

(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2019-537569

(P2019-537569A)

(43) 公表日 令和1年12月26日(2019.12.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 213/76 (2006.01)	C O 7 D 213/76 C S P	4 C O 5 5
A 6 1 K 31/655 (2006.01)	A 6 1 K 31/655	4 C O 8 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 P	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-520429 (P2019-520429)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月5日 (2017.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月13日 (2019.6.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/055283
 (87) 国際公開番号 W02018/071262
 (87) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018.4.19)
 (31) 優先権主張番号 15/723,763
 (32) 優先日 平成29年10月3日 (2017.10.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/408,826
 (32) 優先日 平成28年10月16日 (2016.10.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 505377212
 エイディーエイ ファウンデーション
 アメリカ合衆国 60611 イリノイ州
 シカゴ イースト シカゴ アベニュー
 211
 (71) 出願人 319014569
 サン、 ジルン
 アメリカ合衆国 20898 メリーラン
 ド州 デイザースバーグ ビューロー ド
 ライブ 100 ストップ 8546 ド
 クター アンソニー ボルプ リサーチ
 センター
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸増強抗細菌効力を有するアゾ型第四級ピリジニウム塩、それらの使用方法、合成方法、および使用

(57) 【要約】

新しいアゾ型第四級ピリジニウム塩(Azo-QPS)は、酸性条件(例えば、pH=5)において増強した活性を示す。中性または塩基性条件においては、この新しいAzo-QPSは、はるかに低いレベル(2~50倍低い)の抗細菌活性を示す。そのような「刺激増強」抗生物質の使用は、細菌の増殖に直接応答することができる。それは、口腔環境における強力な抗細菌剤の集積を低減または予防する助けとなる。Azo-QPSの抗細菌特性は、環境pHが酸性になると「活性化される」。この酸性pHは、Streptococcus mutansの蓄積または歯の開始を示唆し得る。

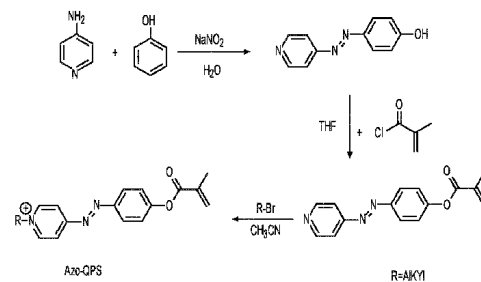
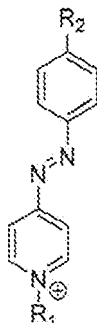


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第四級ピリジニウム塩と、
 R_1 および R_2 基と
 を含むアゾ化合物であって、アゾ化合物は、下記の式
 【化 1】



10

[式中、

R_1 は、 $-C_nH_{(2n+1)}$ 、 $-C_nH_{(2n-1)}$ 、およびそれらの誘導体からなる官能基の群から選択され、 n は、好ましくは6～18の整数であり、

R_2 は、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NMe_2$ 、アルキル、 $-OCH_3$ 、 OC_2H_5 、およびそれらの誘導体からなる群から選択される]
 を有する、アゾ化合物。

20

【請求項 2】

グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対する抗細菌薬として作用する、請求項1に記載のアゾ化合物。

【請求項 3】

中性および塩基性の環境よりも $pH < 6$ の酸性環境においてグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌に対して高い効力(低い $\mu g/mL$ レベル)を有する抗細菌薬として作用する、請求項1に記載のアゾ化合物。

【請求項 4】

4～8の間の pH 値を決定する pH センサーとして作用する、請求項1に記載のアゾ化合物。

30

【請求項 5】

酸化剤および還元剤のレベルを決定する酸化還元センサーとして作用する、請求項1に記載のアゾ化合物。

【請求項 6】

抗体抗原相互作用を定量化する免疫センサーの一部として作用する、請求項1に記載のアゾ化合物。

【請求項 7】

R_1 は、 $-C_nH_{(2n+1)}$ 、 $-C_nH_{(2n-1)}$ 、およびそれらの誘導体からなる官能基の群から選択され、 n が、好ましくは2～20の整数であり、

40

R_2 は、重合可能な官能基、メタクリレート、アクリレート、スチレン、ビニルベンジルおよびそれらの誘導体からなる群からも選択することができる
 請求項1に記載のアゾ化合物。

【請求項 8】

グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対する抗細菌薬として作用する、請求項7に記載のアゾ化合物。

【請求項 9】

中性および塩基性の環境よりも $pH < 6$ の酸性環境においてグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌に対して高い効力(低い $\mu g/mL$ レベル)を有する抗細菌薬として作用する、請求項7に記載のアゾ化合物。

50

【請求項 10】

4～8の間のpH値を決定するpHセンサーとして作用する、請求項7に記載のアゾ化合物。

【請求項 11】

酸化剤および還元剤のレベルを決定する酸化還元センサーとして作用する、請求項7に記載のアゾ化合物。

【請求項 12】

抗体抗原相互作用を定量化する免疫センサーの一部として作用する、請求項7に記載のアゾ化合物。

【請求項 13】

共有結合または非共有結合によってポリマー材料または粒子に組み込むことができる抗細菌性リンケージとしての、請求項7に記載のアゾ化合物。

10

【請求項 14】

共有結合または非共有結合によってポリマー材料または粒子に組み込むことができるpHセンサーリンケージとしての、請求項7に記載のアゾ化合物。

【請求項 15】

請求項7に記載のアゾ化合物とビニル基を含む化合物の群から選択されるモノマーとのコポリマー。

【請求項 16】

pHセンサーとしての、請求項15に記載のコポリマー。

【請求項 17】

抗細菌性材料としての、請求項15に記載のコポリマー。

20

【請求項 18】

酸増強抗細菌性材料としての、請求項15に記載のコポリマー。

【請求項 19】

酸化剤および還元剤のレベルを決定する酸化還元センサーとしての、請求項15に記載のコポリマー。

【請求項 20】

抗体抗原相互作用を定量化する免疫センサーの必須部分としての、請求項15に記載のコポリマー。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

抗微生物薬耐性とは、微生物処理に以前に使用された薬物の効果に対して抵抗する、微生物の能力のことである。より狭義には、抗微生物薬耐性(抗細菌薬耐性または抗生物質耐性と呼ばれることもある)は、抗生物質に対する細菌の耐性を指す。世界保健機関は、そのような抗生物質耐性が、世界のあらゆる領域において現在の脅威であり、どの国のどの年齢のどの人にも影響を及ぼす可能性があるとして述べている。したがって、抗生物質耐性は現在、細菌が変化し、その結果、感染症を治療するために抗生物質を必要とする人々において抗生物質がもはや効かない場合に、公衆衛生への大きな脅威となっている。

40

【0002】

口腔環境において、Streptococcus mutans細菌は、虫歯(dental cavities)形成における主病原因子である。Streptococcus mutansは、酸性/低pH(pH 4にも達する低さ)の口腔環境において生存し、よく成長することができる。実際、口腔環境において、十分に酸性のpHは、Streptococcus mutansの蓄積および歯の開始を示唆する。Streptococcus mutansと戦うために、抗微生物活性を有する第四級アンモニウム塩(QAS: Quaternary ammonium salts)が開発されてきた。しかし、現在のこれら塩の製剤は、Streptococcus mutansに対する高い抗細菌有効性と変化する環境pHに対する感受性との両方を示すことができていない。

【発明の概要】

50

【 0 0 0 3 】

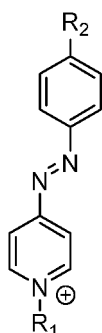
開示されているのは、酸性条件(例えば、pH=5)において増強した活性を示す新しいアゾ型第四級ピリジニウム塩(Azo-QPS)である。中性または塩基性条件において、この新しいAzo-QPSは、はるかに低いレベルの(2~50倍低い)抗細菌活性を示す。そのような「刺激増強」抗生物質は、細菌の増殖に直接応答することができ、口腔環境における強力な抗細菌剤の集積を低減または予防することができる。Azo-QPSの抗細菌特性は、環境pHが酸性になると「活性化される」。この酸性pHは、Streptococcus mutansの蓄積または歯の開始を示唆し得る。

【 0 0 0 4 】

ある実施形態において、化合物は、 R_1 および R_2 基を有するアゾ型第四級ピリジニウム塩(Azo-QPS)を含み、下記化学式を有する。

10

【化 1】



20

R_1 は、 $-C_nH_{(2n+1)}$ 、 $-C_nH_{(2n-1)}$ 、およびそれらの誘導体からなる官能基の群から選択することができ、ここで、 n は、好ましくは2~20の整数である。 R_2 は、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NMe_2$ 、アルキル、 $-OCH_3$ 、 OC_2H_5 、およびそれらの誘導体からなる群から選択することができる。 R_2 は、重合可能な官能基、メタクリレート、アクリレート、スチレン、ビニルベンジルおよびそれらの誘導体からなる群からも選択することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 5 】

30

【図 1】有機小分子Azo-QPS-C16の合成例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 6 】

抗細菌薬耐性は、深刻な医療課題を提示している。ヒトの歯(口腔)環境において、細菌は、歯および関連する問題の原因となり得る。そのような細菌の1つであるStreptococcus mutansは、虫歯形成における主たる病原因子である。Streptococcus mutansは、酸性/低pH(pH 4にも達する低さ)の口腔環境において生存し、よく成長することができる。Streptococcus mutansと戦うために、抗微生物活性を有する多くの第四級アンモニウム塩(QAS)が最近開発されている。しかし、現在のこれらQAS製剤は、Streptococcus mutansに対する高い有効性と変化する環境pHに対する高い感受性との両方を示すことができていない。

40

【 0 0 0 7 】

抗細菌薬耐性に関連した懸案事項に対処しながら、現在のQAS製剤の限界を克服するために、出願人らは、新規で非自明なアゾ型第四級ピリジニウム塩(Azo-QPS)製剤ファミリーを開発し、特徴付け、試験した。アゾ化合物は、一般に、官能基 $R'_1-N=N-R'_2$ を含み、ここで、 R'_1 および R'_2 基はアリールまたはアルキルとすることができる。

【 0 0 0 8 】

出願人らは、本明細書に開示されるAzo-QPS製剤であれば、酸性条件(例えば、pH=5)でのみ高い活性を示し、中性または塩基性条件では、これら新しいAzo-QPS製剤は、はるかに低いレベルの(2~50倍低い)抗細菌活性を示すであろうと仮定した。これらの予測され

50

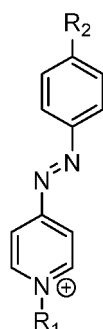
た特徴を伴って、そのような「刺激増強」抗生物質(すなわち、これら新しいAzo-QPS製剤は、環境pHが酸性になるときのみ「活性化され」、これは上記で述べたようにStreptococcus mutansの蓄積および歯の開始を示唆する)は、口腔環境における強力な抗細菌剤の集積を低減または予防し、それによって抗細菌薬耐性の発達を低減する助けとなり得る。

【0009】

特に、Azo-QPS化合物ファミリーが開発され、特性が明らかにされた。次いで、グラム陽性(Escherichia coli-E coli)およびグラム陰性(Streptococcus mutans)細菌に対するこれらAzo-QPS化合物の抗細菌活性を評価した。本明細書に開示されるAzo-QPS化合物の抗細菌効力は、pHと酸化還元試薬の両方によって制御することができる可逆的アセンブリの結果として、生理的pH範囲内における変化に対して高い感受性を示した。Azo-QPS化合物の構造式例を以下に示す。

10

【化2】



20

この製剤において、 R_1 は、 $-C_nH_{(2n+1)}$ 、 $-C_nH_{(2n-1)}$ 、およびそれらの誘導体からなる官能基の群から選択され、ここで、 n は、2~20の整数であり、 R_2 は、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NMe_2$ 、アルキル、 $-OCH_3$ 、 OC_2H_5 、およびそれらの誘導体からなる群から選択される。 R_2 は、重合可能な官能基、メタクリレート、アクリレート、スチレン、ビニルベンジルおよびそれらの誘導体からなる群からも選択することができる。

【0010】

本明細書に開示される新しいアゾ型第四級ピリジニウム塩(Azo-QPS)の一実施形態は、容易に重合可能なメタクリレート R_2 基を伴って設計された。このAzo-QPS製剤は、グラム陽性(Escherichia coli)およびグラム陰性(Streptococcus mutans)細菌に対して高い抗細菌有効性を示す。同様に、 R_2 基がアクリレート、スチレンまたはビニルベンジルのうちの1つである場合に対応するAzo-QPS製剤もグラム陽性(Escherichia coli)およびグラム陰性(Streptococcus mutans)細菌に対して高い抗細菌有効性を示すはずであり、したがって抗細菌材料を容易に生成する候補となる。さらに、新しいAzo-QPS製剤の有効性は、変化する環境pHに敏感である。具体的には、より低いpH(pH=5)条件において、Azo-QPS製剤は、より高いpHレベル(例えば、pH=7~9)におけるよりはるかに高い(2~50倍)抗細菌活性を示す。そのような抗細菌活性の差異は、Azo-QPSの可逆的電子還元起因する。可逆的電子還元は、化学的にも(例えば、トリメチルアミン(NEt_3)および酢酸(CH_3COOH)によって)(以下の構造製剤例を参照のこと)電気化学的にも誘導することができる。新しいAzo-QPS製剤は、抗生物質の集積を防ぐ助けとなり、抗生物質に対する細菌の耐性という普遍的な問題の解決方法として機能し得るため、この発見は、現在の細菌薬を改革することにおいて大きな可能性を示す。

30

40

【0011】

さらに、Azo-QPS製剤は、抗細菌特性を有するだけでなく、酸化還元反応または抗原抗体反応に応答し、唾液、血液、または水溶液中の抗原の濃度を定量化する、多機能性免疫センサーとして機能し得る。

【0012】

Azo QPS製剤の使用可能性として、下記が挙げられる：

50

・グラム陽性(*Escherichia coli*)およびグラム陰性(*Streptococcus mutans*)細菌に対して高い効力(低 $\mu\text{g/mL}$ レベル)を有する抗細菌薬として働くこと。

・ポリマー材料に組み込むことができる抗細菌性リンケージとして働くこと。ビニル官能基はリンカーとして働くことができ、出願人らは、Azo-QPSの強力な抗細菌活性を妨害または損なうことなくメタクリレート官能基を含ませることができることを証明している。

・Azo-QPSを含むポリマー材料は、例えば歯科用複合材料、他の医療デバイス、生体材料、および食品包装材料として使用され得る。

・センサーとして働くこと。Azo-QPSは生理的pHレベルと酸化還元電位の両方に対して高感度であることによって、Azo-QPSが免疫センサーおよびpHセンサーとして機能することを可能にする。

10

【実施例】

【0013】

実施例

【0014】

(実施例1)

(E)-1-ヘキサデシル-4-((4-(メタクリロイルオキシ)フェニル)ジアゼニル)-ピリジニウムプロミド(Azo-QPS-C16と命名)の合成。

【0015】

合成および特性の一般情報。Alfa Aesar社(Tewksbury, MA, USA)、Sigma-Aldrich社(Saint Louis, MO, USA)およびTCI America社(Portland, OR, USA)から購入した市販の材料を、受け取ったままの状態で使用した。プロトンおよび炭素の核磁気共鳴(^1H および ^{13}C NMR)スペクトルを、Bruker製の装置(600MHz、Billerica, MA, USA)で5mmのチューブを使用して記録した。化学シフトは、テトラメチルシラン($\delta=0.00$)、ジメチルスルホキシド($\delta=2.50$)またはクロロホルム($\delta=7.26$)に対して百万分率(ppm、 δ)の単位で記録した。 ^1H NMR分裂パターンを、一重線(s)、二重線(d)、三重線(t)、四重線(q)、dd(二重線の二重線)、およびm(多重線)と命名する。高分解能質量スペクトル(MS)を、ESI-TOF-MS分析用のJEOL AccuTOF(Peabody, MA, USA)で記録した。

20

【0016】

Azo-QPS-C16は、有機小分子である。合成手順の例を図1に示す。

30

【0017】

5g(53.2mmol)のフェノールおよび4g(60mmol)の亜硝酸ナトリウムを20mLの10重量%水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、混合物を0~4℃の氷浴中で撹拌した。塩化水素水溶液中6g(63.8mmol)の4-アミノピリジンから作製した予冷溶液に、混合物を滴下添加した。反応液を氷浴中で30分間撹拌し、次いで室温で一晩撹拌した。反応液のpHを10重量パーセント(10重量%)水酸化ナトリウムで6~7に調整した。沈澱物を濾過により回収し、風乾した。アゾ生成物を、さらに精製することなく次のステップで使用した。

【0018】

この次のステップにおいて、4g(20.1mmol)のアゾおよび1.25当量のトリメチルアミンをテトラヒドロフラン(THF)に溶解した。1当量のメタクリロイルクロリドを反応液に滴下して加えた。反応液を室温で2時間撹拌した。Azo-QPS-メタクリレート化合物をカラムクロマトグラフィーで精製し、収率は87%であった。

40

【0019】

最後に、Azo-QPS-メタクリレート化合物を、アセトニトリル中、1.5当量の所望のアルキルプロミドで3日間還流した。得られた暗赤色生成物を、エーテルおよびアセトンを用いて再結晶化することによってさらに精製し、収率48~56%でAzo-QPS-C16を得た。 ^1H NMR(600MHz, CDCl_3)スペクトルのプロトンの化学シフトは以下の通りである。 δ 9.64 (d, $J=6.0$ Hz, 2 H), 8.30 (d, $J=6.0$ Hz, 2 H), 8.10 (d, $J=6.0$, 11.0 Hz, 2 H), 7.40 (d, $J=16.0$, 2 H), 6.42 (s, 1 H), 5.86 (s, 1 H), 5.11 (t, $J=7.4$ Hz, 2 H), 2.08 (m, 5 H), 1.33 (m, 26 H), 0.88 (m, 3 H) ppm; ^{13}C NMR (600 MHz, CDCl_3)

50

δ 165.01, 160.42, 156.39, 149.86, 147.21, 135.34, 128.44, 126.27, 123.07, 120.50, 62.03, 32.11, 31.93, 31.17, 29.70, 29.69, 29.66, 29.64, 29.60, 29.51, 29.37, 29.10, 28.77, 26.15, 22.70, 18.32, 14.12 ppm. Hi-Res MS (ESI): m/z calcd. for $C_{31}H_{46}N_3O_2^+$, 492.3585; found $[M]^+$: $C_{31}H_{46}N_3O_2^+$, 492.3599.

【0020】

(実施例2)

酸増強抗細菌効力。

【0021】

Azo-QPS-C16は、グラム陽性(*Escherichia coli*)およびグラム陰性(*Streptococcus mutans*)細菌の両方に対して有効であった。増殖培地を添加し、pH 4.1、5.8、および7.9の緩衝液中、600nmにおける光学密度(OD)を15分ごとに測定することによって、Azo-QPS-C16への曝露後に細菌が増殖する能力の特徴付けを行った。pH 4.1では、2.5 μ g/mLのAzo-QPS-C16に曝露することにより、*E. coli*増殖が19時間まで完全に阻害された。しかし、pH 7.9における曝露では、細胞増殖を阻害するにははるかに高い濃度(40 μ g/mL)を必要とした。ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いたおよび用いない、異なるpH値を含むすべての緩衝液対照測定で、*E. coli*の明らかな増殖が認められた。細胞をAzo-QPS-C16の2倍希釈系列で処理した後、培養物をLysogeny Broth(LB)寒天プレートに播種することによって、最小殺細菌濃度(MBC)から見たAzo-QPS-C16の殺細菌活性のpH依存性を評価した。pHが上がるにつれて、MBCがそれに対応して上昇した。pH 4.1とpH 7.9の間でMBCの差が16倍であることが認められた。

【0022】

本発明者は、グラム陽性乳酸産生性細菌*S. mutans*に対してもAzo-QPS-C16の同様のpH感受性抗細菌活性を認めた。MBC評価によれば、Azo-QPS-C16は、*S. mutans*に対して、弱塩基性条件より酸性条件において8倍有効である。

【0023】

細菌株および増殖条件。*Streptococcus mutans*(*S. mutans*, UA159)および*Escherichia coli*(*E. coli*, K12)は、ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)から購入した。Todd Hewitt Broth(THB)、ならびにLysogeny Broth(LB)粉末および寒天は、BD社(Becton, Dickinson and Company社, Franklin Lakes, NJ, USA)から購入した。ブランクトン性培養物は、-80℃で貯蔵した25(容積)%グリセロール凍結ストックから播種された。*E. coli*培養物は、振盪インキュベーターで、37℃で、LB中で増殖させた。*S. mutans*培養物は、5%(体積)CO₂を用いて37℃で、THB中で一晚、増殖させた。

【0024】

細菌増殖曲線。*E. coli*および*S. mutans*の終夜培養物を、異なるpH値の緩衝液(100mmol/L、pH 4.1酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.8リン酸ナトリウム緩衝液、およびpH 7.9リン酸ナトリウム緩衝液)中に直接希釈して、600nmにおける光学密度(OD600)を約0.001とした。

【0025】

96ウェルプレートにおいて、ジメチルスルホキシド(DMSO)で様々な濃度にした2 μ LのAzo-QPS-C16を、1ウェル当たり98 μ Lの細菌懸濁液に添加し、2倍希釈系列によってAzo-QPS-C16の最終濃度範囲が40~1.25 μ g/mLとなるようにした。室温で45分処理した後、増殖曲線を測定するために、各ウェルから10 μ Lを、1ウェル当たり100 μ Lの増殖培地が既に入っている新しい96-ウェルプレートに移した。*E. coli*を37℃で培養し、各ウェルのOD600を、Tecan Sparkマイクロプレートリーダー(Mannedorf, Switzerland)によって15分ごとに19時間まで、各回測定前に30秒振盪して測定した。*S. mutans*は37℃、5%CO₂で増殖させ、Molecular Devices社(Sunnyvale, CA)のSpectraMax M5マイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルのOD600を定期的に測定した。実験はすべて3重実験とし、異なる日に少なくとも3回繰り返した。

【0026】

最小殺細菌濃度(MBC)決定。MBC値は、寒天コロニー形成により決定した。増殖曲線測定についてのと同じ処理を細菌に適用した。各ウェルから5 μ Lの懸濁細胞を寒天プレート上

にスポットし、48時間インキュベートして、コロニー形成をさせ、細菌増殖の有無を肉眼で判定した。実験はすべて3重実験とし、異なる日に少なくとも3回繰り返した。

【0027】

(実施例3)

pH感受性物理化学的特性。

【0028】

Azo-QPS-C16は、その酸増強抗細菌活性と関連するpH感受性物理化学的特性を示す。Azo-QPS-C16の水溶液(0.01mmol/L、5.7 µg/mL)は酸性条件および塩基性条件でそれぞれ清澄な橙色および紫色で現れ、これは紫外可視スペクトルにおいて観察されたレッドシフトと一致している。紫外可視スペクトルは、Thermo Spectronic Genesys 5紫外可視分光光度計(Thermo Scientific社、Waltham, MA USA)で経路長1cmの石英キュベットを使用して、ベースライン補正を行った後に298Kで記録した。554nmを中心にしたピークの増大および同時に起こる347nmにおけるピークの低下は、4.1から7.9へのpHの変化に比例する。モル当量の塩基、例えば、トリエチルアミン(TEA)が添加されたDMSO(0.05mmol/L、28.6 µg/mL)中において、同様の吸光度ピークが検出された。347nmにおけるピーク強度の低下は、QP Sに対するTEAのモル比の増加に比例する。

10

【0029】

(実施例4)

塩基誘導性切替可能アセンブリ。

【0030】

20

色の変化に加えて、様々なpH値におけるAzo-QPS-C16のアセンブリを動的光散乱(DLS)により観察した。弱塩基性条件において平均流体力学的径が 51 ± 19 nmの粒子が形成し、これは554nmにおける吸光度ピークの出現と同時に起こった。pH 4.1の緩衝液中では粒子は認められなかった。DMSO中における酸性および塩基性条件間での可逆的切替が、5モル当量のTEA、次いでトリフルオロ酢酸(TFA)の連続添加を通して3サイクルにわたって示された。1サイクルは、塩基と酸との添加に相当する。塩基中および酸中において、それぞれ、554nmにおける吸光度が増加し、次いで低下し、粒子が形成され、分解された。

【0031】

短鎖Azo-QPS-C2も、外観および粒子サイズ分布の点から同様な切替可能アセンブリを示した。その紫外可視スペクトルは、350nmおよび540nmに2つのピークを有し、これは、Azo-QPS-C16のスペクトルにおける347nmおよび554nmと同等なものであった。DLSによって、これらの2つの化合物は、塩基が添加されるとき、同じ流体力学的径および粒子サイズ分布を有することが決定された。そのような良好な合致は、尾部の鎖長がこれらの化合物のアセンブリに与える影響は最小限にとどまることを示している。

30

【0032】

動的光散乱(DLS)は、Nicomp 380 ZLS DLSシステム(Particle Sizing Systems Inc.社、Santa Barbara, CA)を使用して行われた。試料をガラス製ディスポーザブル培養チューブに入れた。試料を加える前に、チューブに窒素ガスを吹き付け、0.4mLの色素試料で満たした。パラフィルムを使用して、チューブを密封し、次いで14,000rpm(19,000g)で5分間遠心して、より大きい粒子および塵埃を分離した。試料を機器に入れ、熱平衡を達成させた。自己相関関数を、散乱角 173° で3分間で得た。LaplaceインバージョンベースのNicompルーチンを使用して、減衰率の分布を求めた。減衰率を適切な方程式によって有効球体流体力学的径に関連付ける。サイズ分布は、直径ピンの別個のセットおよび直径ピンに割り当てられた確率としての対応する強度重み付きフラクションとして報告される。

40

【0033】

(実施例5)

吸着膜におけるpH感受性。

【0034】

アゾベンゼンおよびその誘導体は電気化学的に活性であるので、Azo-QPS-C16吸着膜におけるプロトン化/脱プロトン化の役割を理解するためにサイクリックボルタンメトリー(

50

CV)を用いて電位に対するpHの効果を試験した。酸化還元対は、おそらくアゾベンゼンからヒドラゾベンゼンへの還元およびその逆から起こる。DMSO中1mmol/L(572 μg/mL)のAzo-QPS-C16を10 μLずつ、10mLの100mmol/Lのリン酸緩衝液(pH 6.8)に添加することによって、Azo-QPS-C16のガラス状炭素への吸着を様々な濃度で評価した。酸化還元対は、Ag/AgClに対する平均ピーク電位 $E_{1/2}$ が約-50mVで現れる。予想される通り、より高い濃度ではピーク電流は増加する。しかし、0.04mmol/L(23 μg/mL)を超える濃度でピークは狭くなり、これは、より高い濃度では吸着プロセスが起きていることを示唆する。ピークの形状、およびアノードピーク電流 i_{pa} 対カソードピーク電流 i_{pc} の比が1より大きいということに基づけば、0.04mmol/L未満においては反応物の弱い吸着、次いで0.05mmol/L(29 μg/mL)より高い濃度においては生成物の吸着が優勢な挙動であり得る。また、平均ピーク電位 $E_{1/2}$ は正にシフトし、ピーク電位の差異 ΔE は、より高いAzo-QPS-C16濃度ではより狭くなる。

10

【0035】

電極を0.1mmol/L(57 μg/mL)のAzo-QPS-16溶液から取り出し、水ですすいで弱く結合している化合物を除去し、次いで新鮮な緩衝液に浸漬すると、酸化還元対は、Ag/AgClに対して-50mVで現れる。 i_{pc} および i_{pa} 対掃引速度 v のプロットは直線状であり、これにより、種が吸着することが確認される。緩衝液からの吸着と同様に、DMSO中において電極表面に層が形成する。浸漬の45分間以内にいくらかの脱吸着は起こったが膜は少なくとも1時間安定であった。

【0036】

吸着された電気化学的に可逆的な系では、 $i_p = (n^2 F^2 v A \Gamma) / (4RT)$ (ここで、 n は一電子であり、 F はファラデー定数(96,485C/mol)であり、 v は掃引速度(V/秒)であり、 A は電極面積(cm^2)であり、 Γ は表面被覆度(mol/cm^2)であり、 R はモル気体定数(8.314J/mol/K)であり、 T は温度(K)である)と仮定すると、DMSO/緩衝液系において形成されたAzo-QPS-16の表面被覆度は200pmol/ cm^2 であると推定され、それは、炭素18個の鎖を有するアゾピリジニウム化合物のラングミュア-ブロッジエット膜における表面被覆度と類似している。DMSO/緩衝液において得られた表面被覆度は、DMSOにおいて得られた表面被覆度(60pmol/ cm^2)より大きかったが、おそらく、水中におけるガラス状炭素とAzo-QPS-C16の間の相互作用がより強いためである。紫外可視およびDLSの測定において使用されたものと同様の様々なpH値の緩衝液で吸着層のボルタンメトリーを試験した。 $E_{1/2}$ 対pHをプロットすると、-61mV/pHユニットの勾配が明らかになり、これにより、1電子当たり1プロトンの移動プロセスが示唆される。

20

30

【0037】

サイクリックボルタンメトリー(CV)。作用電極は、1 μmのアルミナで研磨し次いで多量の水ですすいだ5mmのガラス状炭素ディスク(0.79 cm^2)であった。セルは、Pt補助電極および3%寒天+0.2mol/Lの KNO_3 塩橋におけるAg/AgCl/1mol/LのKCl基準電極を有するガラスバイアルであった。ガラス器具は、3mol/Lの HNO_3 に終夜浸漬することによって洗浄した。CVは、Model 920D Scanning Electrochemical Microscope System(CH Instruments社、Austin, TX)のポテンシオスタットを使用して行った。

【0038】

(実施例6)

様々なバイオマーカーについての無標識電気化学的方法。

40

【0039】

心筋トロポニン(cTn)の定量化のための高感度電気化学(HSEC)は、cTnTとその抗体との相互作用によるAzo-QPS-16の電気化学的酸化還元応答の変化に基づいている(TnTは、トロポニン複合体と細いフィラメントの相互作用を調節するトロポミオシン結合サブユニットである)。応答は、電気化学的分析方法であるサイクリックボルタモグラメトリー(CV)および矩形波ボルタモグラメトリー(SWV)により評価される。cTnTのレベルは、電極上に吸着されたAzo-QPS-16のピーク電流の変化によって反映される。具体的には、作用電極が、Azo-QPS-16、特異的結合のためのcTnTモノクローナル抗体、ならびに金属ナノ粒子およびキトサンを含む他の感度向上成分で被覆される。高濃度のcTnTは、抗原抗体相互作用によ

50

り電極に付着しているタンパク質の量を上げ、したがって電子移動およびピーク電流を下げる。ピーク電流の変化は、溶液中のcTnTの濃度に比例している。それらの数学的な相関は、抗原抗体相互作用、バイオセンサーの設計、および実験のパラメータにより定義され、それらは実験を通して最適化される。PBSとプールされたヒト唾液との両方におけるcTnTの濃度を決定するために、校正曲線を確立した。このHSECアッセイは、無標識プロセスであり、検体に対する処理を必要としない。抗体の選択および対応する校正曲線の提供により、HSECアッセイは、心筋トロポニンI(抑制性、cTnI)や他の抗原などの他のバイオマーカーの定量化において使用することができる。

【0040】

(実施例7) 溶液におけるアセンブリの化学的性質。

10

【0041】

NMRスペクトルによって明らかになった化学的性質により、Azo-QPS-C16/2のアセンブリにおけるフェニル-アゾ-ピリジニウムコア部の役割が重要であることが確認される。さらに、NMRスペクトルは、これらの化合物と塩基の間に相互作用があるということを示唆する。混合物のスペクトルは、多くの点で成分のスペクトルと異なる。第一に、芳香環のプロトンおよびQPSの尾部の第1の炭素のピークは、非常にブロードな共鳴シグナルを生じる;第二に、TEAのプロトンは観察できない;第三に、他のプロトンのピークでは、積分におけるピークシフトまたは変化は確認されない;最後に、新しいピークは出現しない。ピークのブロード化および観察できないプロトンは、おそらくアセンブリによるものであり、これは、低分子量種で形成された超分子ゲルにおいて報告されており、DLSにより決定された粒子形成とよく一致する。アセンブリは、相関時間を大幅に増加させ、したがって、非常に短い緩和時間、および非常にブロードなまたは観察できないシグナルをもたらす。さらに、TEAプロトンが欠けていることは、それがアセンブリに参与していることを示唆している。TEAは塩基であり、弱酸性で $pK_a=5.33$ であるAzo-QPS-C16と相互作用することができる。この相互作用の生成物は、塩基とAzo-QPS-C16によって形成された化学複合体であり得る。紫外可視スペクトルにおける塩基誘導レッドシフトおよびDLSによって決定されたアセンブリと組み合わせた上記のNMRの結果に基づいて、本発明者は、TEAとAzo-QPS-C16の相互作用が、2つ以上のAzo-QPS-C16分子と塩基によって形成される、密に積み重ねられた π -コンジュゲートコア部のアセンブリを引き起こすと考える。モデルが予測される。このモデルは、Azo-QPS-C16分子のtrans-異性体のコア部が平行に並べられたサンドイッチ型積み重ね立体構造を使用する。さらに、Azo-QPS-C16分子は、ピリジニウム塩の正電荷によるQPS部分間の潜在的な反発を最小限に抑える交互の頭-尾配列で充填されている。TEAとAzo-QPS-C16の相互作用はQPS部分の近くで起こっている可能性が最も高いところ、この積み重ねモデルはTEAの関与も最大限にする。ピリジニウム尾部の第1の炭素上のプロトンに帰属する、d-DMSO中4.69ppm(CDCl₃中5.11ppm)におけるブロード化している共鳴シグナルは、そのような可能性を強く示唆する。電荷による反発および潜在的立体障害の結果として、頭-尾配列が、頭-頭または尾-尾配列より好ましくなり、最も不透過性の高いフェニル-アゾ-ピリジニウムコア部の充填を生み出す可能性が高い。さらに、TEAおよびそのAzo-QPS-C16分子との相互作用も、既に密に積み重ねられているコア部のアクセスに対してシャッターとして機能し、したがってコア部を残りのAzo-QPS-C16分子から隔離することができる。結果として、共鳴シグナルの明瞭な可観測性が、NMR分光計で検出される。最後に、相互作用および凝縮された積み重ねによって、アセンブリ内でQPS部分の正電荷が再分布される。アセンブリの電荷(n+)は、関与しているAzo-QPS-C16分子の数(N)および塩基部分の関与と関係付けられる。

20

30

40

【0042】

(実施例8)

pH感受性および酸増強抗細菌効力の、相関するが異なる機構。

【0043】

上記の結果から、Azo-QPS-C16は、溶液および吸着膜の両方において多機能性およびpH感受性であることが示される。溶液において、pH感受性は、酸-塩基の相互作用によって

50

引き起こされ、密に積み重ねられた π -コンジュゲートフェニル-アゾ-ピリジニウムコア部と塩基の様々なアセンブリ段階をもたらす。水溶液または水分を含む溶媒中において、塩基部分の関与は OH^- イオンまたはその誘導体であり得る。吸着膜において、pH感受性は、おそらくアゾベンゼンからヒドラゾベンゼンへの還元およびその逆から起こる酸化還元対に起因する。両方の状態において、pH感受性は、フェニル-アゾ-ピリジニウムコア部の化学的性質と密接な相互関係を有する。QPS尾部の鎖長が溶液中のpH感受性に与える影響は最小限である。しかし、長い炭素鎖は、両親媒性、カチオン、電荷密度および対イオンを含む複数の因子の組合せによって決まる、酸増強抗細菌効力にとって重要である。酸性条件では、*E. coli*および*S. mutans*に対するAzo-QPS-C16のMBCは、それぞれ $2.5 \mu\text{g/mL}$ および $1.25 \mu\text{g/mL}$ であった。それに比べて、その短鎖類似体(Azo-QPS-C2)は、400~800倍高い濃度においてさえ細菌増殖を阻害しなかった。鎖長に対応する抗細菌効力のそのような明瞭な差異は、強力な抗細菌性QPSの必要とされる両親媒性をもたらすことにおける長鎖炭素尾部の重要性を立証するだけでなく、広範囲の抗細菌効力を有するpH感受性材料を設計および調製するためのツールも提供する。さらに、弱塩基性条件では、Azo-QPS-C16分子は、塩基と相互作用して、何十ものAzo-QPS-C16分子を含有する平均流体力学的径 $51 \pm 1 \text{ nm}$ のナノ粒子を形成する。各Azo-QPS-C16分子および1つの粒子を個々の有効な抗細菌性部位と仮定すると、pHの調整によって、遊離分子の数およびそれらのアセンブリが変わり、そのことにより、有効な部位の数ひいては抗細菌活性が制御される。

10

【図1】

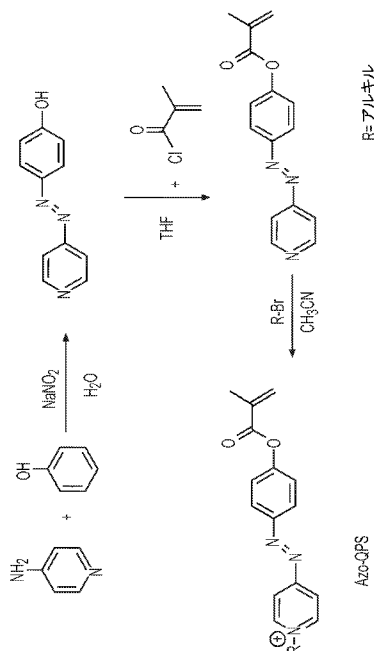


FIG. 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/55283
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07C 245/06; A61K 31/655 (2017.01) CPC - C07C 245/06; C07C 245/02; A61K 31/655; G01N 33/53		
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)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3,997,519 A (ARMBRUSTER) 14 December 1976 (14.12.1976) abstract; col 7, Example 2	1-20
A	US 4,407,748 A (GORBACHEVA et al.) 04 October 1983 (04.10.1983) col 4, ln 10-30, Example 2; col 6, ln 35 to col 7, ln 45	1-20
A	US 7,205,347 B2 (GHARAVI et al.) 17 April 2007 (17.04.2007) col 1, ln 16-25; col 13-14, Compound 46	1-20
A	US 7,288,639 B2 (DAVID et al.) 30 October 2007 (30.10.2007) col 2, ln 64 to col 3, ln 30; col 35, ln 20-45, compound 8; col 36, ln 5-30, compound 10	1-20
A	OMIDI et al. 'Synthesis and evaluation of in vitro antibacterial and antioxidant activity of 4-((3-formyl-4-hydroxyphenyl) diazenyl)-alkylpyridinium derivatives', The 24th Iranian Seminar of Organic Chemistry, Azarbaijan Shahid Madani University, 24-26 August 2016, pg 1. Retrieved from the internet URL: lu.ac.ir/usersfiles/380397.8273703.4251684.93154.pdf; abstract	1-20
☐ 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 16 November 2017		Date of mailing of the international search report 26 DEC 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 27/327 (2006.01)	G 0 1 N 27/327	3 5 7
G 0 1 N 27/416 (2006.01)	G 0 1 N 27/416	3 5 3 Z
G 0 1 N 27/333 (2006.01)	G 0 1 N 27/333	3 3 1 A
	G 0 1 N 27/416	3 4 1 Z

(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, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100095500
弁理士 伊藤 正和

(74)代理人 100111235
弁理士 原 裕子

(72)発明者 サン、 ジルン
アメリカ合衆国 2 0 8 9 8 メリーランド州 ゲイザースバーグ ビューロー ドライブ 1 0
0 ストップ 8 5 4 6 ドクター アンソニー ボルプ リサーチ センター

F ターム(参考) 4C055 AA04 BA01 CA01 DA54 DB17
4C086 AA01 AA02 AA03 DA30 MA01 MA04 NA14 ZB35

专利名称(译)	具有增酸抗菌作用的偶氮型季吡啶鎓盐，其使用方法，合成方法及其用途		
公开(公告)号	JP2019537569A	公开(公告)日	2019-12-26
申请号	JP2019520429	申请日	2017-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	埃迪光芒基金会		
申请(专利权)人(译)	エイディー鯉魚基金会		
当前申请(专利权)人(译)	エイディー鯉魚基金会		
[标]发明人	サンジルン		
发明人	サン、ジルン		
IPC分类号	C07D213/76 A61K31/655 A61P31/04 G01N33/543 G01N33/53 G01N27/327 G01N27/416 G01N27/333		
CPC分类号	A61P1/02 A61P31/04 C07D213/76 C08F220/34 A61K31/44 A61K47/56 G01N33/5438 G01N33/6887 G01N33/84 G01N2333/78 C07D213/20 C08F26/06 C08F126/06 C08F226/06		
FI分类号	C07D213/76.CSP A61K31/655 A61P31/04 G01N33/543.501P G01N33/53.D G01N27/327.357 G01N27/416.353Z G01N27/333.331A G01N27/416.341Z		
F-TERM分类号	4C055/AA04 4C055/BA01 4C055/CA01 4C055/DA54 4C055/DB17 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/DA30 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一 原 裕子		
优先权	15/723763 2017-10-03 US 62/408826 2016-10-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

新的偶氮季吡啶鎓盐 (Azo-QPS) 在酸性条件下 (例如pH = 5) 显示出增强的活性。在中性或碱性条件下, 这种新型的Azo-QPS表现出低得多的抗菌活性 (低2-50倍)。使用这种“刺激增强型”抗生素可以直接对细菌生长产生反应。它有助于减少或防止强效抗菌剂在口腔环境中积聚。当环境pH呈酸性时, Azo-QPS的抗菌性能将被“激活”。该酸性pH可以指示变形链球菌的积累或龋齿的发作。

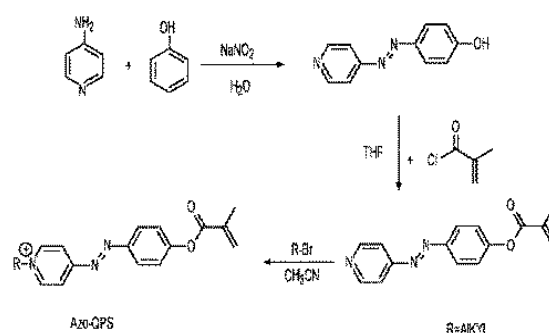


FIG. 1