A1	31 October 2002	WO 02085542 A1	31 Oct 2002
		AU 2002258818 A1	05 Nov 2002
		CA 2445389 A1	31 Oct 2002
		EP 1390158 A1	25 Feb 2004
		JP 2004532108 A	21 Oct 2004
		TW 590779 B	11 Jun 2004
		US 2003091641 A1	15 May 2003
		US 7151139 B2	19 Dec 2006
		US 2006235738 A1	19 Oct 2006
		US 8265942 B2	11 Sep 2012
		US 2006235737 A1	19 Oct 2006
		US 8788311 B2	22 Jul 2014
		US 2013110237 A1	02 May 2013
		US 9089407 B2	28 Jul 2015
		US 2005249695 A1	10 Nov 2005
		US 2006235730 A1	19 Oct 2006
		US 2006235731 A1	19 Oct 2006
		US 2015328378 A1	19 Nov 2015
		WO 2006113433 A2	26 Oct 2006
US 2013/0150451 A1	13 June 2013	US 2013150451 A1	13 Jun 2013
		US 8829053 B2	09 Sep 2014
		AU 2012347739 A1	03 Jul 2014
		CA 2858561 A1	13 Jun 2013
		EP 2787985 A1	15 Oct 2014
		HK 1202071 A1	18 Sep 2015
		JP 2015501816 A	19 Jan 2015
		MX 2014006654 A	10 Aug 2015
		WO 2013086181 A1	13 Jun 2013
US 2010/0285084 A1	11 November 2010	US 2010285084 A1	11 Nov 2010
		US 8512731 B2	20 Aug 2013
		CA 2704962 A1	22 May 2009
		CN 101909666 A	08 Dec 2010
		CN 101909666 B	08 May 2013

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/AU2016/050134**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		EP 2214737 A2	11 Aug 2010
		EP 2214737 B1	07 Jan 2015
		JP 2011502714 A	27 Jan 2011
		JP 5264925 B2	14 Aug 2013
		WO 2009064879 A2	22 May 2009

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61L	*17/04*	*(2006.01)*	A61L	17/04		
A61L	*27/16*	*(2006.01)*	A61L	27/16		
A61L	*27/50*	*(2006.01)*	A61L	27/50	300	
A61L	*15/24*	*(2006.01)*	A61L	15/24	100	
C12N	*1/16*	*(2006.01)*	C12N	1/16	ZNA	
C12N	*1/20*	*(2006.01)*	C12N	1/20	A	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

(81)指定国 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,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,NE,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,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100103610
弁理士 ▲吉▼田 和彦
(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
(72)発明者 ロコック キャサリン エリザベス サラ
オーストラリア ヴィクトリア ３１４５ モルヴァーン イースト アーケイディア アヴェニュー １／１３－１５
(72)発明者 マーハー ローレンス
オーストラリア ヴィクトリア ３０５６ ブランズウィック アルバート ストリート １９８
(72)発明者 チュィ ユエ
オーストラリア ヴィクトリア ３０８３ バンドゥーラ レモン ガム パレード ８
(72)発明者 トラヴェン アナ
オーストラリア ヴィクトリア ３０７８ アルフィントン コート アヴェニュー ４／２４

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA29X AA41X AA49X AA53X AA73X AC20 BD32 CA43 CA60
4C081 AA02 AB13 AC02 AC08 BA17 CA081 CA082 DC15
4C086 AA01 AA02 FA03 MA01 MA04 NA14 ZB35