(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114585316 A
(43)申请公布日 2022.06.03

(21)申请号 202080066011.3
(22)申请日 2020.07.24
(30)优先权数据
62/878,199 2019.07.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/043563 2020.07.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/016583 EN 2021.01.28
(71)申请人 布莱阿姆青年大学
地址 美国犹他州
(72)发明人 保罗·B·萨维奇 亚伦·辛德勒 彼得·瓦尔切夫 苏迈德·坎布尔
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 张珊珊
(51)Int.Cl.
A61B 17/80(2006.01)
A61B 17/70(2006.01)
A61B 17/72(2006.01)

权利要求书3页 说明书19页 附图8页

(54)发明名称

骨结合化合物

(57)摘要

本文中公开了具有下式(I)的化合物或其可药用盐形式:B-L-C(I),其中B是骨结合部分;L是接头;并且C是阳离子甾体抗微生物(CSA)部分,包含所述化合物的药物组合物,以及使用所述化合物或药物组合物用于在对象的骨中治疗感染或骨髓炎、在对象中促进骨形成或在对象中治疗骨癌或转移性骨癌的方法。

CN 114585316 A

1.具有下式(I)的化合物或其可药用盐形式：

B-L-C(I)

其中：

B是骨结合部分；

L是接头；并且

C是阳离子甾体抗微生物(CSA)部分。

2.权利要求1所述的化合物，其中所述CSA选自：CSA-8、CSA-13、CSA-44、CSA-90、CSA-91、CSA-124、CSA-131、CSA-133、CSA-138、CSA-142、CSA-190、CSA-191和CSA-192，例如其中所述CSA是CSA-13、CSA-90或CSA-131，优选CSA-90。

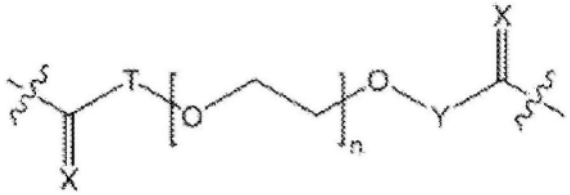
3.权利要求1或2所述的化合物，其中所述骨结合部分是双膦酸盐，例如其中所述双膦酸盐选自：依替膦酸盐、氯膦酸盐、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐、亚甲基二膦酸盐、依替膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、氨基亚甲基二膦酸盐、利塞膦酸盐和唑来膦酸盐，优选地，所述双膦酸盐选自阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐和奈立膦酸盐，更优选地，所述双膦酸盐是阿仑膦酸盐。

4.权利要求1至3中任一项所述的化合物，其中所述接头是亲水性的。

5.权利要求1至4中任一项所述的化合物，其中所述接头的分子量小于约2kDa。

6.权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)。

7.权利要求1至6中任一项所述的化合物，其中所述接头具有以下结构：



其中：

X独立地选自O和S；

T不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

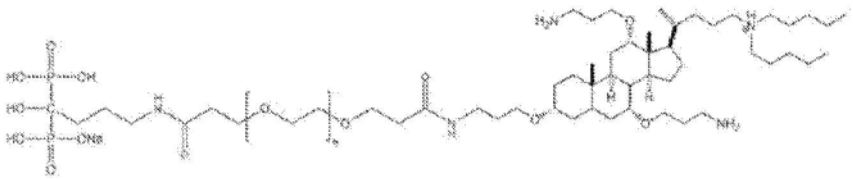
Y不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

n是1至30的整数，并且

波浪线表示与所述CSA和骨结合部分的连接点。

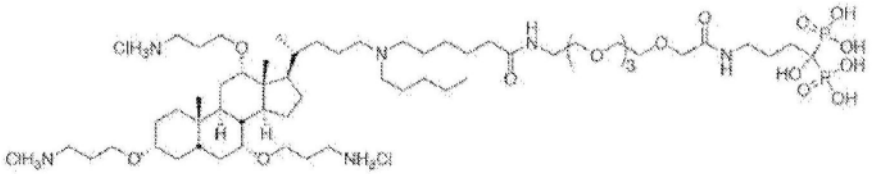
8.权利要求7所述的化合物，其中X是O，T是具有1至15个碳原子的烷二基，例如具有1至6个碳原子的烷二基，Y是具有1至15个碳原子的烷二基，例如具有1至6个碳原子的烷二基，并且n是10至20的整数。

9.权利要求1至8中任一项所述的化合物，其中所述化合物具有以下结构：



其中n为1至50，例如其中n为1至30，并且其中所述化合物的分子量为约1.5kDa至2.5kDa。

10.权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构:



(IV)

11.药物组合物,其包含权利要求1至10中任一项所述的化合物以及可药用载体。

12.权利要求11所述的药物组合物,其中所述组合物适合于全身性施用。

13.权利要求11或12所述的药物组合物,其中所述组合物适合于经口施用或肠胃外施用。

14.权利要求11或12所述的药物组合物,其中所述组合物适合于静脉内施用。

15.在对象中治疗骨感染的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物。

16.权利要求15所述的方法,其中所述感染是细菌感染,例如其中所述感染是金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)感染、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)感染或铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)感染。

17.权利要求15或16所述的方法,其中所述骨包含骨折。

18.权利要求15至17中任一项所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物全身性地施用于所述对象。

19.权利要求15至18中任一项所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物经口或肠胃外施用于所述对象。

20.权利要求15至18中任一项所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物静脉内施用于所述对象。

21.权利要求15至20中任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物,例如其中所述对象是人。

22.在对象中治疗骨髓炎的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物。

23.权利要求22所述的方法,其中所述骨髓炎与金黄色葡萄球菌感染、表皮葡萄球菌感染或铜绿假单胞菌感染相关。

24.权利要求22或23所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物经口或肠胃外施用于所述对象。

25.权利要求22或23所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物静脉内施用于所述对象。

26.权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述对象是哺乳动物,例如其中所述对象是人。

27.在对象中促进骨形成的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物。

28.权利要求27所述的方法,其中所述对象患有选自以下的骨病症:骨折、脊髓损伤、脊椎盘退变、佩吉特病、骨癌、转移性骨癌和骨质疏松症。

29.权利要求27或28所述的方法，其中所述对象的骨被一种或更多种细菌物种感染，例如被金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌或铜绿假单胞菌中的一种或更多种感染。

30.权利要求27至29中任一项所述的方法，其中所述化合物或所述药物组合物全身性地施用于所述对象。

31.权利要求27至30中任一项所述的方法，其中所述化合物或所述药物组合物经口或肠胃外施用于所述对象。

32.权利要求27至30中任一项所述的方法，其中所述化合物或所述药物组合物静脉内施用于所述对象。

33.权利要求27至32中任一项所述的方法，其中所述对象是哺乳动物，例如其中所述对象是人。

34.根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物在制备用于在对象中治疗骨感染的药物中的用途。

35.根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物在制备用于在对象中治疗骨髓炎的药物中的用途。

36.根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物在制备用于在对象中促进骨形成的药物中的用途。

37.根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或权利要求11至14中任一项所述的药物组合物在制备用于在对象中治疗骨癌或转移性骨癌的药物中的用途。

骨结合化合物

背景技术

[0001] 本公开内容涉及抗生素化合物，并且特别是与骨结合并且可用于治疗骨感染的抗生素化合物。

[0002] 在整个说明书中对现有技术的任何讨论都不应被视为承认这样的现有技术是广泛已知的或构成本领域公知常识的一部分。

[0003] 开放性骨折(open fracture)感染是全世界发病率和死亡率的主要原因(Tay et al.Injury.2014.45:1653-1658;Wu.Othrop Res Rev.2013.5:21-33)。即使在伤口没有明显污染时，与同等闭合性骨折相比，开放性骨折变得被感染的风险通常也会提高。在不存在骨折的情况下也可能出现骨感染。例如，在骨髓炎(osteomyelitis)中，细菌可通过血流或通过从附近组织扩散(例如从糖尿病足感染)到达骨。感染也可能起源于使骨暴露于细菌的损伤之后的骨。另外，植入物可导致骨感染。

[0004] 治疗骨感染由于其相对较低的血管形成及其位于身体软组织下方的位置而变得复杂。可能需要高剂量的全身性药物和长期的治疗方案以在感染部位提供有效浓度的药物。然而，这可导致有害的副作用，并从而限制某些抗生素的使用。虽然已经探索了将抗生素局部递送到手术部位，但这种方法仍处于实验阶段并需要开放的手术部位。此外，长时期广泛的抗生素使用已导致产生抗生素抗性细菌菌株。社区获得性抗生素抗性菌株例如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、甲氧西林抗性表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、万古霉素抗性葡萄球菌属(Staphylococcus spp.)和妥布霉素抗性铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)的发生率正在提高，据报道在美国比率高至25％。(Chen et al.Clin Orthop Relat Res.2013.471:3135-3140;Stevens.Curr Opin Infect Dis.2003.16:189-191)。

[0005] 在这种情况下，需要新的抗生素和抗生素治疗，特别是用于骨科应用。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开内容涉及抗生素化合物，并且特别是与骨结合并且可用于治疗骨感染的抗生素化合物。在产生本公开内容的工作中，本发明人通过接头将阳离子甾体抗微生物(cationic steroid antimicrobial,CSA)与骨结合部分缀合。骨结合部分将CSA部分靶向至骨，从而在治疗现有感染并预防后续感染二者或在感染风险提高的情况下提高CSA部分在骨感染部位的浓度。

[0008] 本文中公开了具有下式(I)的化合物或其可药用盐形式：

[0009] B-L-C(I)

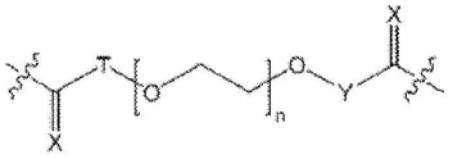
[0010] 其中：B是骨结合部分；L是接头；并且C是阳离子甾体抗微生物(CSA)部分。

[0011] 在一些实施方案中，CSA选自CSA-8、CSA-13、CSA-44、CSA-90、CSA-91、CSA-124、CSA-131、CSA-133、CSA-138、CSA-142、CSA-144、CSA-190、CSA-191和CSA-192。在一些实施方案中，CSA是CSA-90。

[0012] 在一些实施方案中，骨结合部分是双膦酸盐，例如选自以下的双磷酸盐：依替膦酸盐、氯膦酸盐、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐、亚甲基二膦酸盐、依替膦酸盐、奈立膦酸盐

(neridronate)、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、氨基亚甲基二膦酸盐、利塞膦酸盐和唑来膦酸盐。在一些实施方案中，双膦酸盐选自阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐和奈立膦酸盐。在一些实施方案中，双膦酸盐是阿仑膦酸盐。

[0013] 在一些实施方案中，接头是亲水性的。在一些实施方案中，接头的分子量小于约2kDa。在一些实施方案中，接头包含聚乙二醇(PEG)，例如其中接头具有式(II)结构：

[0014] 

(II),

[0015] 其中，

[0016] X独立地选自O和S；

[0017] T不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

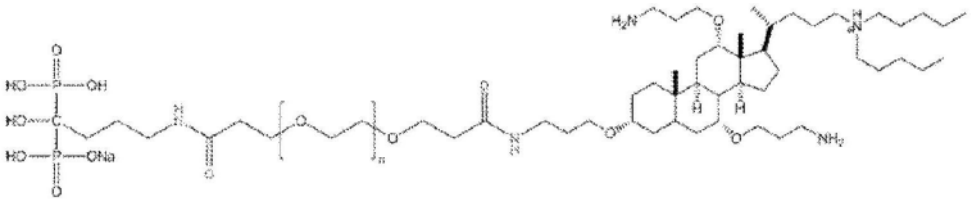
[0018] Y不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

[0019] n是从1至30的整数，并且

[0020] 波浪线表示与CSA和骨结合部分的连接点。

[0021] 在一些实施方案中，X是O。在一些实施方案中，T是具有1至15个碳原子的烷二基。在一些实施方案中，Y是具有1至15个碳原子的烷二基。在一些实施方案中，T是具有1至6个碳原子的烷二基。在一些实施方案中，Y是具有1至6个碳原子的烷二基。在一些实施方案中，n是10至20的整数。

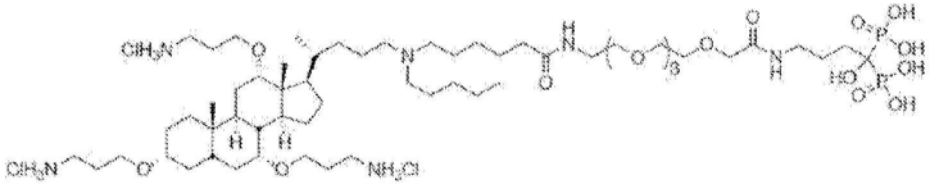
[0022] 在一些实施方案中，所述化合物具有式(III)结构：

[0023] 

(III),

[0024] 其中n为1至50。在一些实施方案中，n为1至30。在一些实施方案中，化合物的分子量为约1.5kDa至约2.5kDa。

[0025] 在一些实施方案中，所述化合物具有式(IV)结构：

[0026] 

(IV).

[0027] 还提供了包含本文中公开的化合物以及可药用载体的药物组合物。在一些实施方案中，所述组合物适合于全身性施用。在一些实施方案中，所述组合物适合于经口施用或肠胃外施用。在一些实施方案中，所述组合物适合于静脉内施用。

[0028] 还提供了在对象中治疗骨感染的方法，其包括向对象施用本文中公开的化合物或药物组合物。在一些实施方案中，感染是细菌感染，例如金黄色葡萄球菌感染、表皮葡萄球

菌感染或铜绿假单胞菌感染。在一些实施方案中,骨包含骨折(fracture)。

[0029] 还提供了在对象中治疗骨髓炎的方法,其包括向对象施用本文中公开的化合物或药物组合物。在一些实施方案中,骨髓炎与金黄色葡萄球菌感染、表皮葡萄球菌感染或铜绿假单胞菌感染相关。

[0030] 还提供了在对象中促进骨形成的方法,其包括向对象施用本文中公开的化合物或药物组合物。在一些实施方案中,对象患有选自以下的骨病症:骨折、脊髓损伤、脊椎盘退变(spinal disc degeneration)、佩吉特病(Paget's disease)、骨癌、转移性骨癌和骨质疏松症。在一些实施方案中,对象的骨被一种或更多种细菌物种感染,例如被金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌或铜绿假单胞菌中的一种或更多种感染。

[0031] 在一些实施方案中,所述化合物或药物组合物全身性地施用于对象。在一些实施方案中,所述化合物或药物组合物经口或肠胃外施用于对象。在一些实施方案中,所述化合物或药物组合物静脉内施用于对象。在一些实施方案中,对象是哺乳动物。在一些实施方案中,对象是人。

[0032] 还提供了本文中公开的化合物或药物组合物在制备用于在对象中治疗骨感染的药物中的用途。

[0033] 还提供了本文中公开的化合物或药物组合物在制备用于在对象中治疗骨髓炎的药物中的用途。

[0034] 还提供了本文中公开的化合物或药物组合物在制备用于在对象中促进骨形成的药物中的用途。

[0035] 还提供了本文中公开的化合物或药物组合物在制备用于在对象中治疗骨癌或转移性骨癌的药物中的用途。

[0036] 附图简述

[0037] 图1A至C.BBA-1(图1A)、纯NHS-PEG-COOH接头(图1B)和纯CSA-90(图1C)的HPLC谱。

[0038] 图2A至D.阿仑膦酸盐(图2A)、CSA-90(图2B)、NHS-PEG-COOH接头(图2C)和BBA-1(图2D)的FT-IR谱。

[0039] 图3A.BBA-1、NHS-PEG-COOH接头、CSA-90和阿仑膦酸盐的^{1}H NMR谱。

[0040] 图3B.BBA-1和阿仑膦酸盐的^{31}P NMR谱。

[0041] 图4A至C.图4A示出了针对金黄色葡萄球菌和MRSA的Kirby Bauer测定(结果来自含有每个样品一式三份的单个实验)。图4B示出了抑制区的代表性图像(针对金黄色葡萄球菌和MRSA的Kirby Bauer测定)。图4C示出了CSA-90和BBA-1的MIC和MBC。

[0042] 图5A至B.HA结合测定。

[0043] 图6.测试了BBA-1对培养的成骨细胞的促成骨作用的碱性磷酸酶活性测定(对硝基苯磷酸酯)。

[0044] 图7.示出了BBA-1和CSA-90对甲羟戊酸途径缺乏作用的蛋白质异戊二烯化测定。

[0045] 图8.来自涉及施用于小鼠的BBA-1的毒性研究的数据,其示出了与软组织拭子测定(swab assay)相关的感染。

[0046] 图9.来自涉及施用于小鼠的BBA-1的毒性研究的数据,其示出了与销测定(pin assay)相关的感染。

[0047] 发明详述

[0048] 定义

[0049] 未用数量词限定的名词在本文中用于指示一个或多于一个(即至少一个)指示对象。

[0050] 术语“约”被理解为是指±10%的范围,例如±5%、或±1%、或±0.1%。

[0051] 术语“同时施用”及其变形或“共施用”等是指施用含有两种或更多种活性物的单组合物,或将每种活性物作为单独的组合物施用和/或通过单独的途径同时期或同时或在足够短的时间内顺序递送,以使有效结果等同于当所有这样的活性物作为单组合物施用时所获得的结果。“同时”意指活性剂基本上同时施用,并且优选在同一制剂中一起施用。

[0052] 本说明书和权利要求书中的术语“包含”及其变形、“包括”或“具有”等以包含的意义使用,即指定所陈述特征的存在但不排除另外或其他特征的存在。

[0053] 本文中使用的术语“可药用”是指当施用于对象时不会引起实质性不良变应性或免疫反应的物质。“可药用载体”包括但不限于溶剂、包衣剂、分散剂、润湿剂、等张剂和吸收延迟剂以及崩解剂。

[0054] “预防”包括降低病症或障碍的风险、发生率和/或严重程度。术语“治疗”及其变形包括预防性或预防治疗二者(预防和/或减慢目标病理状况或病症的发展)和治愈性、治疗性或疾病改善性治疗,包括治愈、减慢,减轻病理状况或病症的症状和/或阻止病理状况或病症的进展的治疗措施;以及治疗处于感染疾病风险或怀疑已经感染疾病的患者,以及患病或被诊断患有疾病或医学病症的患者。术语“治疗”及其变形并不一定意味着对对象进行治疗直到完全康复。术语“治疗”及其变形还指维持和/或促进未患疾病但可能易于发展不健康状况的个体的健康。术语“治疗”及其变形还旨在包括增强或以其他方式增强一种或更多种初级预防性或治疗性措施。作为一些非限制性实例,治疗可由患者、护理人员、医生、护士或其他医疗保健专业人员进行。

[0055] 术语“烷二基”被理解为是指符合式C_nH_{2n}的二价饱和支链或直链烃基。

[0056] 阳离子甾体抗微生物部分

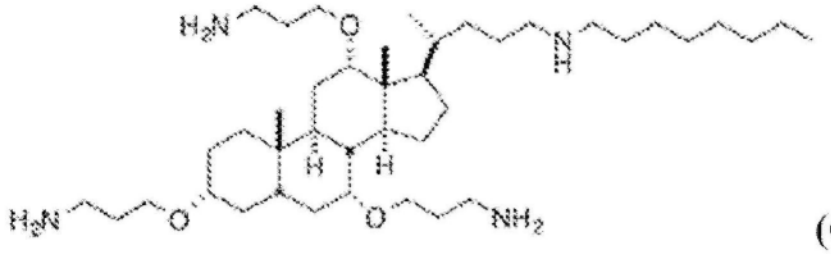
[0057] 阳离子甾体抗微生物(CSA)或塞拉集宁(ceragenin)是旨在模拟内源性抗菌肽活性的合成化合物。它们通常是阳离子的并且具有广谱的抗微生物活性,包括抗细菌、抗真菌和抗病毒的活性,以及抗炎和免疫调节活性。已合成了超过100种CSA。

[0058] 据报道,CSA例如CSA-13、CSA-90和CSA-131促进或增强骨发生(美国专利No.9,694,019;Schindeler et al.J Bone Joint Surg Am.2015.97(4):302-309)。骨是动态组织,并且其稳态代表了骨形成与骨吸收之间的平衡。在骨形成中,成体干细胞分化成具有成熟成成骨细胞、骨细胞并形成成熟骨和矿化基质的能力的骨祖细胞(bone progenitor cell)(即骨原细胞(osteoprogenitor cell))。在骨吸收中,破骨细胞(吸收骨组织的细胞)溶解矿化基质并在骨表面产生腔。尽管骨组织具有使自己复原的能力,但修复非愈合性骨折和再生骨缺损仍然是重大挑战。事实上,骨现在是仅次于血液的移植最多的组织。在此背景下,本文中所述的化合物可用于促进骨形成和/或治疗骨病症。

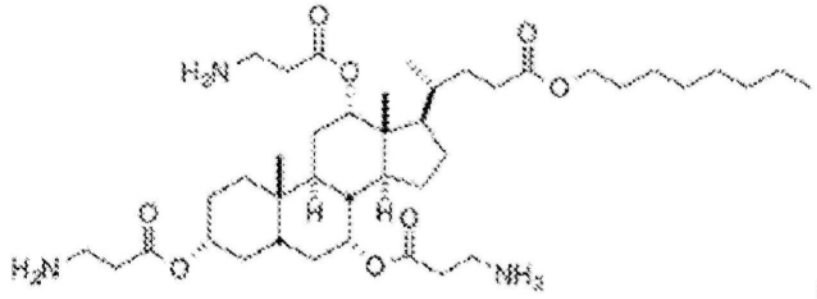
[0059] CSA-90是基于内源性阳离子抗菌肽(例如人抗菌肽LL-37)的小的合成肽模拟化合物。LL-37存在于气道黏液中,并被认为在控制肺中细菌生长中发挥重要作用。CSA-90的甾体样结构使其能够破坏细胞膜,并因此赋予针对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌(包括万古霉素抗性和甲氧西林抗性菌株)的广泛活性。

[0060] 本文中所述的化合物包含通过接头与骨结合部分缀合的CSA部分。CSA部分可以是任何合适的CSA，例如CSA-8、CSA-13、CSA-44、CSA-90、CSA-91、CSA-124、CSA-131、CSA-133、CSA-138、CSA-142、CSA-144、CSA-190、CSA-191或CSA-192。在一些实例中，CSA选自：

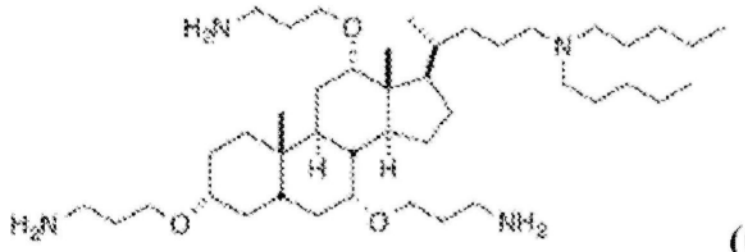
[0061]



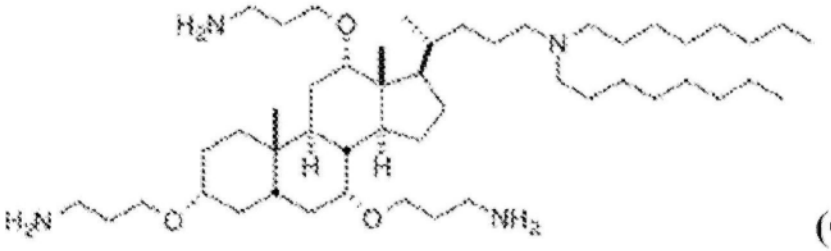
(CSA-13);



(CSA-44);

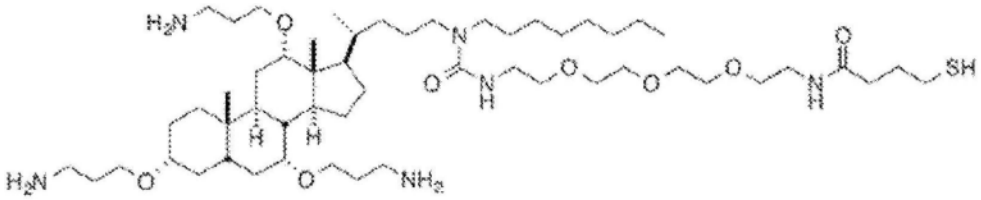


(CSA-90);

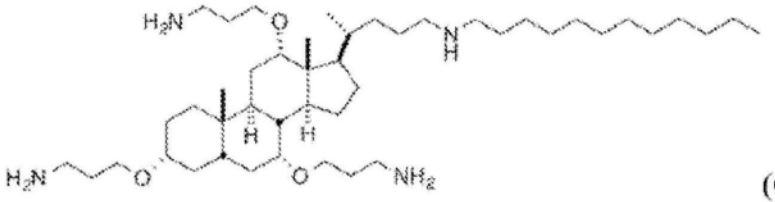


(CSA-91);

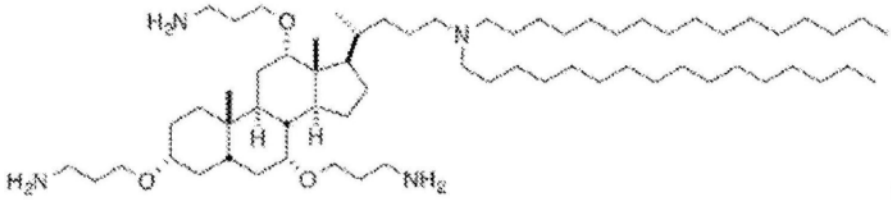
[0062]



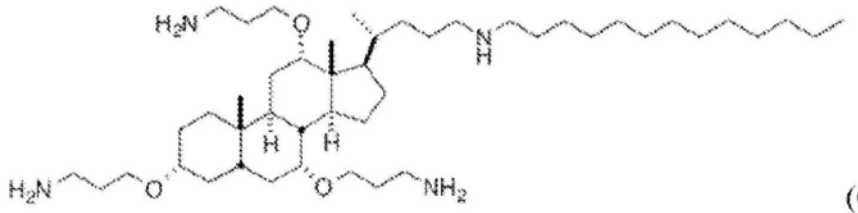
(CSA-124);



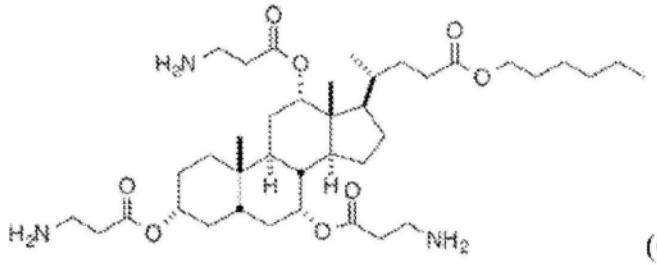
(CSA-131);



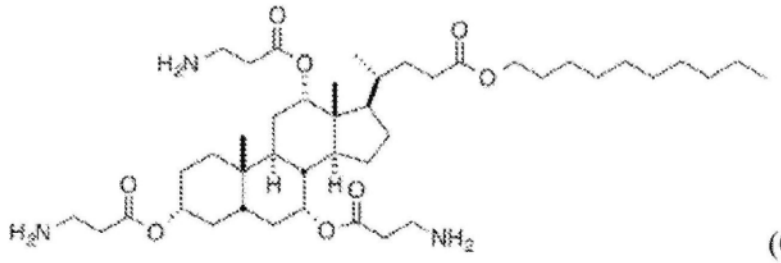
(CSA-133);



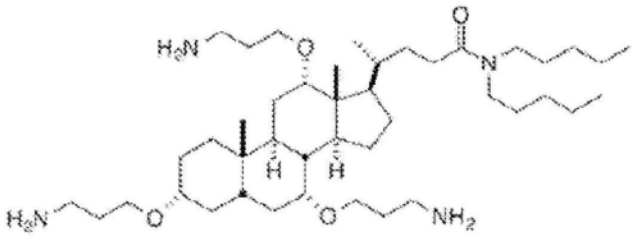
(CSA-138);



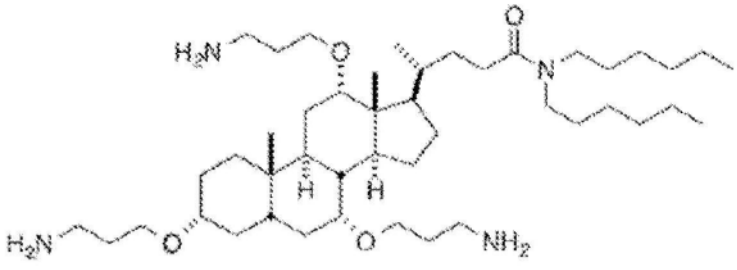
(CSA-142);



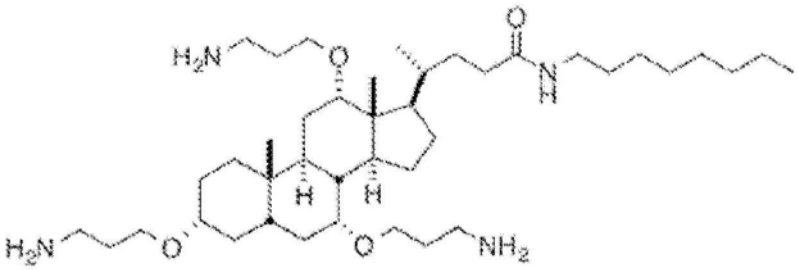
(CSA-144);



(CSA-190);

[0063] 

(CSA-191);和



(CSA-192).

[0064] 在一些实施方案中,CSA部分是CSA-13、CSA-90或CSA-131。在某些实例中,CSA部分是CSA-90。

[0065] CSA部分可通过CSA部分的氨基与接头连接或与CSA分子的烷基侧缀合。

[0066] 一些示例性的CSA及其制备方法描述于美国专利No.6,350,738、6,486,148、6,767,904、7,598,234、7,754,705、8,691,252、8,975,310、9,434,759、9,527,883、9,943,614、10,155,788、10,227,376、10,370,403和10,626,139、美国专利公开No.2016/0311850和2017/0210776、以及美国临时专利申请No.63/025,255和63/028,249中,其通过引用并入本文。

[0067] 骨结合部分

[0068] 本文中所述的骨结合部分是与骨结合的化学基团,从而将本公开内容的化合物靶向至骨。特定部分的骨结合能力可以以多种不同方式测定。例如,骨结合可通过与羟基磷灰石(hydroxyapatite,HA)(即,作为骨主要无机成分的矿物质)结合来测定。羟基磷灰石(HA)亲和力测定可通过在以下中孵育与该部分缀合的化合物来进行:i)水;和ii)包含HA的水。如果该部分是骨结合的,则预期在HA溶液的水相中检测到的化合物的量降低,因为该化合物将结合或吸收到HA表面(参见例如实施例4)。作为对照,可以以相同方式测定缺乏骨结合部分的化合物。本领域技术人员将熟悉可评估特定部分的骨结合能力的其他方法。

[0069] 用于本公开内容的合适的骨结合部分可包括例如含有多羟基的部分、四环素衍生物、酸性氨基酸或肽、羟基化杂环、单膦酸盐、双膦酸盐、抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,骨结合部分是双膦酸盐。

[0070] 双膦酸盐通常包含磷酸盐-碳-磷酸盐骨架,并通过双膦酸盐的磷酸基团与HA中的钙离子之间的配位与羟基磷灰石(HA)(骨中存在的主要矿物质组分)结合。双膦酸盐可通过其末端官能团(氨基双膦酸盐中的胺基)、偕碳(geminal carbon)或通过其磷酸基团中的任一个与接头连接。在一些实施方案中,接头通过与双膦酸盐的偕碳连接的末端官能团(例如如氨基或羟基,或其他反应性基团)与双膦酸盐连接。根据本公开内容可使用的双膦酸盐骨结合部分的一些实例可包括依替膦酸盐、氯膦酸盐、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐、亚甲基二膦酸盐、依替膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、氨基亚甲基二膦酸

盐、利塞膦酸盐和唑来膦酸盐。优选地，骨结合部分是阿仑膦酸盐。

[0071] 接头和化合物变体

[0072] 本文中所述的接头将CSA部分与骨结合部分共价连接，如式(I)所示：

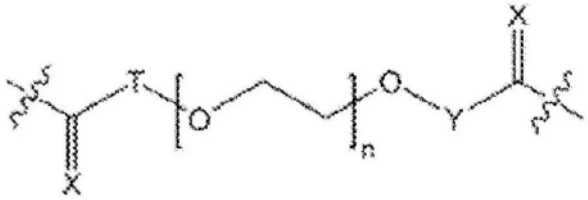
[0073] B-L-C (I)

[0074] 其中B是骨结合部分，L是接头，并且C是CSA。应当理解，式(I)不是定向的并且同样可表示为C-L-B。

[0075] 接头可以是小的，由单个共价键组成，或者它可以是更大的部分，达到10kDa或更大。在一些实施方案中，接头的分子量小于约10kDa，例如小于约9kDa，或小于约8kDa，或小于约7kDa，或小于约6kDa，或小于约5kDa，或小于约4kDa，或小于约3kDa，或小于约2kDa，例如约1kDa或更小。在某些实例中，接头为约0.2kDa至10kDa，例如约0.3kDa至9kDa，或约0.4kDa至8kDa，或约0.5kDa至7kDa，或约0.5kDa至6kDa，或约0.5kDa至5kDa，或约0.5kDa至4kDa，或约0.5kDa至3kDa，或约0.5kDa至2kDa，或约0.5kDa至1.5kDa。

[0076] 接头可包括例如醚、酯、硫酯、磷酸酯、酰胺、肽(例如二肽)、多肽、多糖、疏水接头(例如正构烷烃(strait alkane)、脂肪酸等)或其任何组合。接头可以是可切割接头，例如可水解接头(例如，氨基甲酸酯接头)或组织蛋白酶敏感性接头，或不可切割接头。接头优选地在血流中稳定足够的时间段(例如，超过1小时，例如超过6小时，或超过12小时，或超过18小时，或超过24小时)以使得化合物能够到达骨。接头可以是亲水性的。在一些实施方案中，接头是聚乙二醇(PEG)或包含聚乙二醇(PEG)。PEG接头可具有如先前段落中限定的分子量。

[0077] 在一个实施方案中，接头具有式(II)结构：

[0078] 

(II)，

[0079] 其中：

[0080] X独立地选自O和S；

[0081] T不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

[0082] Y不存在或是具有1至15个碳原子的烷二基；

[0083] n是1至30的整数；并且

[0084] 波浪线表示与CSA和骨结合部分的连接点。

[0085] T可以是具有1至12个碳原子、或1至10个碳原子、或1至8个碳原子、或1至6个碳原子、或1至5个碳原子、或1至4个碳原子的烷二基。

[0086] Y可以是具有1至12个碳原子、或1至10个碳原子、或1至8个碳原子、或1至6个碳原子、或1至5个碳原子、或1至4个碳原子的烷二基。

[0087] 在一些实施方案中，T和Y是$-CH_2CH_2-$。

[0088] n可以是约2至约25、或约2至约25、或约3至约25、或约4至约25、或约5至约25、或约6至约25、或约2至约20、或约2至约20、或约3至约20、或约4至约20、或约5至约20、或约6至约20、或约10至约30、或约10至约25、或约10至约20、或约15至约25、或约12至约20的整数。

[0089] 在一些实施方案中，接头可通过CSA的氨基与CSA部分连接。同样，接头可通过骨结

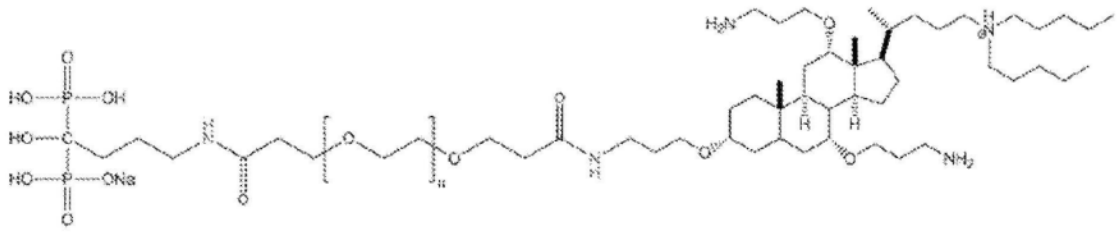
合部分的氨基与骨结合部分连接。

[0090] 由式(I)表示的化合物可包含另一些特征,例如另外的缀合物或部分。例如,所述化合物可包含除CSA之外的第二抗生素部分。在这样的实例中,CSA可与第二抗生素部分直接缀合,例如以B-L-C-A_2的形式,其中A_2是第二抗生素部分。或者,CSA和第二抗生素部分可连接在化合物的相对末端,例如以A_2-B-L-C的形式。合适的第二抗生素可包括环丙沙星(ciprofloxacin)、吉西他滨(gemcitabine)、紫杉醇(paclitaxel)、阿糖胞苷(cytarabine)、利福拉齐(rifalazil)、诺氟沙星(norfloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、加替沙星(gatifloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、氟喹诺酮酯(fluoroquinolone ester)、苯并噁唑霉素(benzoxazinorifamycine)、氨基糖苷(aminoglycoside)、多烯(polyene)、硝咪唑(nitroimidazole)、利福霉素(rifamycin)、杆菌肽(bacitracin)、β-内酰胺(beta-lactam)、头孢菌素(cephalosporin)、氯霉素(chloramphenicol)、糖肽(glycopeptide)、大环内酯(macrolide)、林可酰胺(lincosamide)、青霉素(penicillin)、喹诺酮类(quinolones)、利福平(rifampicin)、四环素(tetracycline)、甲氧苄啶(trimethoprim)磺胺(sulfonamide)、阿莫西林(amoxicillin)、奥格门汀(augmentin)、阿莫西林(amoxicillin)、氨苄西林(ampicillin)、阿洛西林(azlocillin)、氟氯西林(flucloxacillin)、美洛西林(mezlocillin)、甲氧西林(methicillin)、头孢氨苄(cephalexin)、头孢西酮(cefazedone)、头孢呋辛(cefuroxime)、氯碳头孢(loracarbef)、头孢美唑(cemetazole)、头孢替坦(cefotetan)、头孢西丁(cefoxitin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、左氧氟沙星(levaquin)、沙星(floxacin)、多西环素(doxycycline)、米诺环素(minocycline)、庆大霉素(gentamycin)、阿米卡星(amikacin)、妥布霉素(tobramycin)、克拉霉素(clarithromycin)、阿奇霉素(azithromycin)、红霉素(erythromycin)、达托霉素(daptomycin)、新霉素(neomycin)、卡那霉素(kanamycin)、链霉素(streptomycin)、乳链菌肽(nisin)、表皮素(epidermin)、高利丹宁(gallidennin)、肉桂霉素(cinnamycin)、耐久霉素(duramycin)、乳链球菌素481(lacticin 481)、阿莫西林(amoxicillin)、阿莫西林/克拉维酸(clavulanic acid)、甲硝唑(metronidazole)、克林霉素(clindamycine)、金霉素(chlortetracycline)、二氯环素(dcmeclocycline)、土霉素(oxytetracycline)、阿米卡星(amikacin)、奈替米星(netilmicin)、头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢唑啉(cefazolin)、头孢氨苄(cephalexin)、头孢噻吩(cephalothin)、头孢匹林(cephapirin)、头孢雷定(cephradine)、头孢克洛(cefaclor)、头孢孟多(cefamandole)、头孢美唑(cefametazole)、头孢尼西(cefonicid)、头孢替坦(cefotetan)、头孢西丁(cefoxitine)、头孢泊肟(cefpodoxime)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢地尼(cefdinir)、头孢克肟(cefixime)、头孢哌酮(cefoperazone)、头孢噻肟(cefotaxime)、头孢他啶(ceftazidime)、头孢布烯(ceftibuten)、头孢唑肟(ceftizoxime)、头孢曲松(ceftriaxone)、头孢吡肟(cefepime)、阿奇霉素(azithromycin)、头孢噻肟(claforan)、克拉霉素(clarithromycin)、地红霉素(dirithromycin)、红霉素(erythromycin)、林可霉素(lincomycin)、醋竹桃霉素(troleandomycin)、巴氨西林(bacampicillin)、羧苄西林(carbenicillin)、氯唑西林(cloxacillin)、双氯西林(dicloxacillin)、甲氧西林(meticillin)、美洛西林(mezlocillin)、萘夫西林(nafcillin)、苯唑西林(oxacillin)、哌拉西林(piperacillin)、

替卡西林(ticarcillin)、西诺沙星(cinoxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、格帕沙星(grepafloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、洛美沙星(l0mefloxacin)、萘啶酸(nalidixic acid)、诺氟沙星(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、司帕沙星(sparfloxacin)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole)、磺胺西汀(sulfacytine)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、磺胺异噁唑(sulfisoxazole)、氨苯砜(dapson)、氨曲南(aztreonam)、卷曲霉素(capreomycin)、氯法齐明(clofazimine)、多黏菌素E甲磺酸(colistimethate)、黏菌素(colistin)、环丝氨酸(cycloserine)、磷霉素(fosfomycin)、呋喃唑酮(furazolidone)、乌洛托品(methenamine)、呋喃妥因(nitrofurantoin)、喷他脒(pentamidine)、利福布汀(rifabutin)、大观霉素(spectinomycin)、替加环素(tigecycline)、甲氧苄啶(trimethoprim)、曲美沙特葡萄糖醛酸盐(trimetrexate glucuronate)、万古霉素(vancomycin)、氯己定(chlorhexidine)、碳青霉烯(carbapenem)或艾他培南(ertapenem)。

[0091] 所述化合物可包含多于一个骨结合部分。例如,骨结合部分可与彼此直接连接,例如以B_1-B_2-L-C的形式,或者它们可连接在化合物的相对末端,例如以B_1-L-C-B_2的形式,其中B_1和B_2是相同或不同的骨结合部分。本公开内容设想了抗生素和骨结合部分的另外的组合和添加,并且所述另外的组合和添加对于本领域技术人员将是清楚的。

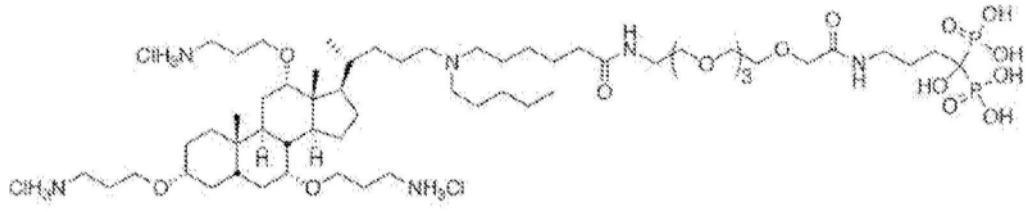
[0092] 在某些实例中,本公开内容提供了具有如式(III)(BBA-1)所示结构的化合物:

[0093] 

(III),

[0094] 其中n为1至100。在某些实例中,n为1至95、或1至90、或1至85、或1至80、或1至75、或1至70、或1至65、或1至60、或1至55、或1至50、或1至45、或1至40、或1至35、或1至30、或5至30、或5至25、或5至20、或10至20。所述化合物的分子量可以为约1kDa至10kDa、例如约1kDa至9kDa、或约1kDa至8kDa、或约1kDa至7kDa、或约1kDa至6kDa、或约1kDa至5kDa、或约1kDa至4kDa、或约1kDa至3kDa、或约1.5kDa至3kDa、或约1.5kDa至2.5kDa、或约1.75kDa至2.25kDa,例如约2kDa。

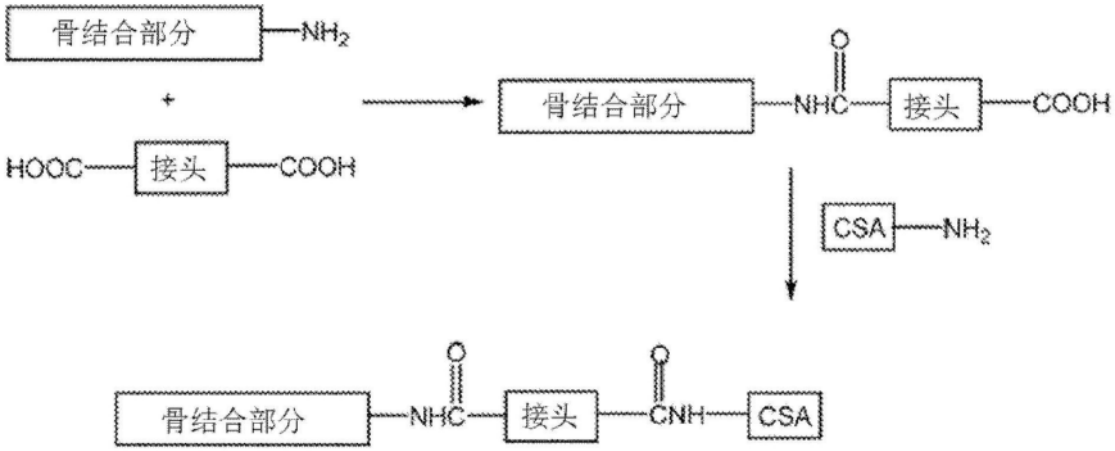
[0095] 在某些实例中,本公开内容提供了具有式(IV)(BBA-2)所示结构的化合物:

[0096] 

(IV).

[0097] 式(I)化合物可例如通过使适当官能化的接头与CSA和骨结合部分反应来制备。下面的方案1中示出了一个这样的实例。

[0098]



[0099] 方案1:式(I)化合物的示例性合成

[0100] 在方案1中,具有氨基的骨结合部分与用两个末端羧酸基团(其中一个羧酸基团可被激活)官能化的接头反应以提供中间体,其中骨结合部分通过酰胺键与接头连接。然后中间体中存在的羧酸与CSA的氨基反应以产生另一个酰胺键,并从而提供式(I)化合物。本领域技术人员将熟悉可用于制备式I化合物的替代合成方法。

[0101] 方法和组合物

[0102] 本文中所述的化合物通过其骨结合部分靶向骨并且可用于治疗骨感染。感染可以是细菌感染,例如革兰氏阳性细菌感染或革兰氏阴性细菌感染。在一些实例中,细菌感染是葡萄球菌(staphylococcus)或假单胞菌(pseudomonas)感染,例如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌或铜绿假单胞菌感染,例如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌、甲氧西林抗性表皮葡萄球菌或妥布霉素抗性铜绿假单胞菌感染。在一些实例中,细菌感染是万古霉素抗性金黄色葡萄球菌。虽然表皮葡萄球菌有时被认为是比金黄色葡萄球菌毒性更低的病原体,但报告表明表皮葡萄球菌菌株可能具有更强的侵入特性,并且在形成生物膜方面同样有效,特别是在骨科植入物上(Gill et al.J Bacteriol.2005.187:2426-2438)。在一些实例中,细菌感染是放线共生放线杆菌(Aggregatibacter actinomycetemcomitans)感染。放线共生放线杆菌通常在颚骨骨髓炎的情况下观察到。

[0103] 在另一些实施方案中,骨感染是真菌感染,例如念珠菌属(Candida)种感染。

[0104] 在一些实施方案中,感染由骨科植入物、骨髓炎或手术部位感染引起。在一些实施方案中,所公开的化合物可用于治疗感染,并且在另一些实施方案中,所公开的化合物可用于在易受骨感染或处于骨感染风险的对象中预防感染。

[0105] 据报道,CSA例如CSA-13、CSA-90和CSA-131促进或增强骨发生(美国专利No.9,694,019;Schindeler et al.J Bone Joint Surg Am.2015.97(4):302-309)。在这方面,本文中所述的化合物可用于在对象中促进骨形成。可根据本公开内容治疗的骨病症包括例如骨折、脊髓损伤、脊椎盘退变、佩吉特病、骨癌和骨质疏松症。可使用本公开内容的组合物和方法治疗的骨折包括非愈合性骨折(non-union fracture)、简单骨折、青枝骨折(greenstick fracture)、复合骨折、粉碎性(多碎片)骨折、嵌入骨折、复杂骨折、发丝状裂缝(hairline fracture)、压缩性骨折、疲劳性骨折和/或病理性骨折。可通过本文中所述的方法有利地治疗的骨折的一些实例包括但不限于脊柱、腿和臂的骨折。可根据本公开内容有利地治疗的骨折的另一个实例是椎体压缩性骨折(vertebral compression fracture)。

这样的骨折发生在脊柱的一根或更多根骨骨折或塌陷时，通常是当椎骨已经变弱时，例如由于衰老或削弱骨的疾病，例如骨质疏松症、佩吉特病或骨癌。在一些实例中，可根据本公开内容治疗的骨疾病或病症包括骨吸收、骨关节炎、骨质疏松症、骨软化、纤维囊性骨炎、剥脱性骨软骨炎、骨软化、骨髓炎、成骨细胞生成(osteoblastogenesis)、骨质减少、骨坏死和多孔性骨肥大(porotic hyperostosis)。

[0106] 本公开内容的组合物和方法可用于治疗患有骨形成和吸收不平衡的对象。骨形成和吸收的不平衡通常导致骨量减少，并可能导致骨相关疾病，例如骨质疏松症、佝偻病和骨软化。这些骨疾病与骨折风险提高、骨折严重程度提高和愈合时间延长相关。另外，在年龄增长或受伤情况下，盘退变性疾病或脊柱畸形的发生率提高，导致滑椎症。

[0107] 剂量可因要治疗的病症的类型和严重程度而变化，并可包括单剂量或多剂量。具体的剂量方案可根据个体需要和施用化合物的实践者的专业判断随时间调整。当施用于人对象时，剂量方案可根据多种因素变化，所述因素包括感染或病症的类型和严重程度、对象的年龄、性别、体重或医学状况以及施用途径。在这方面，待施用的化合物的精确量可取决于实践者的判断。在一些实施方案中，对象可以是哺乳动物。在一些实施方案中，对象是人、伴侣动物(例如，狗、猫、雪貂(ferret)、仓鼠、沙鼠等)、家畜动物(例如，牛、猪、马、家禽等)，或需要治疗的任何其他哺乳动物。

[0108] 本文中所述的化合物可在数小时、数天、数周或数月的时期内施用，这取决于数种因素，所述因素包括待治疗病症或感染的严重程度、是否认为可能复发。施用可通过输注在数小时、数天、数周、数月等的时期内进行。或者，施用可以是间歇性的，例如在数天的时期内每天一次，在数小时的时期内每小时一次，或认为合适的任何其他这样的方案。在一些实施方案中，本公开内容的组合物每天一次施用持续至少一周，例如每天至少一次施用至少两周，或每天一次施用至少一个月或更长时间。在另一些实施方案中，本公开内容的组合物在暴露于感染原之前或之后立即提供，或在骨感染风险开始时提供。

[0109] 在一些实例中，本公开内容的化合物以约0.01mg/kg至1000mg/kg体重的量施用。例如，本公开内容的化合物可以以下量或由这些范围限定的任何剂量施用：约0.1mg/kg至900mg/kg、或约0.5mg/kg至800mg/kg、或约1mg/kg至750mg/kg、或约1.5mg/kg至700mg/kg、或约2mg/kg至600mg/kg、或约2mg/kg至500mg/kg、或约2.5mg/kg至450mg/kg、或约3mg/kg至350mg/kg、或约3.5mg/kg至250mg/kg、或约4mg/kg至200mg/kg、或约4mg/kg至100mg/kg、或约4mg/kg至50mg/kg、或约4mg/kg至20mg/kg。在一些实施方案中，本公开内容的化合物以约2mg/kg、约5mg/kg、约8mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg或约50mg/kg施用，或在上述剂量限定的任何范围内施用。在一些实例中，抗生素化合物是全身性施用的。

[0110] 应当理解，与不存在骨结合部分时所需的给药相比，由骨结合部分赋予的靶向可降低在感染部位提供有效量的抗生素(例如，CSA)所需的给药。还应当理解，与可耐受的缺乏骨结合能力的抗生素化合物的剂量相比，患者可耐受更高剂量的骨结合化合物，因为骨结合抗生素化合物针对目的组织，而不是非特异性地前往身体的其他位置。

[0111] 在一些实例中，本公开内容提供了为以下的经口剂量：约0.01mg至4000mg活性成分，例如约0.05mg至3500mg、或约0.1mg至3000mg、约0.5mg至2500mg、约0.75mg至2000mg、或约1mg至1750mg、约1.25mg至1500mg、或约1.5mg至1250mg、或约2mg至1000mg、或约5mg至

900mg、约7.5mg至800mg、或约10mg至700mg、或约15mg至600mg、或约20mg至550mg、或约25mg至500mg、或约30mg至500rng、或约35mg至450rng、或约40mg至450rng、或约45mg至450mg、或约50mg至400mg。

[0112] 用于配制和施用的技术可见于“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,最新版本中。例如,合适的途径可包括经口、经直肠、经黏膜或肠内施用;肠胃外递送,包括肌内、皮下、经皮、皮内或髓内递送(例如,注射),以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、肺、经皮或眼内递送(例如,注射)。

[0113] 组分可配制为允许在延长的时期内释放。释放系统可包括通过扩散释放所并入组分的物质或可生物降解物质的基质。组分可在释放系统内均匀或不均匀地分布。多种释放系统可以是可用的,然而,适当系统的选择将取决于特定应用所需的释放速率。不可降解和可降解释放系统二者都可使用。合适的释放系统包括聚合物和聚合物基质、非聚合物基质或无机和有机赋形剂和稀释剂,例如但不限于碳酸钙和糖(例如海藻糖)。可选择释放系统物质,使得具有不同分子量的组分通过扩散或通过降解物质来释放。代表性的合成的、可生物降解的聚合物包括,例如:聚酰胺,例如聚(氨基酸)和聚(肽);聚酯例如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)和聚(己内酯);聚(酸酐);聚原酸酯(polyorthoester);聚碳酸酯;及其化学衍生物(化学基团的取代、添加,例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域技术人员常规进行的其他修饰)、共聚物及其混合物。代表性的合成的、不可降解的聚合物包括,例如:聚醚,例如聚(环氧乙烷)、聚(乙二醇)和聚(四亚甲基氧化物);乙烯基聚合物-聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯,例如甲基、乙基、其他烷基、羟乙基甲基丙烯酸酯、丙烯酸和甲基丙烯酸,以及其他例如聚(乙烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)和聚(乙酸乙烯酯);聚(聚氨酯);纤维素及其衍生物,例如烷基、羟烷基、醚、酯、硝化纤维素和多种乙酸纤维素;聚硅氧烷;及其任何化学衍生物(化学基团的取代、添加,例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域技术人员常规进行的其他修饰)、共聚物及其混合物。可使用聚(丙交酯-共-乙交酯)微球或纳米球。

[0114] 本公开内容的化合物可与另外的抗生素剂组合施用。合适的抗生素剂可包括,例如,环丙沙星、吉西他滨、色氨酸(tryptophan)、紫杉醇、阿糖胞苷、利福拉齐、诺氟沙星、依诺沙星、加替沙星、莫西沙星、氟喹诺酮酯、苯并噁唑霉素、氨基糖苷、多烯、硝咪唑、利福霉素、杆菌肽、β-内酰胺、头孢菌素、氯霉素、糖肽、大环内酯、林可酰胺、青霉素、喹诺酮类、利福平、四环素、甲氧苄啶磺胺、阿莫西林、奥格门汀、阿莫西林、氨苄西林、阿洛西林、氟氯西林、美洛西林、甲氧西林、头孢氨苄、头孢西酮、头孢呋辛、氯碳头孢、头孢美唑、头孢替坦、头孢西丁、环丙沙星、左氧氟沙星、沙星、多西环素、米诺环素、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、克拉霉素、阿奇霉素、红霉素、达托霉素、新霉素、卡那霉素、链霉素、乳链菌肽、表皮素、高利丹宁、肉桂霉素、耐久霉素、乳链球菌素481、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、甲硝唑、克林霉素、金霉素、二氯环素、土霉素、阿米卡星、奈替米星、头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢匹林、头孢雷定、头孢克洛、头孢孟多、头孢美唑、头孢尼西、头孢替坦、头孢西丁、头孢泊肟、头孢丙烯、头孢呋辛、头孢地尼、头孢克肟、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢布烯、头孢唑肟、头孢曲松、头孢吡肟、阿奇霉素、头孢噻肟、克拉霉素、地红霉素、红霉素、林可霉素、醋竹桃霉素、巴氨西林、羧苄西林、氯唑西林、双氯西林、甲氧西林、美洛西林、萘夫西林、苯唑西林、哌拉西林、替卡西林、西诺沙星、环丙沙星、依诺沙星、格帕沙星、左氧氟沙

星、洛美沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星、磺胺异噁唑、磺胺西汀、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、氨苯砜、氨曲南、卷曲霉素、氯法齐明、多黏菌素E甲磺酸、黏菌素、环丝氨酸、磷霉素、呋喃唑酮、乌洛托品、呋喃妥因、喷他脒、利福布汀、大观霉素、替加环素、甲氧苄啶、曲美沙特葡萄糖醛酸盐、万古霉素、氯己定、碳青霉烯或艾他培南。

[0115] 本公开内容的化合物可与可用于促进骨形成或减少骨吸收的另外的化合物组合施用。例如，合适的化合物可包括利塞膦酸盐(Actonel)、伊班膦酸盐(Boniva)或唑来膦酸(Reclast或Aclasta)。作为替代或补充，另一些化合物可以是皮质类固醇，例如泼尼松(prednisone)或可的松(cortisone)。作为替代或补充，另一些化合物可以是地诺单抗(denosumab)(Prolia)。作为替代或补充，另一些化合物可以是雷尼酸锶(strontium ranelate)(Protos)。作为替代或补充，另一些化合物可以是选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator，SERMS)，例如雷洛昔芬(raloxifene)(Evista)。作为替代或补充，另一些化合物可以是用于激素替代治疗(hormone replacement therapy，HRT)的药物，例如雌激素或孕酮。作为替代或补充，另一些化合物可以是特立帕肽(teriparatide)(Forteo)。作为替代或补充，另一些化合物可以是非甾体抗炎剂或镇痛剂。例如，合适的非甾体抗炎剂可以是布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、阿司匹林(aspirin)或COX-1和/或COX-2抑制剂，其选自酮洛芬(ketoprofen)、吲哚美辛(indomethacin)(Indocin或Tivorbex))和非诺洛芬(fenoprofen)(Nalfon)。

[0116] 本公开内容的化合物可与支架缔合施用于对象。支架材料可如以下中所述：美国专利No.5,681,872；5,914,356；5,939,039；6,325,987；6,383,519；6,521,246；6,736,799；6,800,245；6,969,501；6,991,803；7,052,517；7,189,263；7,534,451；8,303,967；8,460,686；或8,647,614，其通过引用并入。另一些合适的支架材料可包括VITOSS®、CORTOSS®、生物聚合物、骨、脱细胞骨、胞外基质或其组分、纤连蛋白、层黏连蛋白胶原、壳聚糖、褐藻胶、磷酸钙、硫酸钙、聚(α-羟基酸)例如聚(乳酸-共-乙醇酸)和聚乙醇酸、CUPE聚合物、聚乙二醇或其任何组合。支架材料可以是多孔的。支架材料可以是天然材料、合成材料或其组合。支架材料可以是生物相容的、无毒的和/或非炎性的。支架材料可支持细胞附着、细胞增殖、胞外和/或骨基质产生和/或细胞转化。支架材料可以是可生物降解的。支架材料可以是无菌的。本领域技术人员将理解其他支架材料和属性。

[0117] 本公开内容的化合物可通过多种途径施用。在一些实施方案中，化合物全身性施用，例如通过直接递送到对象的血流中。在某些实施方案中，化合物肠胃外递送。肠胃外施用的一些示例性途径包括但不限于血管内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、腹膜内、心室内、脑室内、鞘内、皮下、表皮下、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外、胸骨内、颅内、肌内、关节内、动脉内、结内、肺内、鼻内、经皮和静脉内。在某些实例中，化合物腹膜内或静脉内施用。

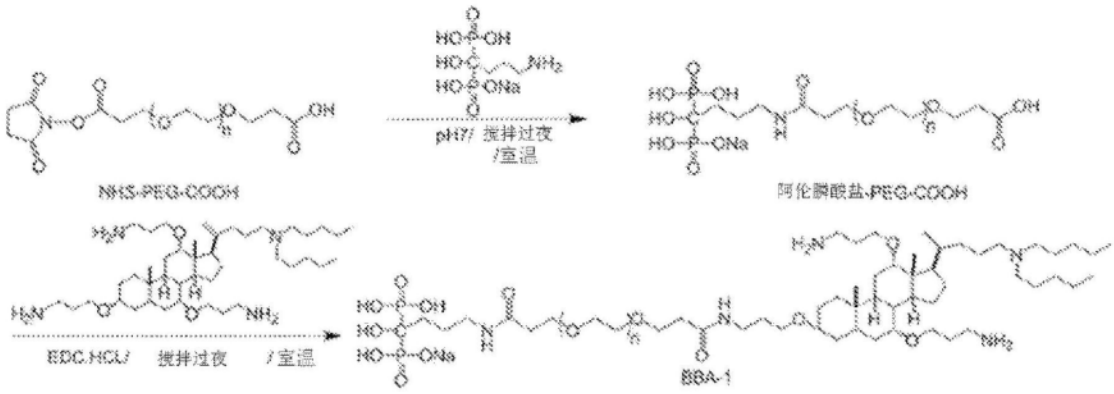
[0118] 或者，可使用本领域公知的可药用载体将化合物配制成适合于经口施用的剂型，例如片剂、丸剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、浆液剂、混悬剂等。合适的载体可选自麦芽、明胶、滑石粉、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、褐藻酸、磷酸缓冲溶液、乳化剂、等张盐水和无热原水。在某些实例中，所述化合物鼻内或通过吸入施用(例如，以气溶胶喷雾剂呈现形式从加压容器、泵、喷雾器或雾化器(nebulizer)使用合适的抛射剂例如二氯二氟甲

烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氟代烷烃例如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A3或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227EA3)、二氧化碳或其他合适的气体))或作为用干粉吸入器递送的固体微粉化粉末施用。

实施例

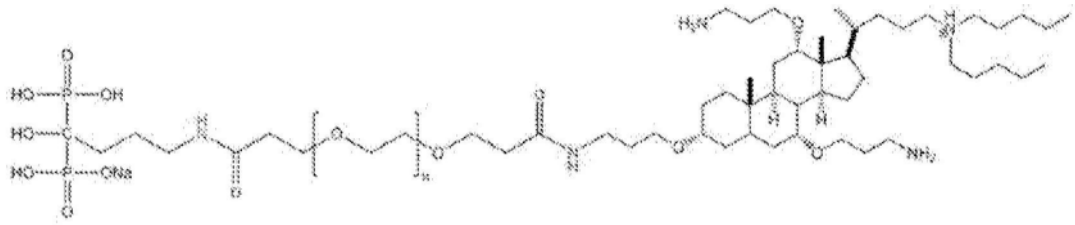
[0119] 实施例1:合成

[0120] 在两步反应中合成了称为骨结合抗生素1(Bone-Binding Antibiotic-1,BBA-1)的化合物。在第一步中,将NHS-PEG-COOH接头(1kDa,33mg)溶解在1mL Milli-Q水中。单独地,将阿仑膦酸(ALN)钠(10.5mg)称重并溶解在1mL Milli-Q水中。在连续搅拌下将阿仑膦酸盐溶液逐滴添加到NHS-PEG-COOH的溶液中。监测反应的pH并使用NaOH溶液调节至pH 7。将反应混合物在室温下搅拌过夜。在过夜反应之后,通过添加3.5mL无水乙醇将未缀合的阿仑膦酸盐沉淀,并将其通过使用0.45微米尼龙过滤器过滤而去除以得到ALN-PEG-COOH。在第二步中,将1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(盐酸盐EDC.HCL 30mg)和CSA-90(25.5mg)添加至包含ALN-PEG-COOH的过滤的溶液。将反应混合物在室温下搅拌过夜以得到最终的缀合物产物(ALN-PEG-CSA-90)。将反应溶液置于1kDa的透析管中,并使用水作为透析介质透析24小时。在透析之后,将纯化的反应产物冷冻干燥并用于使用HPLC、NMR和FT-IR谱进行鉴定和化学表征。

[0121] 

[0122] 方案二:BBA-1的合成途径

[0123] BBA-1的分子量为约2070.12g/摩尔,并且其结构是:

[0124] 

[0125] 其中n为约16。

[0126] 实施例2:表征

[0127] BBA-1使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)进行表征。参考图1-A,8.2分钟和9.3分钟处的宽峰归因于ALN-PEG-COOH接头与CSA-90的两个伯氨基的可能缀合。7.5分钟处的峰归因于未反应的接头,而2.5分钟处的峰由于EDC.HLC碳二亚胺引起。图1-B和图1-C分别示出了使用类似方法在时间5分钟处对纯NHS-PEG-COOH接

头和在6.8分钟处对CSA-90进行的相应洗脱和鉴定。在BBA-1反应混合物的BBA-1谱(图1-A)中,在6.8分钟处CSA-90的峰的细微或缺失,以及在7.5分钟处NHS-PEG-COOH峰的显著降低表明CSA-90与接头的最大缀合效率。

[0128] 图2分别示出了阿仑膦酸盐(图2-A)、CSA-90(图2-B)、NHS-PEG-COOH接头(图2-C)和BBA-1(图2-D)的FT-IR谱。通过在2867cm^{-1}和2925cm^{-1}处鉴定峰,确定了BBA-1谱中CSA-90的存在(图2-D)。在所有谱中,1550cm^{-1}至1560cm^{-1}附近和高于3300cm^{-1}的峰分别对应于N-H弯曲(N-H bending)和伸缩振动(图2-A至2-D)。在CSA-90和阿仑膦酸盐与NHS-PEG-COOH接头缀合之后,由于与CSA-90和阿仑膦酸盐形成酰胺键的C=O键的伸缩振动在BBA-1谱中的1636cm^{-1}处记录。(图2-D)。

[0129] 如实施例1中所述,将阿仑膦酸盐与NHS-PEG-COOH接头的NHS末端缀合。在第二步中,使用水溶性1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC.HCL)将CSA-90与接头的COOH末端缀合。将过量的EDC.HCL、CSA-90和阿仑膦酸盐通过沉淀、过滤和透析去除。图3-A示出了BBA-1、NHS-PEG-COOH、CSA-90和阿仑膦酸钠的^{1}H NMR谱。通过^{1}H NMR和^{31}P NMR谱确定了阿仑膦酸盐缀合的成功。如BBA-1的^{1}H NMR谱所示(图3-A),2.01ppm和3.14ppm(a和b)处的相应峰分别归因于来自阿仑膦酸盐的CH_2C和CH_2CH_2,表明成功的阿仑膦酸盐缀合。来自NHS-PEG-COOH接头的NHS的CH_2-CH_2峰特征的消失另外确定了阿仑膦酸盐与接头的NHS末端缀合(图3A,BBA-1和NHS-PEG-COOH谱)。类似地,CSA-90在0.93ppm、1.76ppm、2.82ppm和1.25ppm处的特征峰的鉴定确定了CSA-90与ALN-PEG-COOH的羧基末端的缀合。由于来自NHS-PEG-COOH接头的环氧乙烷的典型质子在3.64ppm处被鉴定(图3A,BBA-1)。另外,通过^{31}P NMR谱(图3-B)定性地确定了阿仑膦酸盐缀合。在BBA-1的^{31}P NMR(图3-B,BBA-1)中,19.42ppm处来自阿仑膦酸盐的磷(P)的相应峰(图3B,阿仑膦酸盐)移动到50.06ppm,这表明正定性缀合信号。

[0130] 实施例3:抗菌测定

[0131] 进行了改进的Kirby-Bauer盘扩散测定(Kirby-Bauer disc diffusion assay)以测试BBA-1针对引起骨感染的常见细菌物种的杀菌活性。制备含有等摩尔浓度的BBA-1或CSA-90的Whatman滤纸盘$N^{\varnothing}1$(6mm)与标准200μg庆大霉素盘并进行比较。简言之,将0.5mL金黄色葡萄球菌和甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus,MRSA)(稀释至OD_{600}为0.2=1.6×10^{8}细菌/mL)均匀分布在LB琼脂板上。将抗生素盘放置在LB琼脂板上,并在过夜孵育之后测量每个抗生素盘周围的细菌生长抑制区。此外,通过标准化肉汤微稀释法来确定BBA-1的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration,MBC)。简言之,将1×10^{5}CFU/mL的金黄色葡萄球菌和MRSA接种物与系列浓度的BBA-1和CSA-90一起孵育。在37℃下孵育24小时之后,在595nm处以一式三份记录光密度/吸光度。

[0132] 如图4-A和4-B中所示,经BBA-1处理的盘显著抑制了所有实验中的细菌生长。CSA-90和庆大霉素等摩尔浓度下的BBA-1的抗菌活性针对两种细菌菌株相当。BBA-1针对金黄色葡萄球菌和MRSA的MIC和MBC浓度分别为1.5μg/mL和3μg/mL(图4-C)。

[0133] 实施例4:骨结合测定

[0134] BBA-1和CSA-90的羟基磷灰石(HA)结合亲和力通过在milli-Q水中与和不与HA孵

育每种化合物半定量地确定。将BBA-1(2.42mg)称重并溶解在4mL milli-Q水中。单独地，将HA(20mg)称重并悬浮于2mL BBA-1溶液中，并将悬浮液在室温下孵育。为了分析由于HA结合引起的峰高降低，在预定时间点取出100μL上清液并通过HPLC分析。类似地，纯CSA-90的骨结合能力通过在相似浓度下将CSA-90与或不与HA孵育来测试。

[0135] 相对峰高归因于BBA-1在与HA孵育5分钟内降低至约40％(图5-B)。在孵育60分钟之后观察到最显著的降低，其中BBA-1的相对峰高降低至约20％(图5-A)。相比之下，即使在孵育60分钟之后，CSA-90也显示出没有或非常小的峰高降低(图5A)。在孵育60分钟之后，由于CSA-9引起的相应峰高仅降低至约85％(图5-A)。这些发现表明，显著量的BBA-1与HA结合(P值≤0.0001，未配对t检验)，并且阿仑膦酸盐部分赋予对HA的高亲和力。

[0136] 实施例5:测量对成骨活性的作用

[0137] 据报道，亲本化合物CSA-90在培养细胞中具有促成骨活性并增强重组人骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein-2,rhBMP-2)(Schindeler et al.,J Bone Joint Surg Am.97(4):302-9(2015))。这可导致超出抗微生物保护的另外益处，特别是在修复骨损伤、骨缺损或骨科植入物骨整合方面。

[0138] 为了测试BBA-1是否保留了CSA-90的任何促成骨作用，将MC3T3-E1细胞在有或无50ng/ml rhBMP-2的情况下在含有5μM CSA-90或BBA-1的成骨培养基中分化。对碱性磷酸酶活性(Sigma-Aldrich)进行对-硝基苯酚磷酸盐测定，并将其相对于在成骨培养基和α-MEM培养基中培养的第3天细胞归一化。以一式三份两次独立重复进行测定。

[0139] 与先前发表的调查结果一致，CSA-90和rhBMP-2提高了碱性磷酸酶表达(图6)。无论是单独还是与rhBMP-2组合，BBA-1均显示出与CSA-90相似的成骨潜力。

[0140] 实施例6:测量对甲羟戊酸途径的影响

[0141] 亲本化合物阿仑膦酸盐是通过功能性影响甲羟戊酸途径来影响骨吸收的双膦酸盐。假设通过侧链胺基的缀合，骨结合亲和力将被保留，但抗吸收活性将被取消。

[0142] 这一点使用在用一系列剂量的阿仑膦酸盐、CSA-90或BBA-1处理的J774.2单核细胞巨噬细胞谱系细胞上进行的体外蛋白质异戊二烯化测定来验证。使用的测定如Ali N et al.,Small GTPases 6(4):202-11(2015)所述。简言之，这涉及以递增剂量的药物将细胞与化合物孵育24小时，并随后对蛋白质提取物进行体外异戊二烯化测定。进行免疫印迹(western印迹)以鉴定示例性的未异戊二烯化蛋白质，其中条带表明影响甲羟戊酸途径的药物活性。

[0143] 用25μM浓度的阿仑膦酸盐处理对蛋白质异戊二烯化产生了强效的作用(图7)。在相似等摩尔浓度的阿仑膦酸盐处理下，CSA-90或BBA-1处理不诱导明显或相当的蛋白质异戊二烯化作用。这表明阿仑膦酸盐通过其胺基与CSA-90缀合显著改善了其抗折骨活性。

[0144] 实施例7:毒性研究

[0145] 在小鼠中的初步毒性研究表明，当BBA-1以5mg/kg的剂量静脉内给予时，不会引起不良事件。

[0146] 在概念证明研究中，使用临床前感染模型(每组N＝10)在手术之前一小时向小鼠预给药5mg/kg BBA-1。所述模型的特点是在手术时接种了活金黄色葡萄球菌(菌株ATCC 12600)(1E5 CFU)的C57BL6小鼠的胫骨中进行钻孔。

[0147] 未接受感染的对照小鼠在销或软组织的拭子测定中未测试出阳性。与未接受BBA-

1的经感染对照相比，在用BBA-1处理的组中，在培养局部感染时如通过光密度(OD595)测量的经感染样品数和感染水平(图8和9)降低。

[0148] 本领域技术人员将理解，本文中所述的化合物和方法可以许多其他形式体现。

[0149] 除非另有说明，否则在说明书和权利要求书中使用的表示成分的量、性质例如分子量、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。本文中使用的术语“约”和“大约”意指在10％至15％内，优选在5％至10％内。因此，除非相反地指出，否则说明书和所附权利要求书中所示的数值参数均是近似值，其可根据本发明寻求获得的所期望特性而变化。至少，并且不是试图将等效原则的应用限制在权利要求书的范围内，每个数值参数至少应根据报道的有效数字的数目并通过应用普通的舍入技术来解释。虽然陈述本发明宽范围的数值范围和参数是近似值，但是在具体实施例中陈述的数值是尽可能精确地报导的。然而，任何数值均固有地包括不可避免地由在其各自的测试测量中存在的标准偏差产生的某些误差。

[0150] 除非本文中另外指出或与上下文明显相反，否则在描述本发明的上下文中(尤其是在随附权利要求书的上下文中)使用的没有数量词修饰的名词应解释为表示一个/种或更多个/种。本文中对值的范围的记载仅旨在用作单独引用落入该范围的每个单独的值的速记方法。除非本文另外说明，否则每个单独值被并入说明书中，如同在本文中单独地记载一样。除非本文中另外指出或者明显与上下文相矛盾，否则本文中所述所有方法均可以以任何合适的顺序进行。本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如，“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本发明，并且不提供对另外要求保护的本发明的范围的限制。说明书中的任何语言均不应被解释为表示对本发明的实践必要的任何未要求保护的要素。

[0151] 本文中公开的本发明的可选择元素或实施方案的分组不应解释为限制。各组成员可被单独提到或要求保护，或者与本文发现的组的其他成员或其他元素任意组合。出于方便和/或可专利性的原因，预期一个组的一个或更多个成员可能被包括在一个组中或从组中删除。当任何这样的包括或删除发生时，说明书被视为含有经过改动的组，因此满足对所附权利要求书中所用的全部马库什组的书面说明。

[0152] 本文中描述了本发明的某些实施方案，包括本发明人已知的用于进行本发明最佳的模式。当然，在阅读上述描述之后，这些描述的实施方案的变化对于本领域普通技术人员将变得明显。本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化方案，并且本发明人希望以除本文中具体描述的之外的方式实践本发明。因此，如适用法律所允许的，本发明包括在此所附权利要求书中记载的主题的所有修改方案和等同方案。此外，除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾，否则本发明涵盖其所有可能变化方案中的上述要素的任何组合。

[0153] 本文中所公开的具体实施方案可在权利要求书中使用由语言组成或由语言基本上组成进一步限制。当在权利要求书中使用时，无论是提交的还是根据修改添加的，过渡术语“由……组成”不包括未在权利要求书中指定的任何元素、步骤或成分。过渡术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制为指定的材料或步骤，以及不实质影响基本和新特征的材料或步骤。如此要求保护的本发明的实施方案在本文中固有地或明确地描述和启用。

[0154] 此外，在本说明书通篇多次引用专利和印刷出版物。上面引用的参考文献和印刷出版物中的每一个均单独地通过引用整体并入本文。

[0155] 最后，应该理解，本文中公开的本发明的实施方案是对本发明原理的举例说明。可采用的其他修改在本发明的范围内。因此，通过示例而非限制的方式，可根据本文中的教导使用本发明的替代配置。因此，本发明不精确限于如所示和所描述的那样。

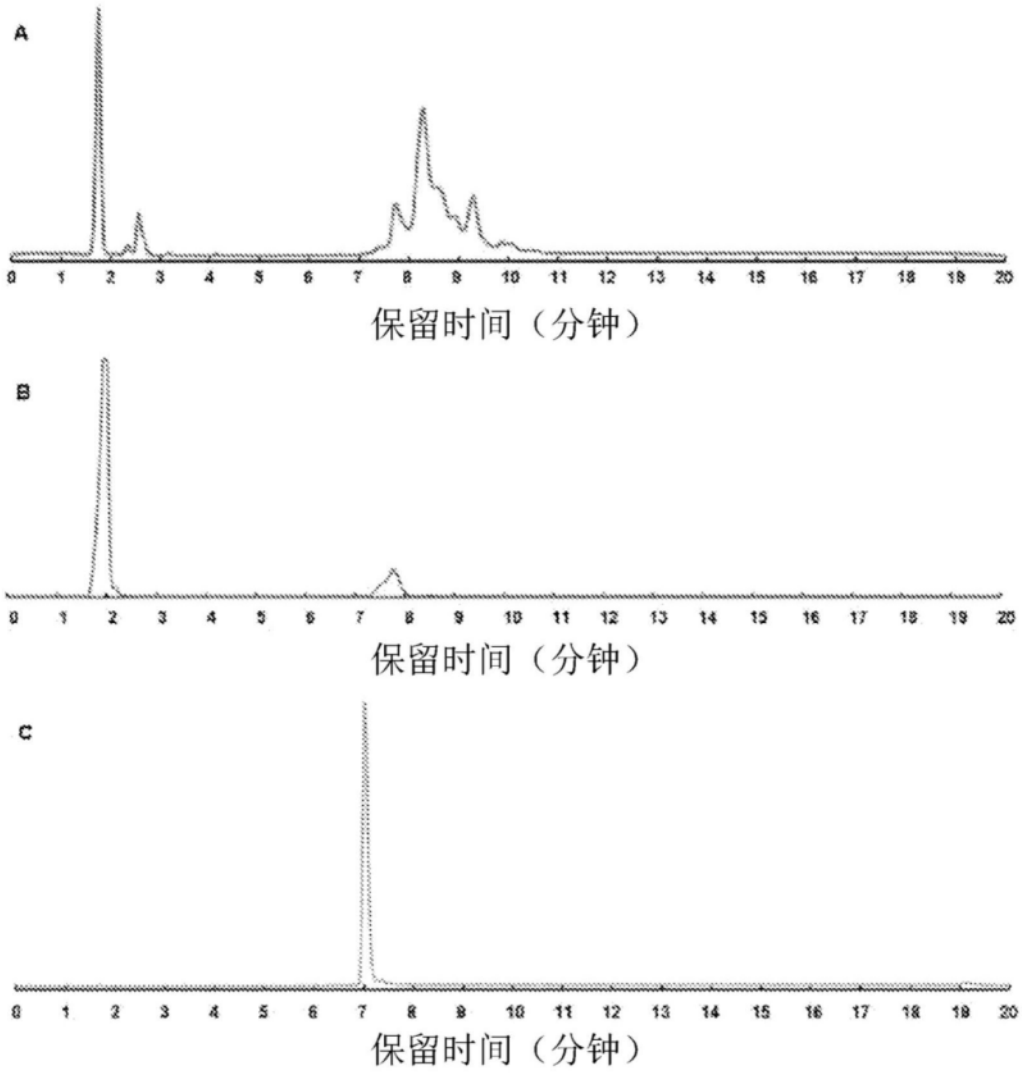

A
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
保留时间（分钟）
B
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
保留时间（分钟）
C
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
保留时间（分钟）

图1

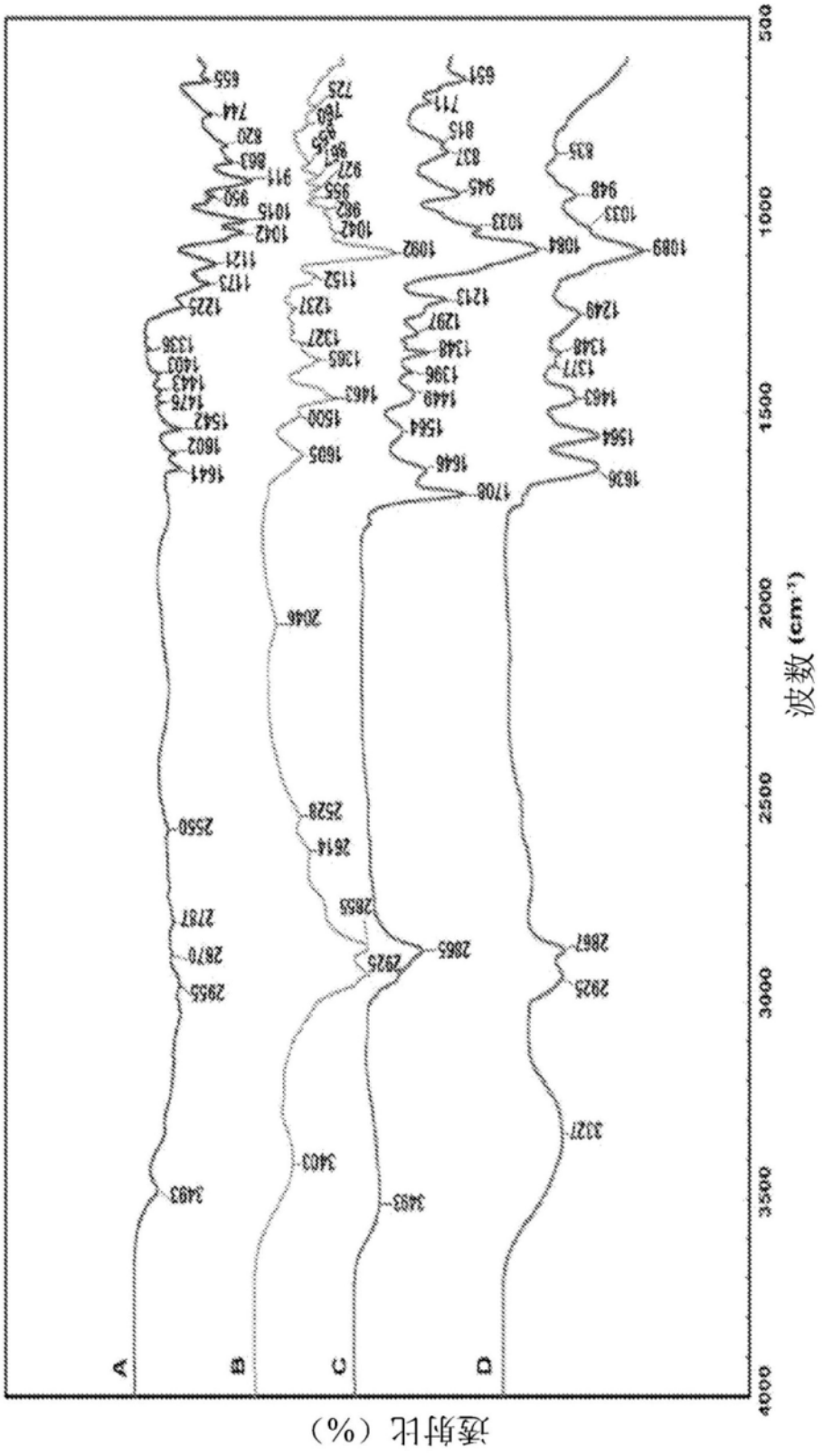
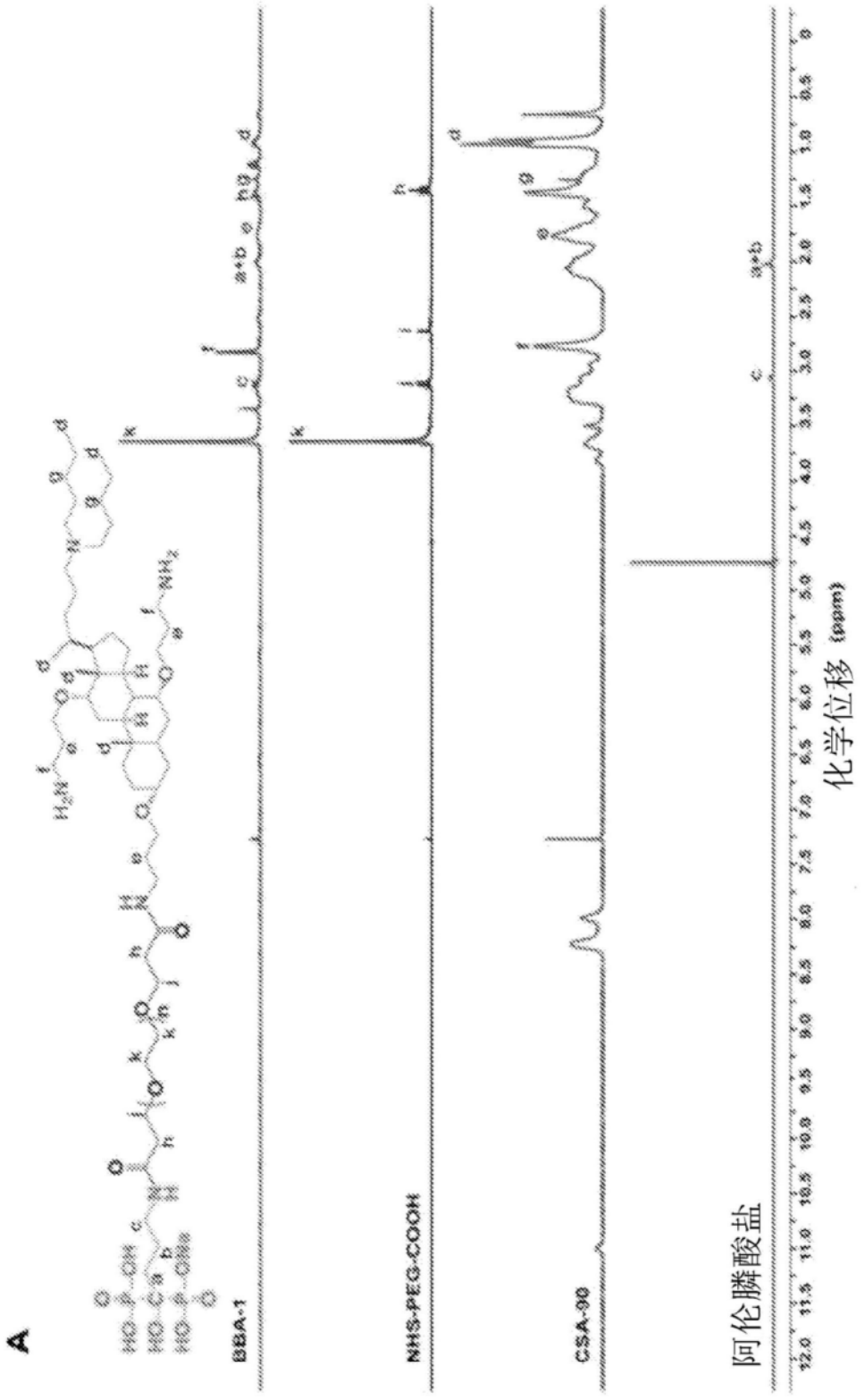


图2


A
BBA-1
NHS-PEG-COOH
CSA-90
阿伦膦酸盐
化学位移 (ppm)

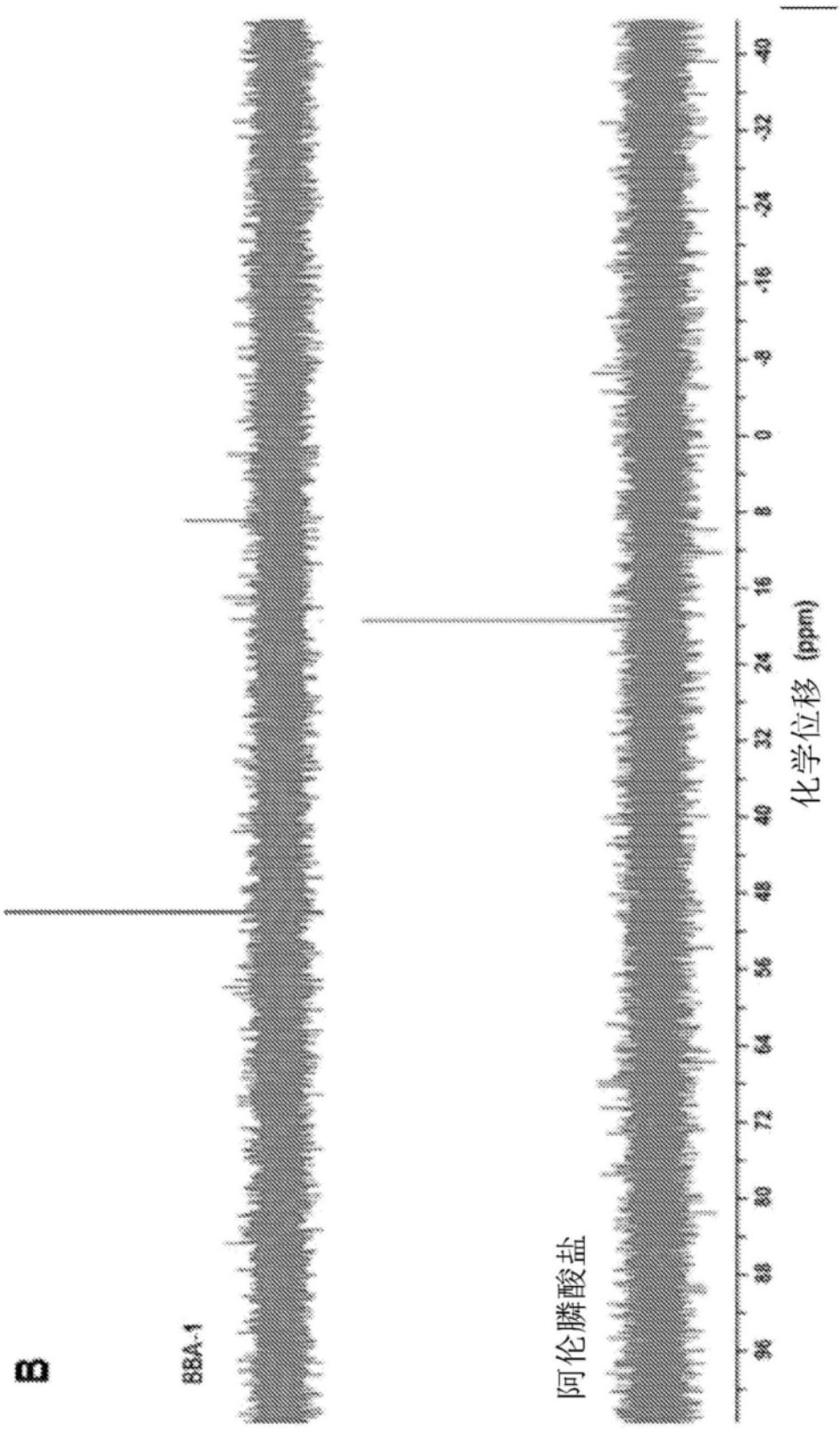

B
BBA-1
阿伦膦酸盐
化学位移 (ppm)
96
88
80
72
64
56
48
40
32
24
16
8
0
-8
-16
-24
-32
-40

图3

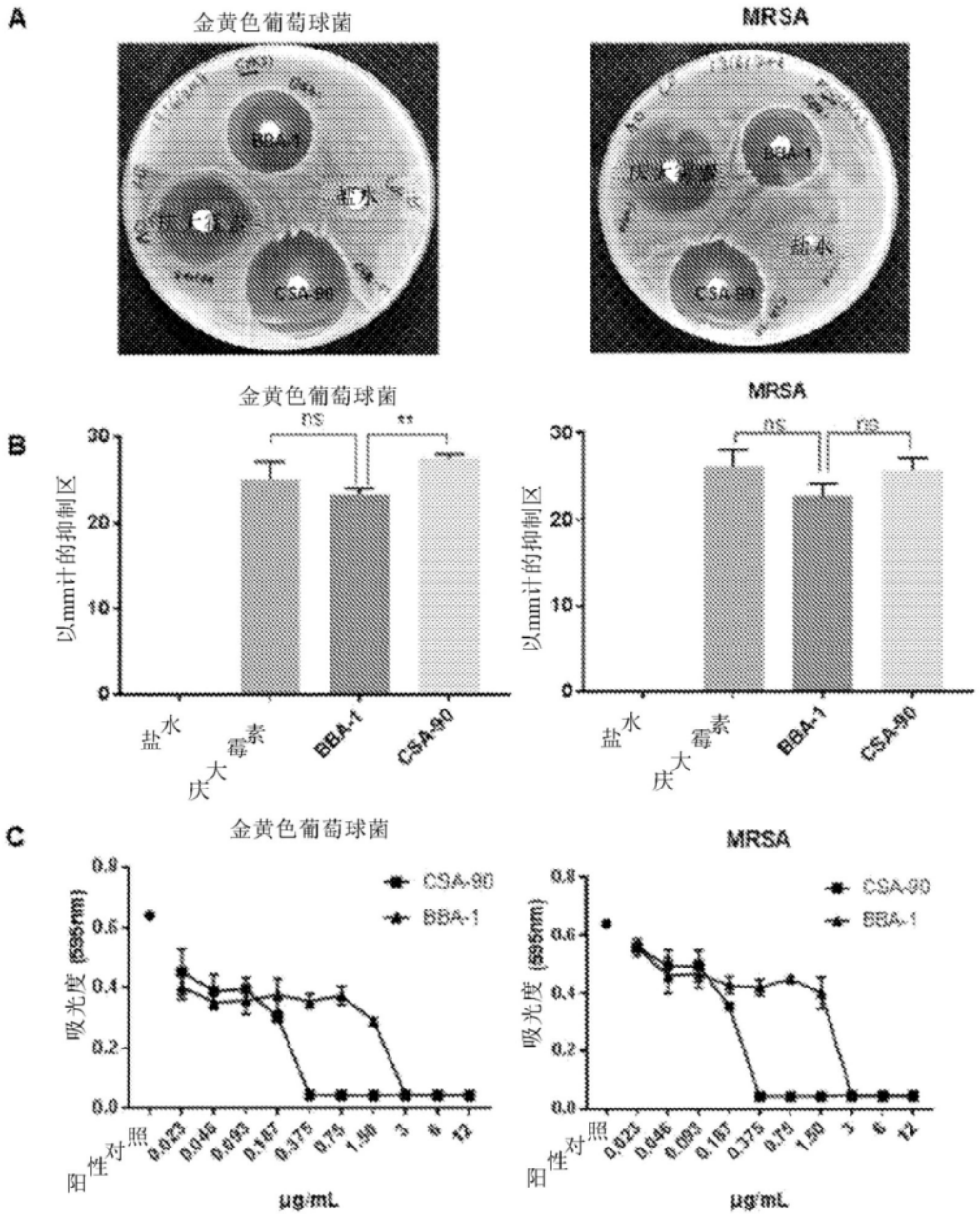

A
金黄色葡萄球菌
MRSA
BBA-1
盐水
CSA-90
B
金黄色葡萄球菌
MRSA
ns
**
以mm计的抑制区
盐水
庆大霉素
BBA-1
CSA-90
C
金黄色葡萄球菌
MRSA
CSA-90
BBA-1
吸光度 (595nm)
阳性对照
μg/mL

图4

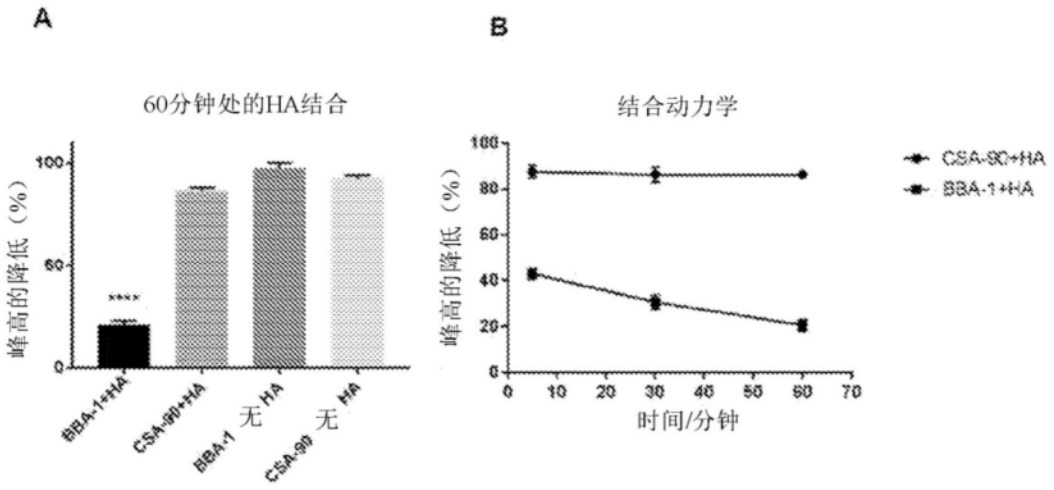

A
60分钟处的HA结合
峰高的降低（%）
100
60
0
****
BBA-1+HA
CSA-90+HA
BBA-1
无 HA
CSA-90
无 HA
B
结合动力学
峰高的降低（%）
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70
时间/分钟
CSA-90+HA
BBA-1+HA

图5

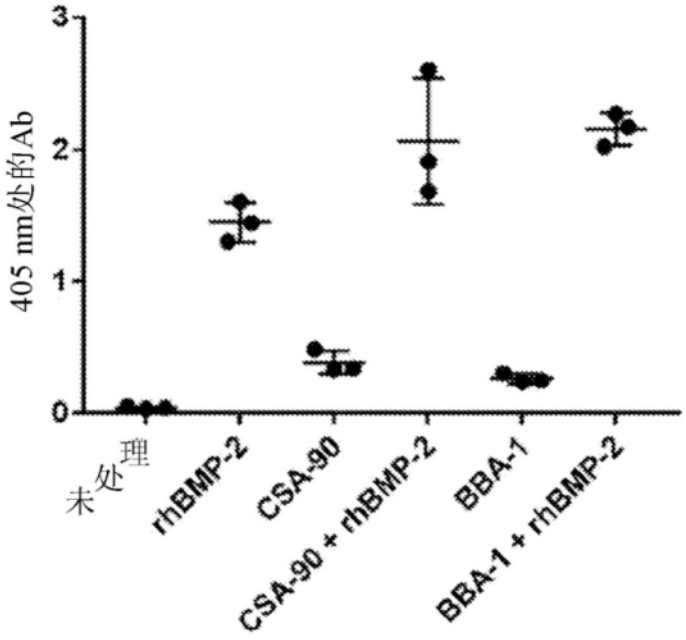

405 nm处的Ab
3
2
1
0
未处理
rhBMP-2
CSA-90
CSA-90 + rhBMP-2
BBA-1
BBA-1 + rhBMP-2

图6

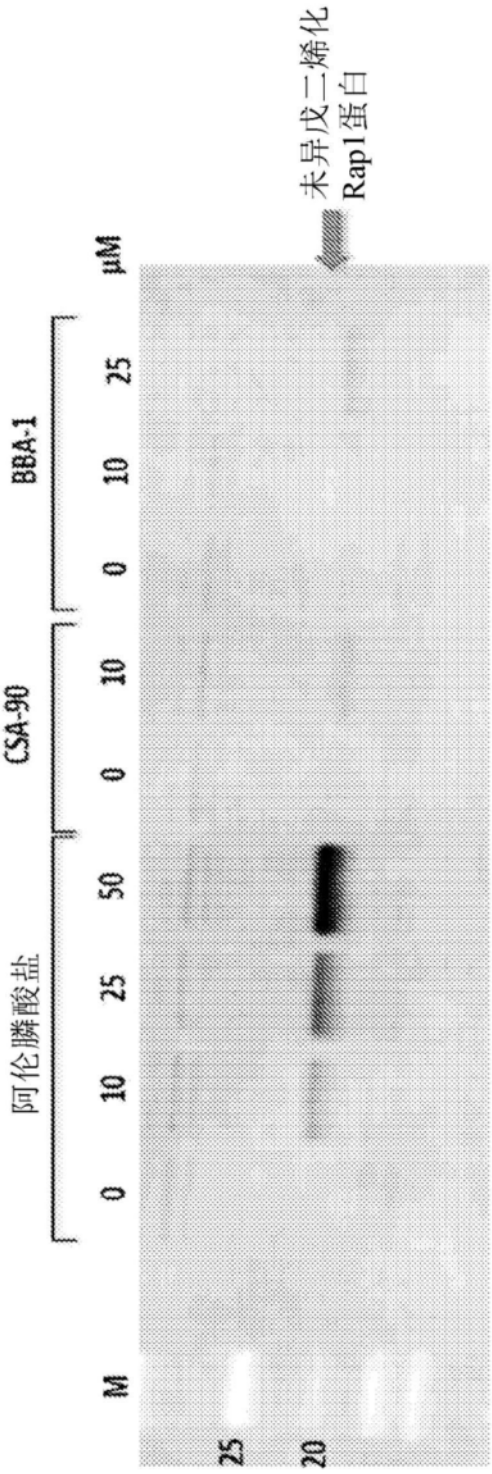


图7

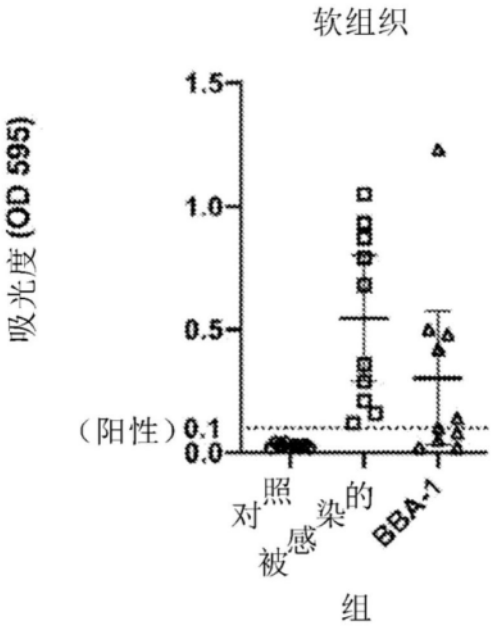

软组织
吸光度 (OD 595)
1.5
1.0
0.5
（阳性）0.1
0.0
对照
被感染的
BBA-1
组

图8

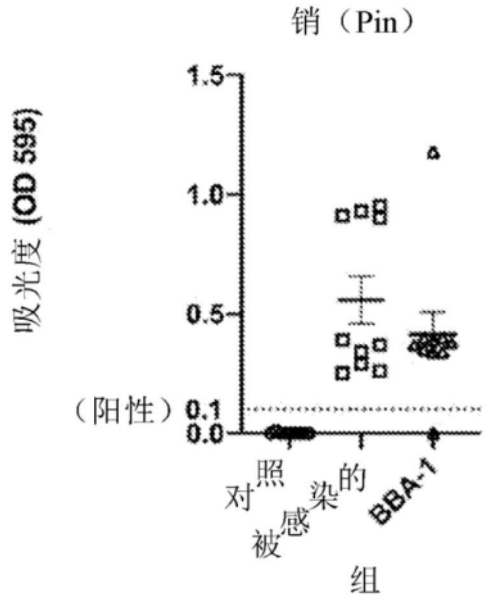

销（Pin）
吸光度 (OD 595)
1.5
1.0
0.5
（阳性）0.1
0.0
对照
被感染的
BBA-1
组

图9