

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 17/08

A61K 31/7052

A61P 31/04

A61P 33/02



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01808630.6

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1227258C

[22] 申请日 2001.3.26 [21] 申请号 01808630.6

[30] 优先权

[32] 2000.4.27 [33] US [31] 60/199,961

[86] 国际申请 PCT/IB2001/000519 2001.3.26

[87] 国际公布 WO2001/081358 英 2001.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.25

[71] 专利权人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格

[72] 发明人 W·A·伯特纳 P·C·坎宁

审查员 王景华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 张敏

权利要求书 12 页 说明书 64 页

[54] 发明名称 氮杂大环内酯抗生素组合物在治疗
或预防哺乳动物细菌或原生动感染中的应用

[57] 摘要

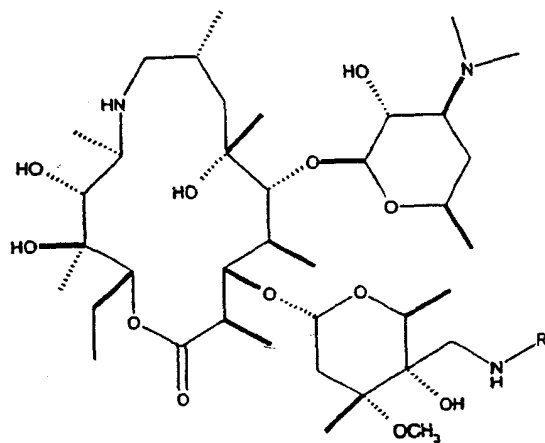
本发明公开了通过给予单剂量的包括氮杂大环内酯类异构体混合物和药物上可接受的载体的抗生素组合物来治疗或预防哺乳动物细菌或原生动感染的方法。本发明还公开了通过给予单剂量的包括氮杂大环内酯类异构体混合物和药物上可接受的载体的抗生素组合物来增加哺乳动物急性或慢性注射部位耐受性的方法。本发明还公开了包括下列组成的联合用药物：包括氮杂大环内酯类异构体混合物、药物上可接受的载体的抗生素组合物和用于单剂量给药的说明书。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 组合物在制备用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动物的药物中的用途，所述的组合物包括单剂量有效量的：

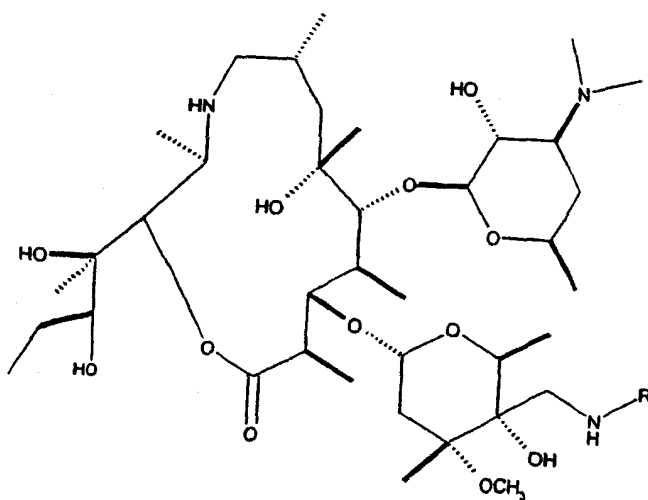
(a) 式(I)的化合物或其药物上可接受的盐和式(II)的化合物或其药物上可接受的盐的混合物；

其中式(I)的化合物的结构式如下：



(I)

其中式(II)的化合物的结构式如下：



(II)

其中在上述两个结构式中的基团 R 均相同且选自氢、C₁-C₁₀直链或支链烷基和 C₃-C₇环烷基组成的组；和

(b) 药物上可接受的载体。

2. 权利要求 1 的用途, 其中式 I 的化合物或其药物上可接受的盐和式 II 的化合物或其药物上可接受的盐的存在比例分别为 $90\% \pm 4\%$: $10\% \pm 4\%$ 。

3. 权利要求 1 或 2 的用途, 其中 R 是正丙基。

4. 权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述的药物上可接受的载体包括:

(a) 水;

(b) 一种或多种以 $0.2 \text{ mmol} - 1.0 \text{ mmol/mL}$ 所述混合物的总浓度存在的酸; 和

(c) 一种或多种以 $250 - 750 \text{ mg/mL}$ 所述组合物的量存在的水混溶性共溶剂。

5. 权利要求 4 的用途, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂选自乙醇、异丙醇、二甘醇一甲醚、二甘醇丁醚、二甘醇一乙醚、二甘醇二丁醚、聚乙二醇-300、聚乙二醇-400、丙二醇、甘油、2-吡咯烷酮、N-甲基 2-吡咯烷酮、甘油缩甲醛、二甲亚砜、癸二酸二丁酯、聚山梨醇酯 80 及其混合物组成的组。

6. 权利要求 5 的用途, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂是丙二醇。

7. 权利要求 6 的用途, 其中丙二醇的存在量为 $450 - 550 \text{ mg/mL}$ 所述组合物。

8. 权利要求 4 的用途, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种抗氧化剂, 其含有量为 $0.01 \text{ mg} - 10 \text{ mg/mL}$ 所述组合物。

9. 权利要求 8 的用途, 其中所述的一种或多种抗氧化剂选自亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲醛合次硫酸氢钠、1-抗坏血酸、异抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、一硫代甘油、巯基乙酸、硫羟乳酸、硫脲、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷胱甘肽、棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、去甲二氢愈创木酸、棓酸丙酯、 α -生育酚及其混合物组成的组。

10. 权利要求 9 的用途, 其中所述的一种或多种抗氧化剂是一硫代甘油。

11. 权利要求 10 的用途, 其中一硫代甘油的含有量为 4 mg - 6 mg/mL 所述组合物。

12. 权利要求 4 的用途, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种防腐剂, 其含有量为 0.01 - 10 mg/mL 所述组合物。

13. 权利要求 12 的用途, 其中所述的一种或多种防腐剂选自苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵、苯甲酸、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、苯甲酸钠、苯酚及其混合物组成的组。

14. 权利要求 13 的用途, 其中所述的一种或多种防腐剂是苯酚且其含有量为 2.0 - 3.0 mg/mL 所述组合物。

15. 权利要求 4 的用途, 其中所述的一种或多种酸选自乙酸、苯磺酸、柠檬酸、氢溴酸、盐酸、D-和 L-乳酸、甲磺酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、D-和 L-酒石酸、对甲苯磺酸、己二酸、天冬氨酸、樟脑磺酸、1,2-乙二磺酸、月桂基硫酸、葡庚糖酸、葡糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、1-羟基-2-萘甲酸、2-羟基乙磺酸、苹果酸、粘酸、硝酸、萘磺酸、棕

桐酸、D-葡糖二酸、硬脂酸、马来酸、丙二酸、富马酸、苯甲酸、胆酸、乙磺酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、乳糖酸、赖氨酸、扁桃酸、1,5-萘二磺酸、烟酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、磺基水杨酸、色氨酸及其混合物组成的组。

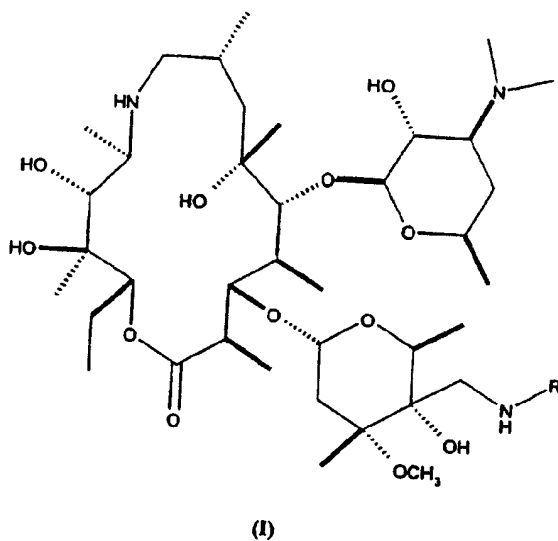
16. 权利要求 1 或 2 的用途, 其中所述的细菌或原生动感染选自下列疾病组成的组: 牛呼吸疾病、猪呼吸疾病、牛传染性角膜结膜炎、牛球虫病、猪回肠炎、牛乳腺炎、小牛肠道疾病、猪肠道疾病、犬肺炎、猫肺炎、犬脓皮病、猫脓皮病、巴斯德氏菌病、微粒孢子虫病、传染性角膜炎; 与肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、粘膜炎莫拉氏菌、金黄色葡萄球菌或消化链球菌属的种类感染相关的肺炎、中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、扁桃腺炎和乳突炎; 与化脓链球菌、C 族和 G 族链球菌属、*Clostridium diphtheriae* 或溶血放线杆菌感染相关的咽炎、风湿热和肾小球肾炎; 与肺炎枝原体、侵肺军团菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌或肺炎衣原体感染相关的呼吸道感染; 与金黄色葡萄球菌、凝固酶阳性葡萄球菌属、即表皮葡萄球菌、溶血性链球菌、酿脓链球菌、无乳链球菌、链球菌族 C-F、微小菌落的链球菌属、绿色链球菌、极小棒杆菌、梭状芽孢杆菌属的种类或汉氏巴尔通氏体感染相关的非并发症性皮肤和软组织感染、脓肿、骨髓炎和产褥热; 与腐生葡萄球菌或肠球菌属种类感染相关的非并发症性急性尿道感染; 尿道炎和宫颈炎; 与砂眼衣原体、杜氏嗜血菌、苍白密螺旋体、解脲尿枝原体或淋病奈瑟氏球菌感染相关的性传播疾病; 与金黄色葡萄球菌或 A 族、B 族和 C 族葡萄球菌感染相关的毒素疾病; 与幽门螺杆菌感染相关的溃疡; 与回归热疏螺旋体感染相关的全身发热性综合征; 与布氏疏螺旋体感染相关的莱姆病; 与砂眼衣原体、淋病奈瑟氏球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、流感嗜血杆菌或利斯特氏菌属种类感染相关的结膜炎、角膜炎和泪囊炎; 与鸟分枝杆菌或胞内分枝杆菌感染相关的传播性鸟分枝杆菌综合征疾病; 与空肠弯曲杆菌德莱氏亚种感染相关的肠胃炎; 与隐孢子虫属种类感染相关的肠原生动

感染；与绿色链球菌感染相关的牙源性感染；与百日咳博德特氏杆菌感染相关的顽固性咳嗽；与产气荚膜梭状芽孢杆菌或类杆菌属种类感染相关的气性坏疽；与幽门螺杆菌或肺炎衣原体感染相关的动脉粥样硬化；与梭杆菌属种类感染相关的牛腐蹄病；与大肠杆菌感染相关的牛子宫炎；与坏死梭杆菌或节瘤偶蹄形菌感染相关的牛毛疣；与原生动物感染相关的牛早产性流产；与大肠杆菌感染相关的狗和猫体内的尿道感染；与表皮葡萄球菌、中间葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌属或多杀巴斯德氏菌感染相关的狗和猫的皮肤和软组织感染；与产碱菌属种类、类杆菌属种类、梭状芽孢杆菌属种类、肠杆菌属种类、真杆菌属、消化链球菌属、卟啉单胞菌属或普雷沃氏菌属感染相关的狗和猫的牙齿或口腔感染；和与马驹放线芽孢杆菌、*Rodococcus equi*、马链球菌和兽疫链球菌相关的马的感染。

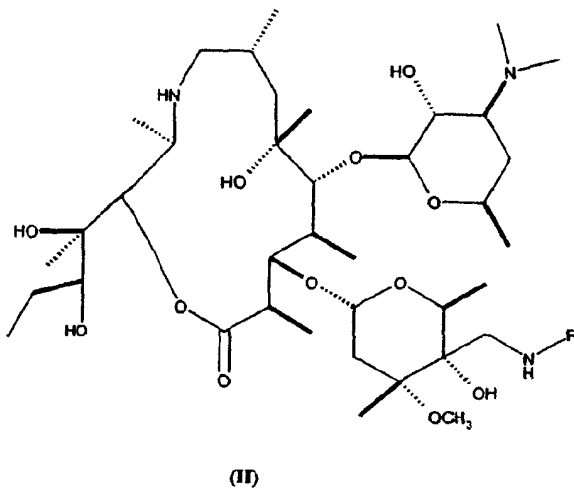
17. 组合物在制备用于增加哺乳动物急性或慢性注射部位耐受性的药物中的用途，所述的组合物包括单剂量有效量的：

(a) 式(I)的化合物或其药物上可接受的盐和式(II)的化合物或其药物上可接受的盐的混合物；

其中式(I)的化合物的结构式如下：



其中式 (II) 的化合物的结构式如下:



其中在上述两个结构式中的基团 R 均相同且选自氢、 C_1-C_{10} 直链或支链烷基和 C_3-C_7 环烷基组成的组; 和

(b) 药物上可接受的载体。

18. 权利要求 17 的用途, 其中式 I 的化合物或其药物上可接受的盐和式 II 的化合物或其药物上可接受的盐的存在比例分别为 $90\% \pm 4\%$: $10\% \pm 4\%$ 。

19. 权利要求 17 或 18 的用途, 其中 R 是正丙基。

20. 权利要求 17 或 18 的用途, 其中所述的药物上可接受的载体包括:

(a) 水;

(b) 一种或多种以 $0.2 \text{ mmol} - 1.0 \text{ mmol/mL}$ 所述混合物的总浓度存在的酸; 和

(c) 一种或多种以 $250 - 750 \text{ mg/mL}$ 所述组合物的量存在的水混溶

性共溶剂。

21. 权利要求 20 的用途, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂选自乙醇、异丙醇、二甘醇一甲醚、二甘醇丁醚、二甘醇一乙醚、二甘醇二丁醚、聚乙二醇-300、聚乙二醇-400、丙二醇、甘油、2-吡咯烷酮、N-甲基 2-吡咯烷酮、甘油缩甲醛、二甲亚砜、癸二酸二丁酯、聚山梨醇酯 80 及其混合物组成的组。

22. 权利要求 21 的用途, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂是丙二醇。

23. 权利要求 22 的用途, 其中所述的丙二醇的存在量为 450 - 550 mg/mL 所述组合物。

24. 权利要求 20 的用途, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种抗氧化剂, 其含有量为 0.01 mg - 10 mg/mL 所述组合物。

25. 权利要求 24 的用途, 其中所述的一种或多种抗氧化剂选自亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲醛合次硫酸氢钠、I-抗坏血酸、异抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、一硫代甘油、巯基乙酸、硫羟乳酸、硫脲、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷胱甘肽、棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、去甲二氢愈创木酸、棣酸丙酯、 α -生育酚及其混合物组成的组。

26. 权利要求 25 的用途, 其中所述的一种或多种抗氧化剂是一硫代甘油。

27. 权利要求 26 的用途, 其中一硫代甘油的含有量为 4 mg - 6 mg/mL 所述组合物。

28. 权利要求 20 的用途, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种防腐剂, 其含有量为 0.01 - 10 mg/mL 所述组合物。

29. 权利要求 28 的用途, 其中所述的一种或多种防腐剂选自苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵、苯甲酸、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、苯甲酸钠、苯酚及其混合物组成的组。

30. 权利要求 29 的用途, 其中所述的一种或多种防腐剂是苯酚且其含有量为 2.0 - 3.0 mg/mL 所述组合物。

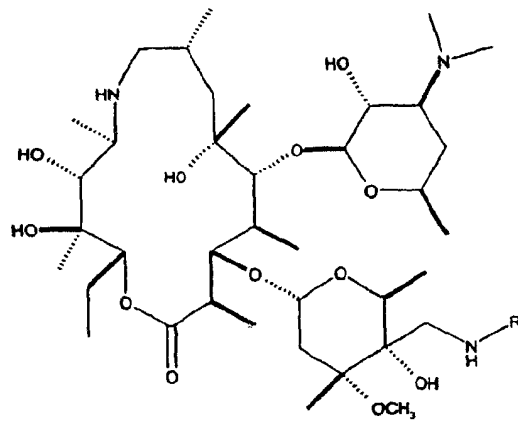
31. 权利要求 20 的用途, 其中所述的一种或多种酸选自乙酸、苯磺酸、柠檬酸、氢溴酸、盐酸、D-和 L-乳酸、甲磺酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、D-和 L-酒石酸、对甲苯磺酸、己二酸、天冬氨酸、樟脑磺酸、1,2-乙二磺酸、月桂基硫酸、葡庚糖酸、葡糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、1-羟基-2-萘甲酸、2-羟基乙磺酸、苹果酸、粘酸、硝酸、萘磺酸、棕榈酸、D-葡糖二酸、硬脂酸、马来酸、丙二酸、富马酸、苯甲酸、胆酸、乙磺酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、乳糖酸、赖氨酸、扁桃酸、1,5-萘二磺酸、烟酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、磺基水杨酸、色氨酸及其混合物组成的组。

32. 一种联合用药物, 它包括:

(a) 一种组合物, 该组合物包括:

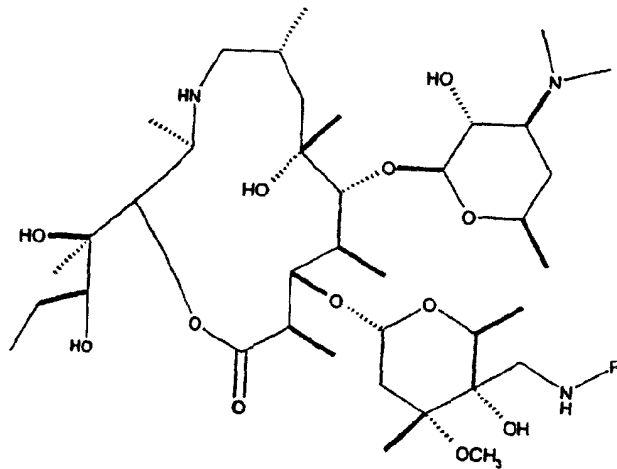
(1) 式(I)的化合物或其药物上可接受的盐和式(II)的化合物或其药物上可接受的盐的混合物;

其中式(I)的化合物的结构式如下:



(I)

其中式 (II) 的化合物的结构式如下:



(II)

其中在上述两个结构式中的基团 R 均相同且选自氢、C₁-C₁₀ 直链或支链烷基和 C₃-C₇ 环烷基组成的组; 和

(2) 药物上可接受的载体; 和

(b) 用于单剂量给药的说明书。

33. 权利要求 32 所述的联合用药物, 其中式 I 的化合物或其药物上可接受的盐和式 II 的化合物或其药物上可接受的盐的存在比例分别为 90%±4%: 10%±4%。

34. 权利要求 32 或 33 所述的联合用药物, 其中 R 是正丙基。

35. 权利要求 32 或 33 所述的联合用药物, 其中所述的药物上可

接受的载体包括:

- (a) 水;
- (b) 一种或多种以 0.2 mmol - 1.0 mmol/mL 所述混合物的总浓度存在的酸; 和
- (c) 一种或多种以 250 - 750 mg/mL 所述组合物的量存在的水混溶性共溶剂。

36. 权利要求 35 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂选自乙醇、异丙醇、二甘醇一甲醚、二甘醇丁醚、二甘醇一乙醚、二甘醇二丁醚、聚乙二醇-300、聚乙二醇-400、丙二醇、甘油、2-吡咯烷酮、N-甲基 2-吡咯烷酮、甘油缩甲醛、二甲亚砜、癸二酸二丁酯、聚山梨醇酯 80 及其混合物组成的组。

37. 权利要求 36 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种水混溶性共溶剂是丙二醇。

38. 权利要求 37 所述的联合用药物, 其中所述的丙二醇的存在量为 450 - 550 mg/mL 所述组合物。

39. 权利要求 38 所述的联合用药物, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种抗氧化剂, 其含有量为 0.01 mg - 10 mg/mL 所述组合物。

40. 权利要求 39 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种抗氧化剂选自亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲醛合次硫酸氢钠、1-抗坏血酸、异抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、一硫代甘油、巯基乙酸、硫羟乳酸、硫脲、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷胱甘肽、棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、去甲二氢愈创木酸、梲酸丙酯、 α -生育酚及其混合物组成的组。

41. 权利要求 40 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种抗氧化剂是一硫代甘油。

42. 权利要求 41 所述的联合用药物, 其中一硫代甘油的含有量为 4 mg - 6 mg/mL 所述组合物。

43. 权利要求 35 所述的联合用药物, 其中所述的组合物进一步包括一种或多种防腐剂, 其含有量为 0.01 - 10 mg/mL 所述组合物。

44. 权利要求 43 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种防腐剂选自苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵、苯甲酸、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、苯甲酸钠、苯酚及其混合物组成的组。

45. 权利要求 44 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种防腐剂是苯酚且其含有量为 2.0 - 3.0 mg/mL 所述组合物。

46. 权利要求 35 所述的联合用药物, 其中所述的一种或多种酸选自乙酸、苯磺酸、柠檬酸、氢溴酸、盐酸、D-和 L-乳酸、甲磺酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、D-和 L-酒石酸、对甲苯磺酸、己二酸、天冬氨酸、樟脑磺酸、1,2-乙二磺酸、月桂基硫酸、葡庚糖酸、葡糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、1-羟基-2-萘甲酸、2-羟基乙磺酸、苹果酸、粘酸、硝酸、萘磺酸、棕榈酸、D-葡糖二酸、硬脂酸、马来酸、丙二酸、富马酸、苯甲酸、胆酸、乙磺酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、乳糖酸、赖氨酸、扁桃酸、1,5-萘二磺酸、烟酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、磺基水杨酸、色氨酸及其混合物组成的组。

47. 权利要求 1 的用途, 其中所述的单剂量在每 kg 体重共同服用 0.5 mg 式 1 和 2 的化合物 (mg/kg) - 20 mg/kg 的范围。

48. 权利要求 47 所述的方法，其中所述的单剂量在每 kg 体重共同服用 1.25 mg 式 1 和 2 的化合物 (mg/kg) - 10 mg/kg 的范围。

49. 权利要求 48 所述的方法，其中所述的单剂量在每 kg 体重共同服用 2.0 mg 式 1 和 2 的化合物 (mg/kg) - 5.0 mg/kg 的范围。

氮杂大环内酯抗生素组合物在治疗或预防哺乳 动物细菌或原生动感染中的应用

发明背景

本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动感染的包括氮杂大环内酯类(azalide)抗生素化合物异构体混合物的药物组合物的使用方法。本发明进一步涉及增加哺乳动物急性或慢性注射部位耐受性的方法,该方法包括给予氮杂大环内酯类抗生素异构体混合物的步骤。本发明还涉及包括氮杂大环内酯类抗生素异构体混合物、药物上可接受的载体和用于单剂量给药的说明书的联合用药物。

已经报导了抗哺乳动物、鱼和鸟类的各种细菌和原生动感染的大环内酯类抗生素药(例如,参见国际专利申请公开号 WO 98/56802 和 WO 99/12552)。这些化合物一般具有与一个或多个糖部分所连接的 12-22 个碳原子的大环内酯环。大环内酯类抗生素对 50S 核糖体亚基起作用以便抑制微生物的蛋白质合成。大环内酯类抗生素的实例包括林可霉素、属于红霉素 A 衍生物的阿奇霉素和其它氮杂大环内酯类化合物。

含有氮杂大环内酯类化合物作为活性组分的药物组合物的研发已经出现了显著的挑战。某些氮杂大环内酯类能够在溶液中异构化。因此,难以生产包括单一异构体或固定比例的异构体的可再现的抗生素组合物。其次,含有固定量的特定氮杂大环内酯类异构体的组合物在一段时间内可能改变。第三,氮杂大环内酯类的内酯环和糖甚至在轻度酸性或碱性 pH 环境中也易于水解,从而降低抗生素组合物的功效和储存期限。

本发明的一个目的是提供使用克服了上述缺陷的抗生素组合物治疗或预防哺乳动物细菌或原生动感染的方法。

处于通过环境或饮食的改变或通过携带不熟知病原体的新动物

一起居留应激反应状态下的家畜动物对疾病特别敏感。这种应激反应在首次销售动物时发生且由此得知这些动物处于危险中。许多疾病会高度蔓延且可以导致兽群中的高死亡率和发病率。因为大部分抗生素倾向于在体内具有较短的寿命，所以通常需要多剂量来预防疾病。此外，患病动物需要反复剂量的这些药物。

因此，本发明的一个目的是提供用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动物感染的方法，该方法包括给予单剂量的氮杂大环内酯类抗生素化合物异构体混合物的步骤。

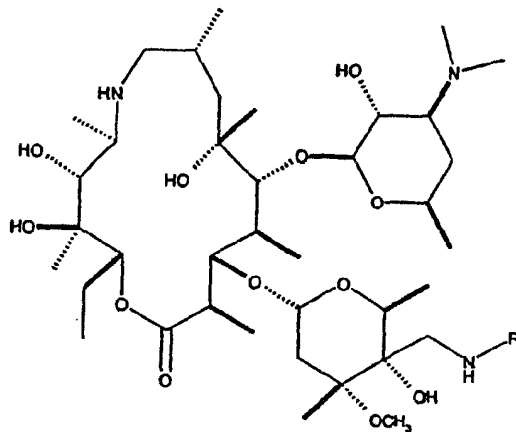
本文引用的任何参考文献不应表示这类参考文献是针对本发明的现有技术。

发明概括

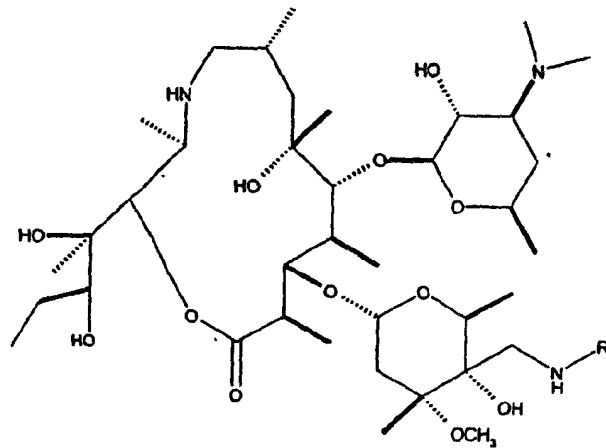
本发明在第一个实施方案中涉及一种用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动物感染的方法，该方法包括根据哺乳动物对这类治疗或预防的需要对其给予单剂量有效量的一种组合物的步骤，所述的组合物包括：

(a) 式(I)的化合物或其药物上可接受的盐和式(II)的化合物或其药物上可接受的盐的混合物；

其中式(I)的化合物的结构式如下：



其中式(II)的化合物的结构式如下：



(II)

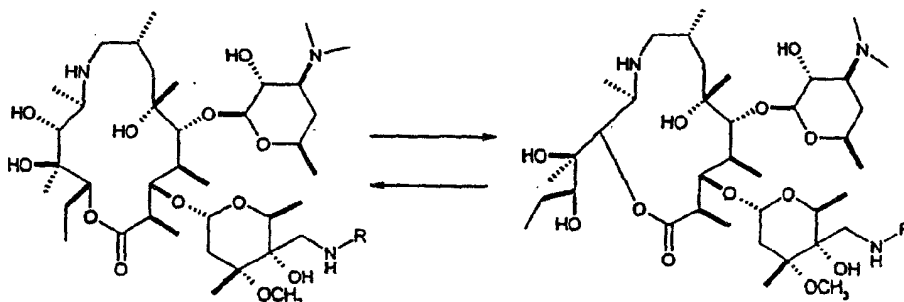
其中在上述两个结构式中的基团 R 均相同且选自氢、 C_1-C_{10} 直链或支链烷基和 C_3-C_7 环烷基组成的组；和 (b) 药物上可接受的载体。

本发明在第二个实施方案中涉及一种用于增加哺乳动物急性或慢性注射部位耐受性的方法，该方法包括根据哺乳动物的需要对其给予单剂量有效量的一种组合物的步骤，所述的组合物包括：(a) 式 (I) 的化合物或其药物上可接受的盐和式 (II) 的化合物或其药物上可接受的盐的混合物；和 (b) 药物上可接受的载体。

本发明在第三个实施方案中涉及一种联合用药物，它包括：(a) (1) 式 (I) 化合物或其药物上可接受的盐和式 (II) 化合物或其药物上可接受的盐的混合物；和 (2) 药物上可接受的载体；以及 (b) 用于单剂量给药的说明书。

可以参照详细描述和举例说明本发明非限制性实施方案的解释性实施例来更完整地理解本发明。

发明详述



式 I

式 II

本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动物的感染的方法，该方法包括给予单剂量有效量的药物组合物的步骤，所述的药物组合物包括式(I)的化合物或其药物上可接受的盐和式(II)的化合物或其药物上可接受的盐的混合物和药物上可接受的载体，其中R如上述所定义。优选R为正丙基。

属于15元环的氮杂大环内酯类的式I的化合物是相应于属于13元环的氮杂大环内酯类的式II的化合物的同分异构体。因此，本文所用的术语“异构体混合物”指的是式I化合物或其药物上可接受的盐及其相应属于式II化合物或其药物上可接受的盐的13元环氮杂大环内酯类异构体的混合物。在一个优选的实施方案中，所述的异构体混合物包括比例分别为约90%±4%:约10%±4%的式I化合物与式II化合物的混合物。R为正丙基的式I化合物(“N-(正丙基)异构体I”)的化学名为(2R, 3S, 4R, 5R, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R)-13-((2, 6-双脱氧-3-O-甲基-3-O-甲基-4-C-((丙氨基)-甲基)- α -L-核-己吡喃糖基)氧)-2-乙基-3, 4, 10-三羟基-3, 5, 8, 10, 12, 14-六甲基-11-((3, 4, 6-三脱氧-3-(二甲氨基)- β -D-木-己吡喃糖基)氧)-1-氧杂-6-氮杂环十五烷-15-酮。R为正丙基的式II化合物(“N-(正丙基)异构体II”)的化学名为(3R, 6R, 8R, 9R, 10S, 11S, 12R)-11-((2, 6-双脱氧-3-C-甲基-3-O-甲基-4-C-((丙氨基)甲基)- α -L-核-己吡喃糖基)氧)-2-((1R, 2R)-1, 2-二羟基-1-甲基丁基)-8-羟基-3, 6, 8, 10, 12-五甲基-9-((3, 4, 6-三脱氧-3-(二甲氨基)- β -D-木-己吡喃糖基)氧)-1-氧杂-4-氮杂环十三烷-13-酮。可以由式II化合物的转内酯化反应而形成式I的化合物。同样，可以由式I化合物的转内酯化反应而形成式II的化合物。

用于获得R为H或C₁-C₁₀烷基的式I化合物的方法公开在国际公开号WO 98/56802中，将该文献引入本文作为参考。还可以将国际公开号WO 98/56802中公开的方法用于获得式I的化合物，其中R为C₃-C₇环烷基，该方法特别通过选择所需的C₃-C₇环烷基胺来取代C₁-C₁₀烷基胺或氨的等同物来进行。用于获得式II化合物的方法在本文中描述。式I和式II的化合物是抗生素活性剂。

可以使用本文公开的方法迅速获得包括比例为约 90%±4%:约 10%±4%的式 I 化合物与式 II 化合物的组合物而与它们的原始比例无关。认为约 90%±4%:约 10%±4%比例的式 I 化合物或其药物上可接受的盐与式 II 化合物或其药物上可接受的盐构成了异构体的平衡混合物。因此, 本文所用的术语“异构体的平衡混合物”指的是比例分别为约 90%±4%:约 10%±4%的式 I 化合物或其药物上可接受的盐与式 II 化合物或其药物上可接受的盐的异构体混合物。可以一致地生产包括异构体的平衡混合物的抗生素组合物且提供了检测或消费者使用的标准。因此, 非常需要包括异构体的平衡混合物的组合物。

C₁-C₁₀ 直链或支链烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-1-丙基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-1-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-3-丁基、2, 2-二甲基-1-丙基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-1-戊基、3-甲基-1-戊基、4-甲基-1-戊基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2, 2-二甲基-1-丁基、3, 3-二甲基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、1-庚基、2-庚基、3-庚基、2-甲基-1-己基、3-甲基-1-己基、4-甲基-1-己基、2-甲基-2-己基、3-甲基-2-己基、4-甲基-2-己基、2, 2-二甲基-1-戊基、3, 3-二甲基-1-戊基、4, 4-二甲基-1-戊基、1-辛基、2-辛基、3-辛基、4-辛基、2-甲基-1-庚基、3-甲基-1-庚基、4-甲基-1-庚基、2-甲基-2-庚基、2, 2-二甲基-1-己基、2-乙基-1-己基、3-乙基-1-己基、4-乙基-1-己基、1-壬基、2-壬基、3-壬基、4-壬基、2-甲基-1-辛基、3-甲基-1-辛基、4-甲基-1-辛基、5-甲基-1-辛基、2, 2-二甲基-1-庚基、2-乙基-1-庚基、3-乙基-1-庚基、4-乙基-1-庚基、1-癸基、2-甲基-1-壬基、3-甲基-1-壬基、4-甲基-1-壬基、5-甲基-1-壬基、2, 2-二甲基-1-辛基、2-乙基-1-辛基、3-乙基-1-辛基、4-乙基-1-辛基和 5-乙基-1-辛基。

C₃-C₇ 环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基环己基和环庚基。

本文所用的术语“药物上可接受的盐”包括但不限于存在于用于本

发明组合物中的碱性氨基的盐。实际上属于碱性的本发明方法中使用的化合物能够与不同的无机和有机酸形成各种盐。可以用于制备这类碱性化合物的药物上可接受的酸加成的盐的酸是那些形成无毒性的酸加成的盐、即含有药物上可接受的阴离子的盐，所述的酸包括但不限于乙酸、苯磺酸、柠檬酸、氢溴酸、盐酸、D-和L-乳酸、甲磺酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、D-和L-酒石酸、对甲苯磺酸、己二酸、天冬氨酸、樟脑磺酸、1,2-乙二磺酸、月桂基硫酸、葡庚糖酸、葡糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、1-羟基-2-萘甲酸、2-羟基乙磺酸、苹果酸、粘酸、硝酸、萘磺酸、棕榈酸、D-葡糖二酸、硬脂酸、马来酸、丙二酸、富马酸、苯甲酸、胆酸、乙磺酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、乳糖酸、赖氨酸、扁桃酸、1,5-萘二磺酸(napadisyllic acid)、烟酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、磺基水杨酸、色氨酸及其混合物。优选以水溶液的形式使用上述酸中的无机酸；更优选以稀释的、例如< 2M水溶液的形式使用无机酸。可以以稀水溶液或有机溶液的形式使用上述酸中的有机酸，其中所述的有机溶液包括足以溶解所述有机酸和式 I 化合物的溶剂。

除上述酸外，本发明方法中使用的化合物还可以与各种氨基酸形成药物上可接受的盐。

可以通过使式 I 的化合物与酸或碱接触来获得式 II 的化合物。

在这方面使用的酸包括但不限于诸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、氢氟酸、硫酸和硝酸这样的无机酸和诸如富马酸、乙酸、三氟乙酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸这样的有机酸。优选以水溶液的形式使用无机酸；更优选以稀释的、例如< 2M水溶液的形式使用无机酸。可以以稀水溶液或有机溶液的形式使用有机酸，其中所述的有机溶液包括足以溶解所述有机酸和式 I 和 II 化合物的溶剂。

在这方面使用的碱包括：诸如钠、锂、钾、镁或钙的氢氧化物这样的无机碱；钠、锂或钙的碳酸盐和碳酸氢盐；镁的碳酸盐或碳酸氢钙或碳酸钙。另外可用的是诸如三乙胺、乙基二异丙基胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、可力丁、卢剔啶及其混合物这样的有机碱。优选以稀

水溶液的稀释使用有机碱。优选以稀有机溶液的形式使用有机碱。优选无机碱或有机碱超过了无机酸或有机酸。

可以将式 I 的化合物加入到所述的酸或碱中或反之亦然。通过在约室温 - 约 100℃ 的温度下、优选在约室温 - 约 60℃ 的温度下且更优选在约 30℃ - 约 40℃ 的温度下加热式 I 化合物与酸或碱的混合物来促进式 I 化合物与所述的酸或碱反应。这类加热过程可以发生约 20 分钟 - 约 48 小时、优选约 1 小时 - 约 36 小时。

还可以通过在有溶剂存在的情况下加热式 I 的化合物来获得式 II 的化合物或其药物上可接受的盐。

这类加热过程在约室温 - 约 100℃ 的温度下、优选在约室温 - 约 60℃ 的温度下且更优选在约 30℃ - 约 40℃ 的温度下进行。加热过程可以发生约 20 分钟 - 约 48 小时、优选约 1 小时 - 约 36 小时。

可用的溶剂是那些足以溶解式 I 化合物的溶剂且包括但不限于低级链烷醇类、乙醚、丙酮、乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯、苯、甲苯、氯仿、二氯甲烷、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、N-甲基吡咯烷酮等及其混合物。

然而，式 I 的化合物转化成式 II 的化合物在包括质子溶剂的溶剂系统中进行得最为迅速。有用的质子溶剂包括但不限于：低级链烷醇类，诸如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇和仲丁醇；酚类化合物，诸如苯酚、卤酚类和萘酚类等；水；及其混合物。不过，应指出所述的质子溶剂不是羧酸。

如果所述的溶剂系统包括质子溶剂，那么该质子溶剂的含有量约为 10% - 约 75%（体积）、优选含有量约为 25% - 约 60%（体积）。

本领域技术人员可以理解：当在所述的加热温度下加热时，所述的质子溶剂在加热式 I 化合物的溶剂中易混溶。

优选所述的溶剂系统包括乙腈。更优选所述的溶剂系统进一步包括低级链烷醇或水。如果该溶剂系统包括低级链烷醇，那么优选所述的低级链烷醇是甲醇。

可以通过例如重结晶、柱色谱法、制备型板或 CHROMATOTRON® 装置

这样的标准方式或本领域技术人员所公知的其它方式来分离或纯化式 II 的化合物。如果使用色谱法来分离或纯化式 II 的化合物，那么本发明者已经发现包括烃溶剂和有机胺的洗脱剂系统与其它洗脱剂系统相比使分离效果提高。在这方面有用的烃溶剂包括但不限于戊烷、己烷或己烷类、庚烷、石油醚、苯、甲苯、二甲苯等。优选的烃溶剂是己烷或己烷类。有用的有机胺类包括但不限于二乙胺、三乙胺、乙基二异丙基胺、吡啶、4-二甲氨基吡啶、可力丁、卢剔啶及其混合物。优选所述的有机胺是二乙胺。

包括烃溶剂和有机胺的洗脱剂系统进一步有利地包括极性有机溶剂。向洗脱剂系统中添加极性有机溶剂的结果与不包括极性有机溶剂的洗脱剂系统相比使式 II 的化合物更好地从其它化合物中分离。

有用的极性有机溶剂包括但不限于低级链烷醇类、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、N-甲基吡咯烷酮、1,4-二噁烷、四氢呋喃、乙醚、乙酸乙酯等。优选所述的极性有机溶剂是乙腈。更优选所述的洗脱剂系统包括己烷类、二乙胺和乙腈。

烃溶剂、有机胺和可选的极性有机溶剂的比例可以改变，而一般来说，烃溶剂与有机胺之比在约 10 : 1 - 约 1 : 1、优选约 7 : 1 - 约 2 : 1 的范围。如果该洗脱剂系统进一步包括极性有机溶剂，那么该洗脱剂系统含有约 1% - 约 15% (体积)、优选约 1.5% - 约 10% (体积) 的所述极性有机溶剂。

用于本发明方法的药物组合物包括异构体与适量药物上可接受载体的混合物以便形成对哺乳动物适当给药的剂型。

在一个特定的实施方案中，术语“药物上可接受的”指的是联邦或国家政府管理局批准或在美国药典或其它一般认可用于哺乳动物的药典中所列的。术语“载体”指的是与异构体混合物一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这类药物载体可以是诸如水和油这样的液体，所述的油包括石油、动物或植物来源的那些油，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。所述的药物载体可以是盐水、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、脲等。此外，可以使用助剂、

稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。当对哺乳动物给药时，本发明的组合物和药物上可接受的载体优选是无菌的。当经静脉内给予本发明的组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液用作液体载体、特别是用作可注射溶液的液体载体。合适的药物载体还包括赋形剂，诸如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要，本发明的组合物还可以含有最少量的湿润剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。在一个优选的实施方案中，所述的药物上可接受的载体包括：(i) 水；(ii) 一种或多种总浓度约为 0.2 mmol - 约 1.0 mmol/mL 混合物的酸；和 (iii) 一种或多种含有量约为 250 - 约 750 mg/mL 组合物的与水可混溶的共溶剂。

本发明的组合物可以采用溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、小药丸、胶囊、含有液体的胶囊、粉剂、缓释制剂、栓剂、乳剂、气溶胶、喷雾剂、混悬剂或任意其它适合应用的剂型。在一种实施方案中，所述的药物上可接受的载体是胶囊(例如，参见美国专利 US 5, 698, 155)。合适的药物载体的其它实例描述在 E. W. Martin 的《Remington 氏药物科学》(“Remington's Pharmaceutical Sciences”)中。

可以如下制备用于本发明的包括异构体平衡混合物的组合物。所述的异构体的平衡混合物获自该混合异构体的溶液。当用于制备所述的异构体平衡混合物时，优选所述的异构体混合物包括基本上纯的式 I 的化合物。除非另有说明，本文所用的所谓“基本上纯的指的是具有至少 97% 的纯度。一般来说，在有一种或多种酸存在的情况下通过加热所述异构体混合物的水溶液来产生异构体的平衡混合物。在一个优选的实施方案中，在 pH 约 5.0 - 约 8.0、优选约 6.0 - 约 8.0 下将所述异构体混合物和一种或多种酸的水溶液加热至约 50°C - 约 90°C、优选约 60°C - 约 80°C 的温度下约 0.5 - 约 24 小时、优选约 1 - 约 10 小时。最优选在有一种或多种酸存在和 pH 约为 6.5 - 约 7.5 的条件下将所述的异构体混合物的溶液加热至约 65°C - 约 75°C 的温度下约 1 - 约

8小时。平衡的异构体混合物的浓度可以在约 50 mg/mL - 约 500 mg/mL、更优选约 100 mg/mL - 约 300 mg/mL 且最优选约 225 mg/mL - 约 275 mg/mL 溶液之间改变。

用于获得异构体的平衡混合物的合适的酸包括但不限于乙酸、苯磺酸、柠檬酸、氢溴酸、盐酸、D-和 L-乳酸、甲磺酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、D-和 L-酒石酸、对甲苯磺酸、己二酸、天冬氨酸、樟脑磺酸、1,2-乙二磺酸、月桂基硫酸、葡庚糖酸、葡糖酸、3-羟基-2-萘甲酸、1-羟基-2-萘甲酸、2-羟基乙磺酸、苹果酸、粘酸、硝酸、萘磺酸、棕榈酸、D-葡糖二酸、硬脂酸、马来酸、丙二酸、富马酸、苯甲酸、胆酸、乙磺酸、葡糖醛酸、谷氨酸、马尿酸、乳糖酸、赖氨酸、扁桃酸、1,5-萘二磺酸 (napadisyllic acid)、烟酸、聚半乳糖醛酸、水杨酸、磺基水杨酸、色氨酸及其混合物。优选所述的一种或多种酸是柠檬酸和盐酸。如果存在，那么柠檬酸的所含浓度约为 0.02 mmol - 约 0.3 mmol/mL 溶液。在一种实施方案中，使用约 0.2 mmol - 约 1.0 mmol/mL 溶液的浓度。由于不受任何理论限制，所以认为通过向异构体混合物溶液中添加酸而形成的盐因氮杂大环内酯类异构体本身起碱的作用而发挥了缓冲作用。本领域技术人员会认识到所需 pH 所要求的酸的量将根据所用的酸来改变且为了将 pH 维持在所需范围内，可以将添加的酸和/或碱加入到酸和异构体混合物溶液中。合适的碱包括但不限于碱金属氢氧化物和碳酸盐、碱金属碳酸氢盐和碱土金属氢氧化物和碳酸盐。优选氢氧化钠和氢氧化钾。便利的是使用上述酸和碱的水溶液形式。

包括异构体混合物的组合物可用于治疗或预防哺乳动物细菌或原生动物感染。还可将组合物用作形成稳定组合物和稳定的平衡组合物的中间体。

用于本发明方法的稳定组合物的制备方法包括用一种或多种与水可混溶的有机溶剂 ("共溶剂") 稀释所述异构体混合物的步骤。也可用于本发明方法的稳定的平衡组合物的制备方法包括用一种或多种共溶剂稀释平衡的异构体混合物的步骤。这种共溶剂不会显著影响式 I 化合物与式 II 化合物在所述组合物中的比例而实际上保护了它们的结

构完整性。本文所用的式 I 化合物或式 II 化合物的“保护结构完整性”包括但不限于延缓其水解率、例如去克拉定糖氮杂大环内酯类的水解率并阻止其形成例如如下所定义的甲醛和乙醛插入产物的副产物的比例。由于不受任何理论限制，所以认为用共溶剂稀释改善了异构体混合物的混合物稳定性。此外通过存在的共溶剂可以使注射稳定组合物或稳定的平衡组合物时所经历的任何疼痛少于因注射没有如此稳定的组合物所经历的疼痛。用于稳定所述组合物的共溶剂包括但不限于：醇类，诸如乙醇和异丙醇；乙二醇醚类，诸如二甘醇一甲醚、二甘醇丁醚、二甘醇单乙醚和二甘醇二丁醚；聚乙二醇类，诸如聚乙二醇-300和聚乙二醇-400；二醇类，诸如丙二醇和甘油；吡咯烷酮类，诸如 2-吡咯烷酮和 N-甲基 2-吡咯烷酮；甘油缩甲醛；二甲亚砜；癸二酸二丁酯；聚氧乙烯山梨糖醇酯类，诸如聚山梨醇酯 80；及其混合物。优选用于稳定可注射溶液形式的组合物的共溶剂包括但不限于乙醇、诸如聚乙二醇-300 和聚乙二醇-400 这样的聚乙二醇类、诸如丙二醇和甘油这样的二醇类、诸如 2-吡咯烷酮和 N-甲基 2-吡咯烷酮这样的吡咯烷酮、甘油缩甲醛、二甲亚砜、诸如聚山梨醇酯 80 这样的聚氧乙烯山梨糖醇酯类及其混合物；更优选甘油缩甲醛、N-甲基 2-吡咯烷酮和丙二醇；且最优选丙二醇。在一种实施方案中，将约 250 - 约 750 mg/mL 药物组合物的用量的共溶剂用于稳定它们。在一个优选的实施方案中，使用约 400 - 约 600 mg 共溶剂/mL 药物组合物。

在一个最优选的实施方案中，使用约 450 - 约 550 mg 共溶剂/mL 药物组合物。

在一种实施方案中，在平衡前向异构体混合物中加入一种或多种共溶剂。在这种情况下，在 pH 约 5.0 - 约 8.0、优选 pH 约 6.0 - 约 8.0 下将所得混合物加热至约 50℃ - 约 90℃、优选约 60℃ - 约 80℃ 的温度下约 0.5 - 约 24 小时、优选约 1 - 约 10 小时。在一个优选的实施方案中，在没有共溶剂存在的情况下对所述的异构体混合物进行平衡，在所平衡的组合物已经冷却至约室温后加入共溶剂。

在添加共溶剂后，可以重新调节所得溶液的 pH 以便进一步改善组

合物的稳定性。通过本领域技术人员所公知的方法、诸如例如通过添加一定量的上述酸或碱例如 10% (w/w) 的储备溶液来调节 pH 且例如使用 pH 计量器来测定所得溶液的 pH。在一种实施方案中, 如果必要, 将所得溶液的 pH 调节至约 4.5 - 约 7.5、优选约 5.0 - 约 6.0、最优选约 5.2 - 约 5.6。

包括异构体混合物和药物上可接受的载体的药物组合物可用于本发明的方法。优选所述的药物组合物进一步包括水、一种或多种酸和一种或多种与水可混溶的共溶剂。所述异构体混合物在所述药物组合物中的用量在约 50 mg/mL 药物组合物 - 约 200 mg/mL 药物组合物的范围。优选所述的药物组合物包括约 75 mg - 约 150 mg、更优选约 90 - 约 110 mg 的异构体混合物/mL 药物组合物。

所述的药物组合物还可以进一步包括一种或多种抗氧化剂。抗氧化剂延缓或防止药物组合物的氧化性分解的速率。合适的抗氧化剂包括但不限于亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、焦角亚硫酸钠、硫代硫酸钠、甲醛合次硫酸氢钠、I-抗坏血酸、异抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、一硫代甘油、硫代乙醇酸、硫代乳酸、硫脲、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇、谷胱甘肽、棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、去甲二氢愈创木酸、 橙酸丙酯、 α -生育酚及其混合物。本领域技术人员认识到抗氧化剂的用量根据所用抗氧化剂的不同而改变。在一个优选的实施方案中, 如果存在, 那么抗氧化剂的含有量约为 0.01 mg - 约 10 mg/mL 药物组合物。在一个更为优选的实施方案中, 所述的抗氧化剂是一硫代甘油且含有量约为 1 mg - 约 8 mg/mL 药物组合物。在一个最优选的实施方案中, 所述的抗氧化剂是一硫代甘油且含有量约为 4mg - 约 6 mg/mL 药物组合物。

所述的药物组合物可以包括一种或多种防腐剂或不含防腐剂。防腐剂用于延缓或防止微生物繁殖的速率, 特别是当药物组合物与空气接触时更是如此。有用的防腐剂可有效抵抗广谱微生物; 在药物组合物的使用期限内物理、化学和微生物学特性方面保持稳定; 无毒性; 充分溶解; 与组合物中的其它成分相容; 且就味道和气味而言可以被

接受。合适的防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵、苯甲酸、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、苯甲酸钠、苯酚及其混合物。在一个优选的实施方案中，所述的一种或多种防腐剂选自苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸甲酯/对羟基苯甲酸丙酯组合和苯酚组成的组。如果存在，那么所述的一种或多种防腐剂的含有量约为 0.01 - 约 10 mg/mL 药物组合物。优选所述的一种或多种防腐剂是苯酚且含有量约为 2.0 - 约 5.0 mg/mL、更优选约 2.0 - 约 3.0 mg/mL 药物组合物。本领域技术人员认识到所用防腐剂在本发明组合物中的用量将取决于所选择的防腐剂且可以以较低的浓度、甚至是低于约 0.01 mg/mL 药物组合物的浓度使用某些防腐剂。

在一种实施方案中，用于本发明方法的药物组合物具有约 5.0 - 约 7.0 的 pH 且包括：(1) 约 50 mg - 约 200 mg/mL 药物组合物含有量的异构体混合物；(2) 约 0.02 mmol - 约 0.3 mmol/mL 药物组合物浓度的柠檬酸和可选的有效达到所述 pH 范围的用量的盐酸；(3) 约 250 - 约 750 mg/mL 药物组合物含有量的丙二醇；(4) 约 1 mg - 约 15 mg /mL 药物组合物含有量的一硫代甘油；和(5) 约 100 - 约 750 mg/mL 药物组合物含有量的水。在一个优选的实施方案中，所述的异构体混合物是异构体的平衡混合物。在一个更为优选的实施方案中，所述的异构体的平衡混合物是 R 为正丙基的异构体的平衡混合物。

在一个优选的实施方案中，可用于本发明方法的药物组合物具有约 5.0 - 约 6.0 的 pH 且包括：(1) 约 75 mg - 约 150 mg/mL 药物组合物含有量的异构体混合物；(2) 约 0.05 mmol - 约 0.15 mmol/mL 药物组合物浓度的柠檬酸和可选的有效达到所述 pH 范围的用量的盐酸；(3) 约 400 - 约 600 mg/mL 药物组合物含有量的丙二醇；(4) 约 1 mg - 约 8 mg /mL 药物组合物含有量的一硫代甘油；和(5) 约 250 - 约 550 mg/mL 药物组合物含有量的水。更优选所述的异构体混合物是异构体的平衡混合物。在一个更为优选的实施方案中，所述的异构体的平衡混合物是 R 为正丙基的异构体的平衡混合物。

在一个更为优选的实施方案中，可用于本发明方法的药物组合物具有约 5.2 - 约 5.6 的 pH 且包括：(1) 约 90 mg - 约 110 mg/mL 药物组合物含有量的异构体混合物；(2) 约 0.075 mmol - 约 0.125 mmol/mL 药物组合物浓度的柠檬酸和可选的有效达到所述 pH 范围的用量的盐酸；(3) 约 450 - 约 550 mg/mL 药物组合物含有量的丙二醇；(4) 约 4 mg - 约 6 mg/mL 药物组合物含有量的一硫代甘油；和(5) 约 300 - 约 500 mg/mL 药物组合物含有量的水。最优选所述的异构体混合物是异构体的平衡混合物。在一个更为优选的实施方案中，所述的异构体的平衡混合物是 R 为正丙基的异构体的平衡混合物。

可以将用于本发明方法的药物组合物与用于单剂量给药的说明书一起提供给最终的使用者、例如临床医师或兽医。因此，本发明提供了包括本发明组合物和用于单剂量给药的说明书的联合用药物。

可以如下制备所述的药物组合物。将试剂加入到可充有氮气的不锈钢或搪玻璃夹套容器中。将注射用水加入到该反应容器中并开始搅拌。加入各种其它成分，同时持续搅拌该混合物。加入约 0.02 mmol - 约 0.5 mmol/mL 水浓度的酸并使之溶解。可以加入例如 10% (w/w) 盐酸水溶液这样的酸的水溶液以便将 pH 调节至所需范围并混合该溶液。此时将异构体混合物以缓慢和少量的方式加入到水与酸的混合物中以避免凝结。此时，可以在添加式 II 的化合物前添加式 I 的化合物、在添加式 I 的化合物前添加式 II 的化合物或可以一起添加式 I 的化合物和式 II 的化合物。使异构体混合物溶解并测定所得溶液的 pH。在一种实施方案中，所述异构体混合物约为 50 mg - 约 500 mg/mL、优选约 100 - 约 300 mg/mL 且最优选约 225 - 约 275 mg/mL 的所得溶液。然后将该溶液加热至约 $70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 的温度下并将该溶液维持在该温度下至获得异构体的平衡混合物为止。已经获得的异构体平衡混合物的测定方法包括使用凝胶色谱法、薄层色谱法和高压液相色谱法。一般使用本文所述的条件在约 1 - 约 8 小时后获得异构体的平衡混合物。一旦获得了异构体的平衡混合物，则将所得溶液冷却至约 $25^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 。将该溶液用作药物组合物。优选以约 250 - 约 750 mg/mL 药物组合物

的用量添加共溶剂。可以以约 0.01 mg - 约 10 mg/mL 药物组合物的用量添加抗氧化剂。如果存在,那么以约 0.01 - 约 10 mg/mL 药物组合物的用量添加防腐剂并将通过添加酸和/或碱、例如作为 10%(w/w)水溶液或固体形式而将 pH 调节至约 5.0 - 约 8.0、优选调节至约 5.0 - 约 6.0。将所得混合物稀释至所需体积。在一种实施方案中,所述异构体平衡混合物的终浓度约为 50 mg - 约 200 mg、优选约 75 mg - 约 150 mg 且最优选约 90 mg - 约 110 mg/mL 所得药物组合物。

优选例如通过使所述组合物通过预滤器、例如 5-10 微米滤器且然后通过 0.2 微米的已经预先灭菌的最终灭菌滤器来对所得组合物进行灭菌。通过在 121°C 下的湿热高压灭菌法来对无菌滤器进行灭菌并在灭菌前和产物过滤后使用压力保持法测试其完整性。将无菌溶液加入到例如玻璃管这样在 250°C 下的干热管道中灭菌 60 分钟并去致热原 240 分钟的适宜容器中。将容器的上部空间用例如氩气或优选用氮气这样的惰性气体冲洗。给该容器加盖通过洗涤除去致热原并在 121°C 下用湿热高压灭菌法灭菌 60 分钟的塞子。然后将该容器完全密封。本领域技术人员将会认识到可以将对上述步骤最低限度的改变用于制备无菌组合物。

本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物的方法,该方法包括根据哺乳动物对这类治疗的需要对其给予药物有效量的药物组合物的步骤。可以将该药物组合物用于治疗由革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、原生动物和支原体导致的感染,导致感染的这些微生物包括但不限于大叶性肺炎放线杆菌、多杀巴斯德氏菌、溶血巴斯德氏菌、副猪嗜血菌、支气管败血牙孢杆菌 (*B. bronchiseptica*)、猪霍乱沙门氏菌、*S. pilo*、牛莫拉氏菌、睡眠嗜血菌、牛莫拉氏菌、祖氏艾美球虫 (*Eimeria zuernii*)、*Eimeria bovis*、*A. marginale*、猪肺炎枝原体、*Lawsonia intracellularis* 和葡萄球菌属、沙门氏菌属、衣原体属、球虫属、隐孢子虫属、大肠杆菌、嗜血杆菌属、*Neospora* 和链球菌属的种类。

除非另有说明,本文所用的术语“治疗”感染指的是减轻本发明方法中所述的细菌感染或原生动物感染的严重程度或根除它们。除非另

有说明，本文所用的所谓“预防”感染指的是预防哺乳动物体内一种或多种细菌或原生动物的确立和有害增殖。

除非另有说明，本文所用的术语“细菌感染”和“原生动感染”包括发生在哺乳动物、鱼和鸟类中的细菌感染和原生动感染以及与细菌感染和原生动感染相关的疾病，这些感染可以通过给予诸如本发明化合物这样的抗生素来治疗或预防。这类细菌感染和原生动感染以及与这类感染相关的疾病包括如下情况：与肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、粘膜炎莫拉氏菌、金黄色葡萄球菌或消化链球菌属的种类感染相关的肺炎、中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、扁桃腺炎和乳突炎；与化脓链球菌、C族和G族链球菌属、*Clostridium diptheriae*或溶血放线杆菌（*Actinobacillus haemolyticum*）感染相关的咽炎（pharyngitis）、风湿热和肾小球肾炎；与肺炎枝原体、侵肺军团菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌或肺炎衣原体感染相关的呼吸道感染；与金黄色葡萄球菌、凝固酶阳性葡萄球菌属（即表皮葡萄球菌、酿脓链球菌等）、酿脓链球菌、无乳链球菌、链球菌族C-F（微小菌落的链球菌属（minute-colony streptococci））、绿色链球菌（viridans streptococci）、极小棒杆菌、梭状芽孢杆菌属的种类或汉氏巴尔通氏体感染相关的非并发症性皮肤和软组织感染、脓肿、骨髓炎和产褥热；与腐生葡萄球菌或肠球菌属种类感染相关的非并发症性急性尿道感染；尿道炎和宫颈炎；和与砂眼衣原体、杜氏嗜血菌、苍白密螺旋体、解脲尿枝原体或淋病奈瑟氏球菌感染相关的性传播疾病；与金黄色葡萄球菌（食物中毒和中毒休克综合征）或A族、B族和C族葡萄球菌感染相关的毒素疾病；与幽门螺杆菌感染相关的溃疡；与回归热疏螺旋体感染相关的全身发热性综合征；与布氏疏螺旋体感染相关的莱姆病；和与砂眼衣原体、淋病奈瑟氏球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、流感嗜血杆菌或利斯特氏菌属种类感染相关的结膜炎、角膜炎和泪囊炎；与鸟分枝杆菌或胞内分枝杆菌感染相关的传播性鸟分枝杆菌综合征（MAC）疾病；与空肠弯曲杆菌德莱氏亚种感染相关的肠胃炎；与隐孢子虫属种类感染相关的肠原生动感染；与绿

色链球菌 (*viridans streptococci*) 感染相关的牙源性感染; 与百日咳博德特氏杆菌感染相关的顽固性咳嗽; 与产气荚膜梭状芽孢杆菌或类杆菌属种类感染相关的气性坏疽; 与幽门螺杆菌或肺炎衣原体感染相关的动脉粥样硬化。与可以在哺乳动物中治疗或预防的这类感染相关的细菌感染和原生动物感染和疾病包括下列情况: 与溶血巴斯德氏菌、多杀巴斯德氏菌、牛枝原体、睡眠嗜血菌、博德特氏菌属种类导致的感染相关的牛呼吸疾病; 与大肠杆菌或原生动物 (即球虫属、隐孢子虫属等) 导致的感染相关相关的小牛肠疾病; 与金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、无乳链球菌、克雷白氏杆菌属种类、棒状杆菌属、肠球菌属种类或大肠杆菌导致的感染相关的乳牛乳腺炎; 与大叶性肺炎放线杆菌 (*A. pleuro.*)、多杀巴斯德氏菌或枝原体属种类导致的感染相关的猪呼吸疾病; 与大肠杆菌、*Lawsonia intracellularis*、沙门氏菌属或猪痢疾小蛇菌 (*Serpulina hyodysenteriae*) 导致的感染相关的猪肠疾病; 与梭杆菌属种类感染相关的牛腐蹄病; 与大肠杆菌感染相关的牛子宫炎; 与坏死梭杆菌或节瘤偶蹄形菌感染相关的牛毛疣; 与牛莫拉氏菌感染相关的牛传染性角膜炎 (红眼); 与原生动物 (即 *neospora*) 感染相关的牛早产性流产; 猪回肠炎; 牛乳腺炎; 与大肠杆菌感染相关的狗和猫体内的尿道感染; 与表皮葡萄球菌、中间葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌属或多杀巴斯德氏菌感染相关的狗和猫的皮肤和软组织感染; 与产碱菌属种类、类杆菌属种类、梭状芽孢杆菌属种类、肠杆菌属种类、真杆菌属、消化链球菌属、卟啉单胞菌属或普雷沃氏菌属感染相关的狗和猫牙齿或口腔感染; 狗和猫的肺炎; 和与马驹放线芽孢杆菌 (*Actinobacillus equi*)、*Rodococcus equi*、马链球菌和兽疫链球菌相关的马的感染。可以按照本发明方法治疗或预防的其它细菌感染和原生动物感染以及与这类感染相关的疾病参照 J. P. Sanford 等的《Sanford 抗菌疗法指南》(“The Guide To Antimicrobial Therapy”) 第 26 版 (Antimicrobial Therapy, Inc., 1996)。

由所述混合物抑制所确定的人或哺乳动物病原体菌株生长的能力

来证实用于本发明方法的异构体混合物对细菌和原生动物的抗菌和抗原生动物的活性。

试验 I

下述试验 I 使用常规方法和解释标准并用于为可以产生防止确定的大环内酯抗性机制发生的化合物的化学修饰提供指导。在试验 I 中, 装配一组细菌菌株以包括各种靶向病原体种类, 包括已经特征化的大环内酯抗性机制的代表。该组菌株的应用能够使得化学结构/活性相关性在功效、活性谱和排除抗性机制所必不可少的结构基础或修饰方面得到确定。包括筛选的组的细菌病原体如下表中所示。在许多情况中, 利用大环内酯敏感性亲本菌株和来源于它的大环内酯抗性菌株来提供对化合物防止抗性机制发生的能力的更为确切的评价。含有命名为 *ermA/ermB/ermC* 的基因的菌株耐大环内酯类、lincosamides 和密柑霉素 B 抗生素, 这是由于 Erm 甲基化酶对 23S rRNA 分子的修饰(甲基化)所导致的, 由此一般地防止了所有三类结构的结合。已经描述了两类大环内酯溢出物; *msrA* 编码可防止大环内酯类和密柑霉素类进入的葡萄球菌属中的溢出系统成分, 而 *mefA/E* 编码看起来仅溢出大环内酯类的跨膜蛋白质。大环内酯类抗生素的失活可能发生且可以通过 2'-羟基(mph)的磷酸化或通过大环内酯裂解(酯酶)来介导。可以使用常规的聚合酶链反应(PCR)技术和/或通过对耐药因子进行测试来对菌株进行特征记述。PCR 技术在本申请中的应用描述在 J. Sutcliffe 等的“通过 PCR 检测红霉素抗性决定因子”(“Detection Of Erythromycin-Resistant Determinants By PCR”) - 《抗菌剂和化疗》(Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 40 (11), 2562-2566 (1996)。本试验在微量滴定盘中进行并按照国家临床实验室标准委员会(The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS))指南公布的经批准的标准即用于抗菌盘敏感性测试性能标准(Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests)第 6 版来解释; 将最低抑制浓度(MIC)用于对菌株进行比较。

最初将异构体混合物溶于二甲亚砜 (DMSO) 作为 40 mg/ml 储备溶液。

菌株名称	大环内酯抗性机制
金黄色葡萄球菌 1116	敏感性亲本
金黄色葡萄球菌 1117	ermB
金黄色葡萄球菌 0052	敏感性亲本
金黄色葡萄球菌 1120	ermC
金黄色葡萄球菌 1032	MsrA, mph, 酯酶
溶血葡萄球菌 1006	MsrA, mph
尿化脓链球菌 0203	敏感性亲本
尿化脓链球菌 1079	ermB
尿化脓链球菌 1062	敏感性亲本
尿化脓链球菌 1061	ermB
尿化脓链球菌 1064	ermB
无乳链球菌 1024	敏感性亲本
无乳链球菌 1023	ermB
肺炎链球菌 1016	敏感性
肺炎链球菌 1046	ermB
肺炎链球菌 1095	ermB
肺炎链球菌 1175	mefE
肺炎链球菌 0085	敏感性
流感嗜血菌 0131	敏感性
粘膜炎莫拉氏菌 0040	敏感性
粘膜炎莫拉氏菌 1055	红霉素中间体抗性
大肠埃希氏杆菌 0266	敏感性

试验 II 用于测试对多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*) 的活性且试验 III 用于测试对溶血巴斯德氏菌 (*Pasteurella haemolytica*) 的活性。

试验 II

本试验基于微量滴定方式的液体稀释法。将单菌落的多杀巴斯德氏菌(菌株 59A067)接种入 5 ml 的脑心输注(BHI)肉汤。通过将 1mg 异构体混合物溶解在 125 μ l 二甲亚砜(DMSO)中来制备溶液。使用未接种的 BHI 肉汤来制所述混合物的稀释液。通过两倍连续稀释使所用的异构体混合物的浓度在 200 μ g/ml - 0.098 μ g/ml 的范围。用未接种的 BHI 肉汤将多杀巴斯德氏菌接种的 BHI 稀释成 10^4 细胞混悬液/200 μ l。将该 BHI 细胞混悬液与相应连续稀释的异构体混合物混合并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 18 小时。最低抑制浓度(MIC)等于显示出与未接种的对照组比较测定的对多杀巴斯德氏菌生长表现出 100%抑制的混合物浓度。

试验 III

本试验基于应用 Steers Replicator 的琼脂稀释法。将分离自琼脂平板的 2-5 个菌落接种入 BHI 肉汤并在 37 $^{\circ}$ C 下通过振摇(200 rpm)保温过夜。第二天早晨将 300 μ l 完全生长的溶血巴斯德氏菌预培养物接种入 3ml 的新鲜 BHI 肉汤并在 37 $^{\circ}$ C 下通过振摇(200 rpm)保温。将适量的异构体混合物溶于乙醇并制备一系列两倍的连续稀释液。将 2 ml 相应的连续稀释液与 18 ml 的融化 BHI 琼脂混合并使之固化。当接种的溶血巴斯德氏菌培养物达到 0.5 McFarland 标准密度时,使用 Steers Replicator 将约 5 μ l 的溶血巴斯德氏菌培养物接种在含有不同浓度的异构体混合物的 BHI 琼脂平板上并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 18 小时。该混合物的初始浓度在 100-200 μ g/ml 的范围。MIC 等于显示出与未接种的对照组比较测定的对溶血巴斯德氏菌生长抑制达 100%的混合物浓度。

最优选按照 NCCLS 指南 1999 年 6 月第 19 卷第 11 期 M31-A 中的“分离自动物的细菌的抗菌盘和稀释敏感性试验的性能标准”(“Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals”)(ISBN

1-56238-377-9)、使用阳离子调节的 Mueller Hinton 肉汤来进行微量稀释试验,将该文献的内容引入本文作为参考。可以将本试验用于测定化合物对溶血巴斯德氏菌和多杀巴斯德氏菌的 MIC。例如,按照本标准将异构体的平衡混合物对溶血巴斯德氏菌(ATCC 14003)进行测试且发现具有 1 ug/mL 的 MIC。当按照本标准将异构体的平衡混合物对多杀巴斯德氏菌(ATCC 43137)进行测试时,发现 MIC 为 1 μ g/mL。

试验 IV

可以通过本领域技术人员众所周知的通常在小鼠中进行的常规动物预防研究来测定本发明药物组合物的体内活性。

在获得小鼠时将它们按照指定分配入笼(10 只/笼)并在使用前使它们最少对环境适应 48 小时。给动物经腹膜内接种 0.5 ml 的 3×10^3 CFU/ml 细菌混悬液(多杀巴斯德氏菌菌株 59A006)。每次实验至少有 3 个未给药的对照组,它们包括 1 个使用 0.1X 攻击剂量感染的对照组和 2 个使用 1X 攻击剂量感染的对照组;还可使用 10X 攻击剂量(data)的组。一般来说,可以在 30-90 分钟内攻击指定研究中的所有小鼠,尤其是如果将重复用注射器(诸如 Cornwalls 注射器)用于给予所述的攻击剂量时则更是如此。在攻击开始后 30 分钟给予第一次所述的药物组合物治疗。如果在 30 分钟结束时尚未对所有动物进行攻击,那么对第二者而言必不可少的是开始进行药物组合物的给药。给药途径是皮下或口服给药。将皮下剂量给药入颈背侧的松弛皮肤,而通过用针头饲喂来给予口服剂量。在两种情况中,每只小鼠使用 0.2 ml 的体积。在攻击后 30 分钟、4 小时和 24 小时给予组合物。在每次试验中包括经相同途径给予的已知功效的对照组合物。每天观察动物并记录各组中存活者的数量。在攻击后使多杀巴斯德氏菌模型监测持续 96 小时(4 天)。

PD₅₀ 是计算的剂量,在该剂量下测试的药物组合物可防止 50% 小鼠组因在没有治疗情况下可能致死的细菌感染导致的死亡率。

用于本发明方法的药物组合物在上述试验之一、特别是试验 IV 中

表现出了抗菌活性。

本发明进一步涉及提高哺乳动物的急性或慢性注射部位耐受性的方法，该方法包括根据哺乳动物对这类治疗的需要对其给予药物有效量的一种组合物的步骤，所述的组合物包括(a)异构体的混合物和(b)药物上可接受的载体。本文所用的所谓“提高急性注射部位耐受性”指的是当通过注射给予本发明的组合物时，减少注射部位上隆起和/或炎症的数量，特别是与注射诸如例如 MICOTIL 这样非所述异构体混合物的抗生素药后约 24-48 小时时存在的隆起和/或炎症数量相比注射后约 24-48 小时时存在的隆起和/或炎症的数量的减少。本文所用的所谓“提高慢性注射部位的耐受性”指的是与注射诸如例如 MICOTIL 这样非所述异构体混合物的抗生素药后 2 周存在的组织坏死数量相比在注射后约 2 周存在的注射部位上组织坏死的数量减少。在一个优选的实施方案中，所述的异构体混合物是异构体的平衡混合物。在另一个实施方案中，所述的异构体混合物是 R 为正丙基的异构体混合物。

可以将用于本发明方法的药物组合物根据这类治疗需要用于治疗人、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔、猫、狗和其它哺乳动物。特别地，可以将用于本发明方法的药物组合物尤其用于治疗牛呼吸疾病、猪呼吸疾病、牛传染性角膜结膜炎、牛球虫病、猪回肠炎、牛乳腺炎、小牛肠道疾病、猪肠道疾病、犬脓皮病、猫脓皮病、犬肺炎、猫肺炎、犬软组织疾病、猫软组织疾病、巴斯德氏菌病、微粒孢子虫病和传染性角膜炎。可以通过口腔、肌内、静脉内、皮下、眼内、非肠道、局部、阴道内或直肠途径给予所述的药物组合物。就对牛、猪或其它驯养的哺乳动物给药而言，可以以饲喂或口服的方式将所述的药物组合物作为兽用顿服药进行给药。优选经肌内、静脉内或皮下注射所述的药物组合物。在一个优选的实施方案中，以约 0.5 mg 异构体混合物/kg 体重(mg/kg) - 约 20 mg/kg 的单剂量给予所述的药物组合物。在一个更为优选的实施方案中，以约 1.25 mg/kg - 约 10 mg/kg 的单剂量给予所述的药物组合物。在一个最优选的实施方案中，以约 2.0 mg/kg - 约 5.0 mg/kg 的单剂量给予所述的药物组合物。最优选经皮下给予

所述的药物组合物。

可以与本发明组合物一起给予非所述异构体混合物的抗菌药和/或抗原生动物药、在给予本发明组合物之前或在给予本发明组合物之后给予非所述异构体混合物的抗菌药和/或抗原生动物药且可以使用多剂量的那些药物。然而，仅将本发明组合物给药1次、即以单剂量给药。本文所用的所谓“单剂量”指的是单次给予所述药物组合物能够治疗或预防细菌或原生动物感染。也就是说，尽管后续剂量的药物组合物可以提供附加的有益作用，但是在本发明方法中并不需要。此外，当以单剂量给药时，本发明的组合物不需要包括高于以多剂量给药时可能出现的异构体混合物用量。

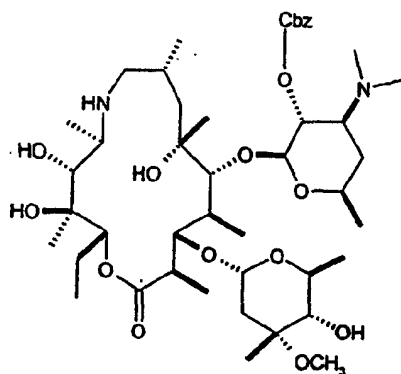
本发明的方法部分基于申请人对所述异构体混合物在组织和外周循环中具有较长的半衰期(约28小时)这一令人意外的发现。本领域技术人员易于认识到剂量的变化可以随所治疗的种类、体重和受治疗者的病情、对所述药物组合物的个体反应以及所选择的特定给药途径的不同而出现。在某些情况中，低于上述范围下限的剂量水平可能在治疗上是有效的，而在其它情况中仍然可以使用较大的剂量而不会导致任何有害的副作用，条件是首先将这类较大剂量在全天内分成几个小剂量给药。

下面的实施例进一步说明获得用于本发明方法的组合物的方法。应理解本发明并不限于下面提供的特别具体的实施例。

实施例 1

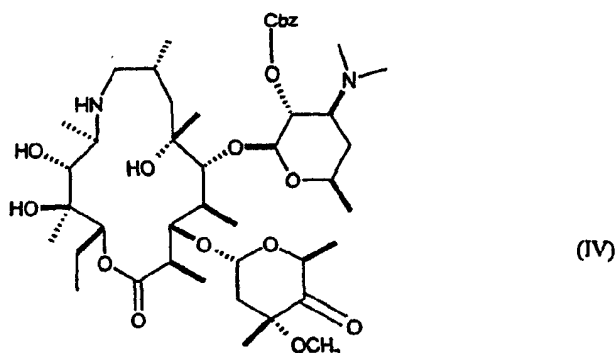
N-(正丙基)异构体 II 的合成。向2 L锥形瓶中加入去甲阿齐霉素(190.5 g, 259.2 mmol)、二氯甲烷(572 mL)和硫酸镁(38 g)。将该混合物搅拌10分钟，然后过滤入5 L圆底烧瓶。再加入二氯甲烷(2285 mL)并将该溶液冷却至0-5℃。接着在10分钟内加入CBZ-C1(58.4 mL)。在~0℃下将该反应体系搅拌6小时，然后在环境温度下搅拌过夜。HPLC分析表明存在残余的原料而使得将该反应体系重新冷却至~0℃并再一次加入CBZ-C1(19.5 mL)。在0℃下将该反应体系搅拌5.5

小时，然后在环境温度下搅拌 2.5 小时。TLC 表明反应完全。饱和碳酸氢钠水溶液 (953 mL) 加入该反应体系骤冷并分离出各相。将有机相用硫酸镁干燥，然后过滤并浓缩至得到式 (III) 的化合物：



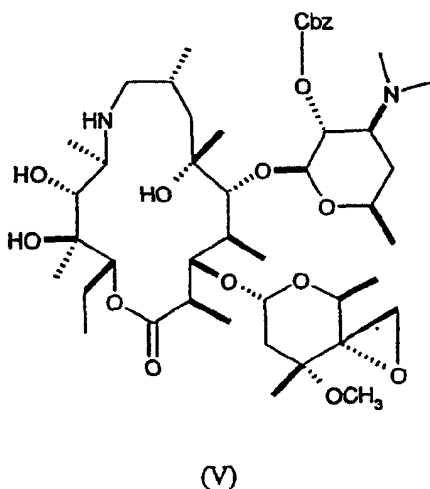
(III)

在 -65°C 下向含有式 (III) 化合物 (225.3 g) 的二氯甲烷 (901 mL) 和 DMSO (450 mL) 溶液的 5 L 圆底烧瓶中加入三氟乙酸酐 (82.4 mL)。在整个添加过程中将温度维持在 -60°C ，整个添加过程在 9 分钟内完成。将该反应体系在 -65 – -70°C 下搅拌 20 分钟。用三乙胺 (145 mL) 使反应骤冷，然后在 -60 – -65°C 下搅拌 20 分钟。接着在 3 分钟内向该反应混合物中加入水 (1127 mL)，此时温度升至 -2°C 。将该反应混合物搅拌 10 分钟并使各相分离。将有机相用水 (675 mL) 洗涤、然后用饱和氯化钠水溶液 (675 mL) 洗涤。将有机相用硫酸镁干燥，然后过滤并通过蒸馏除去有机溶剂。添加 MTBE 并蒸馏至除去所有微量的二氯甲烷和 DMSO。再加入 MTBE 至总体积为 3380 mL。加入二苯甲酰基-D-酒石酸一水合物 (87.8 g) 的 MTBE (1126 mL) 的溶液以便形成浓稠的淤浆。将该混合物加热至回流并搅拌过夜。在冷却至环境温度后，在布氏漏斗上收集固体并用 MTBE 冲洗。将该固体在 40°C 下的干燥箱中干燥至得到 258.3 g 的式 (IV) 化合物的二苯甲酰基酒石酸盐：



向 3 L 圆底烧瓶中加入二氯甲烷(800 mL)和式(IV)化合物的二苯甲酰基酒石酸盐(188 g)。加入水(400 mL)和碳酸钾(45.5 g)并在环境温度下将该混合物搅拌 5 分钟。将有机相分离、然后用水(250 mL)洗涤并用硫酸镁干燥。通过过滤除去干燥剂并在氮气流中蒸发所得溶液至终体积为 623 mL, 从而得到一种游离碱酮。

向 5 L 圆底烧瓶中加入 THF (623 mL)和溴化三甲基铈(74.7 g)。将所得淤浆冷却至 -10°C 并加入叔丁醇钾(54.4 g)。在 -10°C 下将该反应混合物搅拌 10 分钟, 然后在 5 分钟内冷却至 -70°C 。在 11 分钟内加入所述的游离碱酮溶液, 保持温度在 $-60 - -65^{\circ}\text{C}$ 。HPLC 显示在 90 分钟后反应完成。在 -60°C 下使用氯化铵(315 g)溶于水(1800 mL)所得到的溶液使该反应体系骤冷。在冷却过程中温度升至 -5°C 。将该反应混合物温至 $5-10^{\circ}\text{C}$ 并分离各相。将有机相用硫酸钠干燥, 然后过滤并浓缩至得到式(V)的化合物(117.4 g)、为一种黄色泡沫体。HPLC 显示峰面积的纯度为 61.4%。



向式(V)的化合物(275 g, 312 mmol)溶于无水甲醇(2.75L)所得到的溶液中加入碘化钾(518 g, 3.12 mol)和正丙基胺(250 mL, 3.04 mol)。在45℃下将该混合物搅拌过夜。TLC显示反应完全。将该反应体系在旋转蒸发器上浓缩并使残余物分配在水(2.5 L)与二氯甲烷(2.5 L)之间。使用3N的盐酸水溶液将水相的pH调节至6.7。将提取步骤再重复一次。将合并的水相与新制的二氯甲烷(1.5 L)合并并使用固体碳酸钾将水相的pH调节至8.5。分离各相并再用二氯甲烷将水相重新提取两次。将合并的有机相用硫酸钠干燥,然后过滤。将滤液在旋转蒸发器上浓缩而得到淡棕色泡沫体(230 g)。在应用19/3 (v/v)己烷-二乙胺作为流动相的淤浆填充的硅胶柱上对该泡沫体进行纯化。按照这种方式,125 g粗产物得到了72 g N-(正丙基)异构体 I、为一种白色无定形泡沫体。

在环境温度下将N-(正丙基)异构体 I溶于乙腈(0.5 L)。然后加入去离子水(1 L),该步骤产生沉淀。接着再加入乙腈(0.5L)而得到一种均匀溶液,将其在环境温度下搅拌30小时。HPLC分析表明形成了包括□20%总峰面积的新成分。

在旋转蒸发器上除去有机溶剂。向含水的残余物中加入碳酸钾(30 g),随后加入二氯甲烷(0.3 L)。振摇该混合物并取出下面的有机相。再进行两次提取(2 x 0.3 L)。将合并的有机相用硫酸钠干燥,然后过滤并将所得溶液浓缩至得到一种干燥的泡沫体(~10g)。

将所得N-(正丙基)异构体 I与N-(正丙基)异构体 II的混合物溶于二氯甲烷和19/3 (v/v)己烷-二乙胺的混合物并将其置于淤浆填充的硅胶柱上,然后用所述的19/3系统洗脱。在级分56中将洗脱剂转换成19/6己烷-二乙胺。合并级分9-17并浓缩至得到仅含有未反应原料的干燥泡沫体。合并级分52-72并浓缩且含有N-(正丙基)异构体 II(通过HPLC测定的纯度为79%)。

实施例 2

下表1表示pH、温度、酸的类型和N-(正丙基)异构体 I的浓度对

平衡反应速率和对平衡后主要杂质的水平的影响。重复实验(数据未给出)证明了结果的再现性。N-(正丙基)异构体 I 与 N-(正丙基)异构体 II 的平衡比例(分别为约 90%± 4%:约 10%±4%)与所有的实验一致。对数据的分析表明 pH 和温度对平衡所需的时间有显著影响。由于不受任何理论的限制,所以较低的平衡温度或较低的 pH 值一般主要使平衡时间较长。平衡时间还可能特别取决于原料的浓度以及所用酸的类型和浓度。在有一种或多种浓度约为 0.2 mmol - 约 1.0 mmol/mL 混合物的酸和足量盐酸存在的情况下将浓度达到约 300 mg/mL 组合物的 N-(正丙基)异构体 I 加热至约 40℃ - 约 80℃ 的温度下以使 pH 达到约 6.5 - 约 7.5、持续约 20 小时,从而产生纯度约为 95%-98%的异构体平衡混合物。将用于 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 平衡的平衡动力学参数和杂质水平作为 pH、平衡温度、酸的类型和 N-(正丙基)异构体 I 浓度的函数测定并列在表 1 中。可以将包括高压液相色谱法("HPLC")、核磁共振波谱法("NMR")、气相色谱法("GC")、质谱法("MS")、液相色谱法/质谱("LC/MS")、GC/MS 和薄层色谱法("TLC")在内的已知方法用于鉴定杂质。"DS"指的是平衡前的 N-(正丙基)异构体 I 且包括它用于比较。

如下制备并检测异构体的平衡混合物。在 1A-11A 的各次实验中制备 40mL 的溶液并在加热前将各溶液分成 1 mL 等分部分以便更易于在不同时间点处监测平衡。在 12B-24B 的各次实验中制备 20 mL 的溶液并在加热前将各溶液分成 0.7 mL 的等分部分。在 25C-28C 的各次实验中制备 100 mL 的溶液、在 29C-30C 的各次实验中制备 200 mL 的溶液并从该溶液中取出 0.5 mL 等分部分来监测平衡。在 31D-33D 和 35D-41D 的各次实验中制备 60 mL 的溶液、在实验 34D 中制备 170 mL 的溶液并从该溶液中取出 0.5 mL 等分部分来监测平衡。在 42E-46E 的各次实验中制备 7,200 mL - 54,000 mL 的溶液并通过从该溶液中取出 2 mL - 5 mL 等分部分来监测平衡。在 47F-50G 的各次实验中制备 35 mL - 50 mL 的溶液并在加热前将各溶液分成 1 mL 的等分部分。将水加入到适宜容器中,随后添加表 1 第 4 列中所列类型和用量的酸。在酸类型前面的术语

“qs”指的是足以获得第2栏中所列pH的酸的用量。如果使用0.1 M柠檬酸或酒石酸,那么还可以加入足以获得第2栏中所列pH用量的盐酸。如果酸的浓度为第4栏中所述(例如“0.1 M柠檬酸”),那么它是酸在含有浓度为100 mg/ml N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物的溶液中的浓度。将水与酸的混合物搅拌至所有的酸均溶解为止(对较小体积而言约5分钟或5分钟以下且对较大体积而言约为20分钟)。缓慢并分小部分加入 N-(正丙基)异构体 I 以避免集结并将所得混合物剧烈搅拌至溶解为止(对较小体积而言约30分钟以下且对较大体积而言约为60-120分钟)。在 N-(正丙基)异构体 I 溶解后,测定所得溶液的pH。如果该pH低于第2栏中所列的pH,那么用10%氢氧化钠使其升至第2栏中所列的pH。如果该pH高于第2栏中所列的pH,那么使用合适的酸使其降低。就每次实验而言,在第3栏中所述温度下将该溶液加热至获得如下述 HPLC 检测所测定的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物为止。在某些实验中,将混合物加热长于平衡所需的时间期限(第8栏中大于100%的百分比)以测定延长加热对于杂质程度的影响。

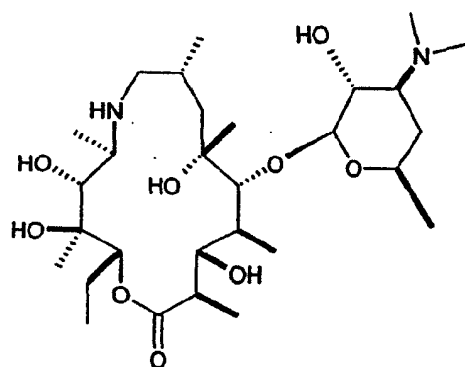
为了监测平衡,通过在平衡过程中的不同时间点的 HPLC 来检测反应混合物的等分部分。就表1中所示的大部分平衡实验而言,用40 mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)将等分部分稀释至浓度约为0.5 mg的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II/mL 总样品体积并使用 Asahipak ODP-50、5 m、250 x 4.0 mm 柱在安装有外部 Applied Biosystems 783A 可编程吸收度检测器的 HP 1090 液相色谱仪上进行色谱层析(40%乙腈/35%甲醇/25% 40 mM 磷酸钾; pH 8.5 流动相; 流速0.7毫升/分钟; 室温)。通过监测210nm处的紫外吸收来检测峰。就表1中所示的其余平衡实验而言(实验31D-46E),将等分部分用20%乙腈/50%甲醇/30% 50 mM 磷酸钾(pH 5.5)稀释至浓度为1.0 mg的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II/mL 总样品体积并使用 YMC Pro-Pack C₁₈、3 μ m、50 x 2.0 柱在安装有内部 UV 检测器的 HP 1090 液相色谱仪上进行色谱层析(20%乙腈/50%甲醇/30% 50 mM 磷酸钾; pH 7.0 流动相; 流速

0.5 毫升/分钟；室温)。通过监测 210nm 处的紫外吸收来检测峰。通过取 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的相比较的色谱图-峰面积之比来确定 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的相对量。在上述 HPLC 条件下, N-(正丙基)异构体 I 具有约 13-23 分钟的保留时间,而 N-(正丙基)异构体 II 具有约 0.8-0.9 的相对保留时间("RRT")。所谓"RRT"指的是在上述 HPLC 条件下相对于 N-(正丙基)异构体 I 的保留时间。

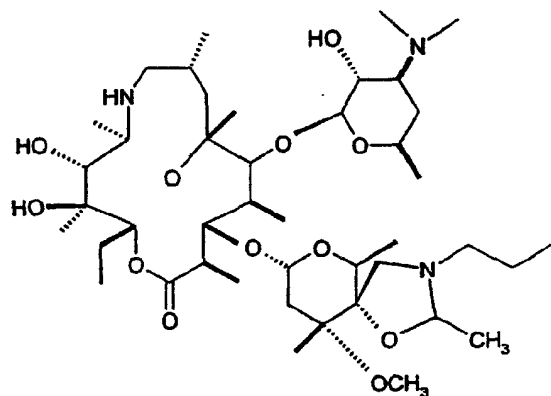
使用 HPLC、按照三方法之一来测定表 1 中平衡样品的纯度。在实验 1A-24B、48F 和 50G 中,将等分部分用 25 mM 磷酸钾缓冲液(pH 5.5)稀释至浓度为 1.25 mg 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II/mL 总样品体积并使用 Eclipse XDB-C8、5 μ m、250 x 4.6 mm 柱(22% 乙腈/58% 甲醇/20% 25 mM 磷酸钾; pH 8.0 流动相; 流速 0.6 mL/分钟; 室温)在带有 BAS CC-5/LC-4C Amperometric Detector 的 Waters Alliance 2690 分离组件上进行检测。使用一种+0.70 V 的电极、+0.88 V 的辅助电极和 0.5 μ A 左右的电流以电化学方式检测峰。在实验 25C-41 D 中,将等分部分用 50 mM 柠檬酸(pH 5.5)稀释至浓度为 0.25 mg 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 混合物/mL 总样品体积并使用 YMC Pro-Pack C₁₈、3 μ m、150 x 4.6 mm 柱(70% 甲醇/30% 50 mM 磷酸钾; pH 7.0 流动相; 流速 1 mL/分钟; 室温)在 Waters Alliance 系统上进行检测。仅使用一种+0.90 V 的电极以电化学方式检测峰。在实验 42E-43E 中,将等分部分用 50 mM 柠檬酸(pH 5.5)稀释至浓度为 0.25 mg 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 混合物/mL 总样品体积并使用 YMC Pro-Pack C₁₈、3 μ m、150 x 4.6 mm 柱(70% 甲醇/30% 50 mM 磷酸盐; pH 7.0 流动相; 流速 1 mL/分钟; 室温)在带有 BAS CC-5/LC-4C Amperometric Detector 的 HP 1090 液相色谱仪上进行检测。仅使用一种+0.90 V 的电极以电化学方式检测峰。使用色谱图中峰下的面积来确定 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II(第 9 列)的平衡混合物和杂质(第 10 列)与检测样品相比较的百分比。某些检测杂质为: 去克拉定糖 氮杂大环内酯类(其 RRT 在

Eclipse XDB-C₈ 柱上约为 0.26)、乙醛插入产物(其 RRT 在 Eclipse XDB-C₈ 柱上约为 1.75)和甲醛插入产物(其 RRT 在 Eclipse XDB-C₈ 柱上约为 1.6)。

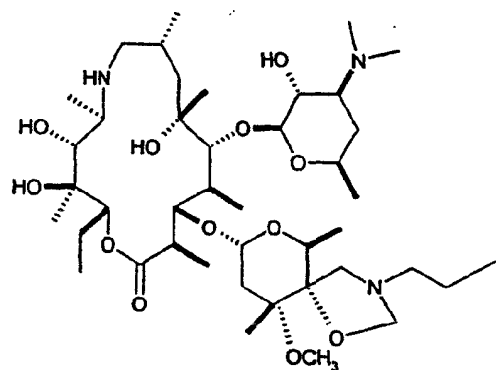
去克拉定糖氮杂大环内酯类具有下列结构：



乙醛插入产物具有下列结构：



甲醛插入产物具有下列结构：



去克拉定糖氮杂大环内酯类、乙醛插入产物和甲醛插入产物及其药物上可接受的盐具有抗生素特性且可用作抗生素药。

进行表 1 中的 A 组和 B 组实验(通过实验号后面的字母表示) 以便确定 pH、温度、酸的类型、酸的浓度和 N-(正丙基)异构体 I 浓度对平衡的影响。表 1 中的 C 组实验解释了 pH 和温度对平衡的影响。表 1 中的 D 组实验解释了 pH、温度和酸的浓度对平衡的影响。表 1 中的 E 组实验解释了一种平衡的优选方法、即在约 7.0 的 pH 下平衡温度约为 70℃且 N-(正丙基)异构体 I 浓度约为 250 mg/mL。F 组实验测试了可选的酸和平衡温度的作用以及在有 50%丙二醇共溶剂存在的情况下进行实验 G。

这些实验结果表明: 即使在不同条件下, N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 混合物的平衡始终如一地形成约 90%±4%的 N-(正丙基)异构体 I 和约 10%±4%的 N-(正丙基)异构体 II。平衡温度和 pH 看起来对平衡速率具有最大的影响, 其中较高的温度一般导致速率较快, 甚至使用较高浓度的 N-(正丙基)异构体 I 也是如此。然而, 在大部分情况中, 较长的平衡时间使得杂质的浓度较高且由此最佳平衡条件是那些产生相对高的平衡速率的条件, 即在 1-3 小时内形成 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物的条件。

表 1

实验 号和组	pH	平衡 温度 (°C)	酸	起始 N-(正 丙基)异构 体 I 的浓度 (mg/ml)	平衡时 N-(正丙基) 异构体 II 的 %	达到平衡 的时间 (小时)	达到平衡的 时间%	异构体 平衡混合物 的 %	杂质 %
DS								98.39	1.61
1A	6.3	65	适量柠檬酸	112	12.2	5.1	100	96.09	3.91
2A	6.0	80	适量磷酸	75	11.6	2	100	94.03	5.97
3A	7.0	70	适量柠檬酸	75	11.5	1.4	370	94.57	5.43
4A	7.0	50	适量柠檬酸	150	11.5	10.9	100	86.71	13.29
5A	6.0	60	适量磷酸	150	11.2	12.9	100	96.36	3.64
6A	6.0	60	适量柠檬酸	75	12.3	17.6	200	89.62	10.38
7A	6.0	80	适量柠檬酸	150	11.9	2.2	100	97.76	2.24
8A	7.0	50	适量磷酸	75	11.4	7.2	100	96.94	3.06
9A	7.0	70	适量磷酸	150	12.1	1.2	100	96.52	3.48
·0A	6.5	65	适量柠檬酸	112	11.3	3.3	170	95.18	4.82
							100	96.15	3.85
							170	94.95	5.05
							100	96.15	3.85
							160	95.20	4.80
							100	97.79	2.21
							150	96.47	3.53
							100	97.66	2.34
							160	96.70	3.30
							100	96.63	3.37
							190	94.64	5.36

实验 号和组	pH	平衡 温度 (°C)	酸	起始N-(正 丙基)异构 体 I 的浓度 (mg/ml)	平衡时 N-(正丙基) 异构体 II 的 %	达到平衡 的时间 (小时)	达到平衡的 时间%	异构体 平衡混合物 的 %	杂质%
11A	6.5	65	适量柠檬酸	112	12.4	3.6	100	96.87	3.13
							200	94.76	5.24
12B	7.0	70	适量柠檬酸	150	12.5	1.4	100	94.33	5.67
13B	7.25	65	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	225	11.2	3.3	100	94.00	6.00
14B	7.25	65	适量柠檬酸	225	11.2	2.5	100	94.26	5.45
							150	94.75	5.74
15B	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	300	11.0	3.6	100	94.17	5.25
16B	7.5	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	150	11.6	1.4	100	93.08	5.83
17B	7.0	60	适量柠檬酸	300	11.4	4.9	100	92.74	6.92
							150	94.98	7.26
18B	7.5	60	适量柠檬酸	150	12.1	2.6	100	94.82	5.02
19B	7.5	60	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	300	11.3	4.5	100	93.93	5.18
20B	7.5	70	适量柠檬酸	300	11.3	1.5	100	93.80	6.07
							150	93.89	6.20
21B	7.0	60	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	150	12.3	4.1	100	94.00	6.00
							150	93.89	6.11
							100	93.78	6.22
							150	93.88	6.12
							100	93.65	6.35
							150	94.31	5.69
							100	94.27	5.73

实验 号和组	pH	平衡 温度 (°C)	酸	起始N-(正 丙基)异构 体 I 的浓度 (mg/ml)	平衡时 N-(正丙基) 异构体 II 的 %	达到平衡 的时间 (小时)	达到平衡的 时间%	异构体 平衡混合物 的%	杂质%
22B	7.25	65	0.1M 柠檬酸 适量 HCl	225	11.7	3.0	100	94.51	5.49
23B	7.25	65	柠檬酸	225	12.3	2.3	100	94.23	5.77
24B	7.0	70	柠檬酸	300	11.4	2.2	100	94.10	5.90
25C	7.5	75	0.1M 柠檬酸 适量 HCl	250	11.8	1.3	100	98.59	1.41
26C	7.5	65	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.5	3.0	100	98.78	1.22
27C	6.5	75	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	n/a	4.0	85	98.74	1.26
28C	6.5	65	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	n/a	9.9	50	98.91	1.09
29C	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.1	1.8	100	98.90	1.10
30C	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.3	2.2	100	98.91	1.09
31D	7.0	70	0.125 M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.2	2.6	100		
32D	7.0	70	0.125 M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.1	2.8	100		

实验 号和组	pH	平衡 温度 (°C)	酸	起始N-(正 丙基)异构 体 I 的浓度 (mg/ml)	平衡时 N-(正丙基) 异构体 II 的 %	达到平衡 的时间 (小时)	达到平衡的 时间%	异构体 平衡混合物 的%	杂质%
33D	7.0	70	0.125M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.2	2.6	100		
34D	7.0	70	0.175M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.5	2.5	100		
35D	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.6	2.2	100		
36D	7.5	75	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.2	1.0	100		
37D	7.5	65	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.1	1.9	100		
38D	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.8	2.4	100		
39D	8.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.1	1.1	100		
40D	6.5	75	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.6	1.9	100		
41D	6.5	65	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	10.8	5.8	100		
42E	7.0	70	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	250	11.6	1.1	100	96.00	4.00
43E	7.5	70	0.1M 酒石酸/ 适量 HCl	250	12.0	2.0	100	94.90	5.10

实验 号和组	pH	平衡 温度 (°C)	酸	起始 N-(正 丙基)异构 体 I 的浓度 (mg/ml)	平衡时 N-(正丙基) 异构体 II 的 %	达到平衡 的时间 (小时)	达到平衡的 时间 %	异构体 平衡混合物 的 %	杂质 %
44E	7.0	70	0.1M 柠檬酸/	250	13.6	1.4	100	-	-
45E	6.8	70	适量 HCl 0.1M 柠檬酸/	250	12.7	1.1	100	-	-
46E	6.9	70	适量 HCl 0.1M 柠檬酸/	250	12.4	1.3	100	-	-
47F	7	70	适量 HCl 适量柠檬酸	250	10.8	1.4	100	94.78	5.22
48F	7	70	0.1M 酒石酸/	250	11.5	7.7	100	-	-
49F	7.4	39	适量 HCl 适量磷酸	1	11.1	6.7	100	-	-
50G	7	70	适量柠檬酸	75	9.4	2.7	100	-	-

实施例 3

包括在 50℃ 下储存 12 周并用共溶剂稳定的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 平衡混合物的组合物的稳定性如下表 2 中所示。结果表明不含共溶剂的组合物的稳定性显著低于含有约 250 - 约 500 mg/mL 组合物用量的共溶剂的组合物的稳定性(实验 1A-11B)。具有约 5.4 的 pH 并含有约 450 - 约 550 mg/mL 组合物用量的丙二醇的组合物最为稳定。可以将其它共溶剂用于使组合物保持稳定(实验 1E-2E); 不过, 优选丙二醇。正如表 2 中所示, 稳定性取决于 pH 且它还可以取决于所用酸的类型和用量以及异构体的平衡混合物的浓度。

如下制备这些组合物。在加热至所需温度(第 2 栏)并使水、酸和 N-(正丙基)异构体 I 的混合物达到平衡持续第 3 栏中所示的时间后, 使异构体的平衡混合物冷却至室温。当该混合物达到室温时, 加入适量的所需共溶剂(第 6 栏)。第 6 栏中所示共溶剂的百分比是重量/体积百分比(例如 50% PG 是 500 mg 丙二醇/mL 药物组合物)。如果使用抗氧化剂或防腐剂, 那么加入合适的量(第 8 和 9 栏)。测定该溶液的 pH 并通过添加一种或多种酸和/或 10% w/w 氢氧化钠将其调节至第 5 栏中的值。然后通过添加水来添加所得溶液的体积。将该组合物通过 0.2 微米的无菌过滤器过滤。给小瓶加装层流盖并将小瓶上部空间用合适的气体混合物(第 10 栏)冲洗, 此后密封。

使用如上所述的实施例 2 中的 HPLC 监测平衡和纯度。在 50℃ 下储存 12 周后测定密封在玻璃小瓶内的稳定的平衡组合物的稳定性。监测 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 平衡混合物浓度、pH、共溶剂用量和类型、酸的类型和浓度、与空气的接触、存在的防腐剂和存在的抗氧化剂的影响。结果如表 2 中所示。

进行实验 1A-3A 以便监测平衡混合物浓度对稳定性的影响。进行实验 2A、6A 和 7A 以便监测 pH 对稳定性的影响。进行实验 2A、4A 和 5A 以便监测共溶剂用量对稳定性的影响且实验 3A 和 8A 给出了为获得酸性 pH 而单独使用柠檬酸的作用与用柠檬酸和磷酸的混合物相反。实验 1B-11B 给出了 pH 和丙二醇("PG")共溶剂对稳定性的影响。实验 1C

和 2C 给出为获得酸性 pH 而单独使用酒石酸的作用与用酒石酸和磷酸的混合物相反。实验 9B-11B 和 3C 给出了防腐剂对所述混合物稳定性的影响且实验 9B-11B、4C 和 5C 给出了抗氧化剂对所述混合物稳定性的影响。实验 6C 和 7C 给出了使用酒石酸和盐酸混合物或柠檬酸和盐酸混合物对稳定性的影响。实验 1D-12D 给出了不同用量的一硫代甘油 (“MTG”) 抗氧化剂和不同程度的氧接触对稳定性的影响。实验 4D-6D 和 13D-18D 证明了所述组合物的 pH 和酸的浓度对稳定性的影响。

这些实验结果表明在 50℃ 下储存 12 周后, 含有至少 50% 丙二醇并具有约 5.2 - 约 5.5 的 pH 的平衡混合物保持了大于 93% 的 N-(正丙基) 异构体 I 和 N-(正丙基) 异构体 II 平衡混合物的起始浓度。发现在不含共溶剂的组合物中杂质的浓度最高 (实验 4A)。因此, 共溶剂的存在令人意外和出人意料地限制了杂质的量。12 周后在含有低于 40% 共溶剂且 pH 小于 5.0 的组合物中发现了高浓度的杂质。酸的浓度也影响了药物组合物的稳定性。具有相对低浓度酸 (约 20 mM) 且 pH 约为 5.4 的组合物在储存后表现出最大程度的稳定性。然而, 低酸浓度产生低的缓冲强度, 这一结果导致 pH 波动并可以在其它时间或温度条件下产生相对高程度的杂质。

表 2

实验 号 和 组	平衡 温度 (°C)	平衡 时间 (小 时)	药物组合物 中N-(正丙 基)异构体 I 和N-(正丙 基)异构体 II 的平衡混合 物的浓度 (mg/ml)	pH	共溶剂 类型和 用量	酸 浓度 (M)	防腐 剂	抗氧化 剂 (mg/ml)	上部空 间的填 充物	12周和50°C下 的 %		异构体的 平衡混合 物 %	杂质 %
										N-(正 丙基) 异构体 I	N-(正 丙基) 异构体 II		
1A	60	16	10	.0	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	12.33	0.48	92.81	7.10
2A	60	16	30	.0	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	12.09	7.89	89.87	10.03
3A	60	16	100	.0	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	11.95	8.13	88.08	11.92
4A	60	16	30	.0	25% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	12.78	6.44	79.22	20.78
5A	60	16	30	.0	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	13.07	5.60	88.57	11.43
6A	60	16	30	.5	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	10.71	6.71	87.42	12.58
7A	60	16	30	.5	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	11.81	0.34	92.15	7.85
8A	60	24	100	.0	50% PG	0.23 M 柠檬酸 98 H ₃ PO ₄	-	-	N ₂	11.80	4.27	86.07	13.93
1B	70	1.5	100	.0	25% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	10.90	9.50	90.40	9.60
2B	70	1.5	100	.0	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	9.10	3.28	92.30	7.70
3B	70	1.5	100	.0	25% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	10.70	1.40	92.10	7.90
4B	70	1.5	100	.5	50% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	9.50	3.80	93.30	6.70
5B	70	1.5	100	.25	20% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	10.80	9.70	90.80	9.40
6B	70	1.5	100	.25	55% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	9.30	4.40	93.70	6.30
7B	70	1.5	100	.75	37.5% PG	适量柠檬酸	-	-	N ₂	9.70	9.40	89.10	10.90

实验 号 和组	平衡 温度 (°C)	平衡 时间 (小 时)	药物组合物 中N-(正丙 基)异构体 I 和N-(正丙 基)异构体 II 的平衡混合 物的浓度 (mg/ml)	pH	共溶剂 类型和 用量	酸 浓度 (M)	防腐 剂	抗氧化 剂 (mg/ml)	上部空 间的填 充物	12周和50°C下 的%		异构体的 平衡混合 物%	杂质%
										N-(正 丙基) 异构体 I	N-(正 丙基) 异构体 II		
8B	70	1.5	100	.75	37.5% PG 适量柠檬酸	-	-	-	N ₂	9.90	2.70	92.60	7.40
9B	70	1.5	100	.25	37.5% PG 适量柠檬酸	-	-	-	N ₂	9.50	3.10	92.60	7.40
10B	70	1.5	100	.25	37.5% PG 适量柠檬酸	-	-	-	N ₂	9.90	1.70	91.60	8.40
11B	70	1.5	100	.25	37.5% PG 适量柠檬酸	-	-	-	N ₂	10.20	2.20	92.40	7.60

实验 号 和 组	平衡 温度 (°C)	平衡 时间 (小 时)	药物组合物 中 N-(正丙 基) 异构体 I 和 N-(正丙 基) 异构体 II 的平衡混合 物的浓度 (mg/ml)	pH	共溶剂 类型和 用量	酸 浓度 (M)	防腐 剂	抗氧化 剂 (mg/ml)	上部空 间的填 充物	12周和50°C下 的%		异构体的 平衡混合 物%	杂质%
										N-(正 丙基) 异构体 I	N-(正 丙基) 异构体 II		
1C	70	1.5	100	5.25	37.5% PG	适量酒石酸	-	-	N ₂	10.10	3.40	93.50	6.50
2C	70	1.5	100	5.25	37.5% PG	0.1M 酒石酸/ 适量 HCl	-	-	N ₂	10.00	4.30	94.30	5.70
3C	70	1.5	100	5.25	37.5% PG	适量柠檬酸	苯酚	-	N ₂	10.40	9.60	100.00	-
4C	70	1.5	100	5.25	37.5% PG	适量柠檬酸	-	5 MTG	N ₂	9.90	3.00	92.90	7.10
5C	70	1.5	100	5.25	37.5% PG	适量柠檬酸	-	5 MTG 丙酮	N ₂	9.90	3.00	92.90	7.10
6C	70	1.5	100	5.50	50% PG	0.1M 酒石酸/ 适量 HCl	-	-	N ₂	8.40	8.20	96.60	3.40
7C	70	1.5	100	5.50	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	-	N ₂	8.40	8.60	97.20	2.80
1D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	10 MTG	空气	9.02	7.40	96.42	3.58
2D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	10 MTG	5% O ₂	9.03	7.40	96.43	3.57
3D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	5 MTG	空气	9.07	7.17	96.24	3.76
5D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	5 MTG	10% O ₂	9.14	7.38	96.52	3.48
6D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.1M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	5 MTG	10% O ₂	9.14	7.44	96.58	3.42

实验 号和组	平衡 温度 (°C)	平衡 时间 (小 时)	药物组合物 中N-(正丙 基)异构体 I 和 N-(正丙 基)异构体 II 的平衡混合 物的浓度 (mg/mL)	pH	溶剂 类型和 用量	酸 浓度 (M)	防腐 剂	抗氧化 剂 (mg/mL)	上部空 间的填 充物	12周和50°C下 的 %	异构体的 平衡混合 物 %	杂质 %
18D	70	1.5	100	5.40	50% PG	0.025M 柠檬酸/ 适量 HCl	-	5	10% O ₂	9.07	96.93	3.07
1E			30	5.0	50% 甘油 甲磺酸	适量柠檬酸	-	MTG	空气		99.7	
2E			30	5.0	50% N- 甲基 2-	适量柠檬酸	-	-	空气		94.9	

实施例 4

如下制备 52 升含有 100 mg N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物/mL 组合物的可注射的药物组合物。将充有氮气 (NF 级) 的 16.584 kg 注射用水 (USP 级) 加入到不锈钢混合容器中并开始搅拌。将氮气用作制备过程中减少混合容器内溶液与氧接触的隔离物。将约 1 kg 无水柠檬酸 (USP 级) 加入到水中并将所得混合物搅拌至所述酸溶解为止。随后向该混合物中加入 1.511 kg 10% (w/w) 的盐酸 (NF 级) 水 (USP 级) 溶液。向搅拌的混合物中缓慢加入 5.357 kg 含有约 97% 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II (比例约为 99 : 1) 和 3% 的一种或多种杂质的混合物并使之溶解。通过添加 0.224 kg 的 10% (w/w) 盐酸水溶液将所得溶液的 pH 调节至 7.0 ± 0.5 。通过将该溶液加热至 $70^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 下 105 分钟来平衡 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II。一旦使用 HPLC 测定的平衡完全, 则使该溶液冷却至 $25^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ 并将 26.008 kg 的丙二醇 (USP 级) 加入到该搅拌的混合物中。在将丙二醇完全混入后, 向该溶液中加入 0.26 kg 的一硫代甘油 (NF 级) 并通过添加 2.349 kg 的 10% (w/w) 盐酸水溶液将 pH 重新调节至 5.4 ± 0.3 。通过添加 1.843 kg 水将终体积调节至 52.015 升。所得组合物中含有 100 mg 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物/mL 组合物、500 mg/mL 的丙二醇、浓度为 0.1 M 的柠檬酸和浓度为 5 mg/mL 组合物的一硫代甘油。

将该组合物通过 6 微米的前过滤器过滤且然后通过经湿热高压灭菌 60 分钟灭菌的 0.2 微米最终无菌过滤器过滤并在灭菌前和过滤后使用压力保持法测试完整性。对 20 mL I 型血清燧石玻璃小瓶 (Wheaton Science Products, Millville, New Jersey) 灭菌并在 250°C 下的干热管道中 240 分钟除去致热原。通过洗涤除去 20 mm 4432/50 灰氯丁基硅钢塞 (The West Company, Lionville, PA) 的致热原并通过在 121°C 下湿热高压灭菌 60 分钟来灭菌。在无菌条件下给 2,525 支小瓶中的每一支充入 20 mL 所得组合物 + 0.6 mL 溢出物 (20.6 mL/小瓶为 2.06 g/小瓶 100 mg/mL 的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的

平衡混合物的药物组合物的单位功效，以实际药物物质批量功效为97.1%为基准)，将小瓶上部空间用氮气冲洗并用塞子和完全密封物密封小瓶(20 mm 铝密封，产品#；5120-1125, The West Company, Lionville, PA)。

实施例 5

将约 0.125 mL - 约 0.5 mL 的药物组合物给予感染了多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*) 的猪以便测定其治疗功效，所述的药物组合物具有 5.4 pH 且该药物组合物中含有：以 100 mg/mL 药物组合物的用量存在的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物，其中 100 mg/mL 是“实际功效”数；以 0.1 mmol/mL 药物组合物的用量存在的柠檬酸；以 19.58 mg 浓酸(按重量效率计 36-38%)/mL 药物组合物的用量存在的盐酸；以 0.09 mg 的 1.0 M 氢氧化钠溶液/mL 药物组合物的用量存在的氢氧化钠；以 0.09 mg 的 10 M 氢氧化钠溶液/mL 药物组合物的用量存在的氢氧化钠；以 501.25 mg/mL 药物组合物的用量存在的丙二醇；和以 418.20 mg/mL 药物组合物的用量存在的水。本文所用的所谓实际功效数 (Apotency-actual) 指的是存在于所述药物组合物中的实际 mg/mL N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的基本上纯的混合物或平衡混合物。

从一组 60 头动物中选择 50 头体重恒定在约 10 kg 的临床正常和健康的猪。将选择的动物(10 头/治疗)随机指定治疗并由此分入笼中。在第 0 天时，经气管内给每头动物接种 25 mL 的多杀巴斯德氏菌攻击培养物。在接种后约 1 小时经肌内给每批动物注射单剂量的下列溶液之一：(1) 约 1.5 mL 的无菌 0.9% 氯化钠(盐水)；(2) 约 0.5 mL 剂量为 1.25 mg/kg 体重的 25 mg/mL 达氟沙星(danofloxacin)；(3) 约 0.125 mL 剂量为 1.25 mg/kg 体重的所述药物组合物；(4) 约 0.25 mL 剂量为 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物；或(5) 约 0.5 mL 剂量为 5 mg/kg 体重的所述药物组合物。仅在接下来的 2 天的每 1 天时重新给

予达氟沙星。以单剂量注射方式给予所有的其它治疗。在攻击后 6 小时记录体温和疾病得分且在攻击后 24 小时开始每天记录一次。对发生严重肺炎(即疾病得分为 4)的动物实施安乐死并列为死亡。对在本实验过程中死亡的动物实施尸体剖检。取出它们的肺并主要检查肺炎损害。测定并记录受侵害的肺组织百分比的估计值。在攻击后的第 5 天时,如上所述对所有存活的动物实施安乐死并做尸体剖检。基于平均每日疾病得分、体温和肺损害得分的比较来确定对功效的评价。通过对变量的反复测定值分析来评价就平均每日直肠温度与疾病得分而言的治疗之间的差异。使用变量程序的因数分析来评价就每次治疗而言平均肺损害得分之间的差异。使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来对治疗之间的死亡率进行比较。

在本研究中疾病的攻击是相当严重的。攻击后 6 小时,猪抑郁、发青紫并表现出呼吸困难的症候。在所有治疗组中直肠温度均升高。就本研究而言的总体死亡率为 18% (9/50 头猪)。对平均每日直肠温度的计算值没有在治疗组内的这些值中显示出显著性差异。尽管在攻击后 6 小时所有组中的体温均升高,但是所有治疗组的平均每日体温均保持在正常范围内。用 5 mg/kg 体重或 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物或达氟沙星治疗的动物在平均每日疾病得分减少(约为 2)方面与注射了盐水的动物的平均每日疾病得分(约为 3)相比表现出统计学显著性($p < 0.05$)减少。当将用三种剂量的达氟沙星治疗的动物与用单剂量的 5 mg/kg 体重或 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的动物进行比较时,没有观察到显著性差异。对用所述药物组合物进行三种治疗的比较显示用 5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的猪与用 1.25 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的猪相比显示出具有统计学显著性的临床疾病得分降低($p < 0.05$)。在用 5mg/kg 体重的所述药物组合物或 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的猪之间没有观察到在疾病得分方面的显著性差异。

将不同治疗对死亡率和肺损害得分的作用概括在下面的表 3 中。在治疗的动物中死亡率在 0% - 40%的范围。攻击后 48 - 72 小时之间在

盐水对照组中有 40% (4/10) 的动物死于肺炎。在用 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的组中有 1 头动物死亡而在用 1.25 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的组中有 4 头动物死亡 (40%)。在用达氟沙星或 5mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的组中没有发生动物死亡的情况。

盐水对照组的猪的平均肺损害得分为 44%。用达氟沙星或 2.5 mg/kg 体重或 5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的猪与盐水对照组相比在平均肺损害得分减少方面表现出统计学显著性 ($p < 0.05$)。当比较治疗的动物时, 用达氟沙星或 2.5 mg/kg 体重或 5 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的猪与用 1.25 mg/kg 体重的所述药物组合物治疗的动物相比在平均肺损害得分减少方面表现出统计学显著性 ($p < 0.05$)。

表 3

治疗 (肌内注射)	死亡率	平均肺损害得分 (%)
盐水 (1.5ml)	4/10 (40%)	44.0
达氟沙星 (1.25mg/kg)	0/10 (0%)	1.9
药物组合物 (5mg/kg)	0/10 (0%)	3.8
药物组合物 (2.5mg/kg)	1/10 (10%)	6.6
药物组合物 (1.25mg/kg)	4/10 (40%)	29.2

实施例 6

将约 0.125 mL - 约 0.5 mL 的药物组合物给予天然发生细菌性牛呼吸疾病的小牛, 该药物组合物具有 4.9 pH 并含有 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的混合物, 其中 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的混合物以 200 mg/mL 药物组合物的用量存在, 其中 200 mg/mL 是“实际功效”数, N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构

体 II 的比例约为 95% - 约 99% 的 N-(正丙基)异构体 I 和约 1% - 约 5% 的 N-(正丙基)异构体 II; 柠檬酸以 85.09mg/mL 药物组合物的用量存在; 丙二醇以 253.40 mg/mL 药物组合物的用量存在; 且水以 541.46 mg/mL 药物组合物的用量存在。

商购 213 头小牛(平均体重为 200 kg)并使它们在集装时群居约 2-3 天且用运输卡车将经转运约 1,000 英里转运至动物实验室。在商购过程中或研究前装卸的任意时间均没有给予抗菌治疗。在达到时,将动物卸下装入接受围栏中、给耳部贴标签并提供水和饲料的入口。给动物接种含有修饰的活病毒 IBR、PI、BVD 和 BRSV 的 BOVISHIELD 4+L5 疫苗和含有 5 个抗钩端螺旋体属(*Leptospira*)的血清型(*servovars*)的菌苗(Pfizer Animal Health)。此外,将它们用抗寄生虫药 DECTOMAX (Pfizer Animal Health)治疗并植入生长促进剂(promotant)(SYNOVEX-C, Syntex Laboratories)。从达到后的当天开始每日对所有动物观察符合牛呼吸疾病的临床症候。选择(拉出)表现出急性呼吸疾病临床症候的各个动物并记录其直肠温度。

本研究中包含的选择标准是符合急性呼吸疾病的临床描述(即疾病得分大于或等于 1 且小于 4)和发热(直肠温度大于或等于 104.0 F°)。一旦进行了选择,则使用随机化分配方式将动物随机分入 5 个治疗组之一。所有的治疗在每个测试围栏中均代表相同(2 头动物/治疗/围栏)。在满足选择标准的当天给每批动物经皮下注射单剂量的下列溶液之一:(1)约 6.6 mL 的无菌 0.9% 氯化钠(盐水);(2)约 6.6 mL 剂量为 10 mg/kg 体重的 MICOTIL 300;(3)约 1.25 mL 剂量为 1.25 mg/kg 体重的所述药物组合物;(4)约 2.5 mL 剂量为 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物;或(5)约 5 mL 剂量为 5 mg/kg 体重的所述药物组合物。将所有溶液以单剂量皮下注射的方式进行给药。在治疗后的观察期过程中,不给予其它药物。在治疗后对所有动物每日记录体温和疾病得分、持续 14 天。从治疗后 48 小时开始将疾病得分显示大于或等于 1 且体温为 104.0 °F 的动物确定为数据分析时再发病(re-pull)的病例。对发生严重肺炎(即疾病得分为 4)的动物实施安乐死并列为死亡。对

在本实验过程中死亡的动物称重并实施尸体剖检。取出它们的肺并主要检查肺炎损害。测定并记录受侵害的肺组织百分比的估计值。如果可能,从所有动物体内收集来自典型患病区域的肺样品用于细菌培养。在第 14 天时,对所有存活的动物实施安乐死。对动物进行尸体剖检并如上所述主要对它们的肺损害进行评价。收集来自所有动物的肺样品用于细菌培养。通过估计各肺重量的增加来评价动物的情况。在第 7 天和第 14 天对每头动物称重。

基于对平均每日疾病得分、体温和肺损害得分的分析来确定对功效的评价。将第 14 天时的各次治疗中的成功反应者的比例定为最初动物的数量/治疗与死亡和再发病者数量之差。使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来评价各组内第 14 天时显示疾病得分为 0(正常)或大于或等于 1 的动物比例的治疗组之间的比较。使用重复测定 ANOVA 来评价治疗组之间体温和体重增加的差异。还使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来比较治疗组之间的死亡率和反应者比例。

在这种天然疾病研究中呼吸疾病的爆发是极其严重的。盐水对照组的死亡率为 75%。盐水对照组的平均肺损害得分为 38.4%。疾病临床症状发作的时间过程以通常在有该年龄和背景环境的小牛的贸易饲养场观察到的为典型。对平均每日直肠温度的计算显示在所有治疗组中与盐水对照组相比时的平均每日直肠温度降低具有统计学显著性($p < 0.01$)。在本研究的第 7 天中治疗组中的体温保持低于盐水对照组的体温。用 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物表现出显著低于用 MICOTIL 治疗的动物的平均每日直肠温度($p < 0.01$)。用 1.25 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的体温反应与 MICOTIL 对照组类似。用任意剂量水平的 MICOTIL 或所述药物组合物对动物进行治疗使得平均每日疾病得分比盐水对照组显著($p < 0.01$)降低。当比较这些治疗时,用 2.5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的小牛在平均每日疾病得分方面表现出比 MICOTIL-治疗的小牛显著($p < 0.05$)减少。用 1.25 mg/kg 或 5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的小牛在平均每日疾病得分方面表现出与用 MICOTIL 治疗的小牛类似。

将发病率、死亡率和肺损害得分数据概括在下面的表 4 中。盐水对照组中的 75% 满足本研究中的再发病标准。给予 MICOTIL 或 1.25 mg/kg 的所述药物组合物使得发病的发生率(分别为 55%和 40%)比盐水对照组减少。相反, 用 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的再发病率显著($p < 0.01$)低于盐水对照组的再发病率。用 2.5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的发病率显著低于用 MICOTIL 观察到的结果。用 1.25 mg/kg 或 5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的再发病率比 MICOTIL 减少。在本研究过程中盐水对照组中 20 头小牛中的 15 头(75%)小牛死于肺炎。给予 MICOTIL 使得死亡的数量(25%)比盐水对照组显著($p < 0.01$)减少。全部三组用所述药物组合物治疗的动物也观察到了死亡率比盐水对照组显著($p < 0.01$)降低。用给予 5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物比 MICOTIL-治疗的小牛的比较死亡率显著($p < 0.05$)降低。两种较低剂量的药物组合物使得死亡率比 MICOTIL 降低。盐水治疗的小牛的平均肺损害得分为 38.4%。用 MICOTIL 或任意剂量水平的所述药物组合物治疗的动物在平均肺损害得分方面表现出比盐水对照组显著($p < 0.01$)降低。给予 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 药物组合物使得平均肺损害得分比 MICOTIL 降低。用 1.25 mg/kg 的所述药物组合物治疗的动物的肺损害得分与用 MICOTIL 治疗的肺损害得分类似。

表 4

治疗(皮下注射)	再发病率	死亡率	肺损害得分
盐水(6.6mL)	15/20 (75%)	15/20 (75%)	38.4%
MICOTIL (10mg/kg)	11/20 (55%)	5/20 (25%)	18.0%
药物组合物 (1.25mg/kg)	8/20 (40%)	1/20 (5%)	14.0%
药物组合物	2/20 (10%)	1/20 (5%)	8.6%

(2.5mg/kg)

药物组合物	6/20 (30%)	0/20 (0%)	8.9%
-------	------------	-----------	------

(5mg/kg)

通过从最初动物数量/治疗中扣除死亡和再发病的数量来计算每次治疗的反应者比例。将反应者比例概括在表 5 中。用 MICOTIL 治疗的动物的 25% 满足反应者标准。用 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的反应者比例比 MICOTIL 治疗的动物显著 (分别为 $p < 0.01$ 和 $p < 0.05$) 改善。用 1.25 mg/kg 所述药物组合物治疗的动物的反应者比例高于对 MICOTIL-治疗的动物的所观察到的反应者比例。将临床上健康的小牛定为在第 14 天时疾病得分为 0 的那些小牛 (表 5)。在本研究中, 在第 14 天时盐水对照组中仅有 1 头小牛在临床上健康的。给予 MICOTIL 治疗使得第 14 天时健康动物的数量增加。在用所述药物组合物的各次治疗中第 14 天特征为健康的动物的比例显著 ($p < 0.05$) 高于盐水对照组中的健康动物的比例。类似地, 在全部所述药物组合物治疗组中临床上健康的动物的比例高于 MICOTIL 组中临床上健康动物的比例。

表 5

治疗	反应者比例	临床上健康动物的比例
盐水 (6.6mL)	3/20 (15%)	1/20 (5%)
MICOTIL (10mg/kg)	5/20 (25%)	4/20 (20%)
药物组合物 (1.25mg/kg)	12/20 (60)	9/20 (45%)
药物组合物 (2.5mg/kg)	17/20 (85%)	8/20 (40%)
药物组合物 (5mg/kg)	14/20 (70%)	8/20 (40%)

下面的表 6 概括了治疗对 7 天和 14 天重量增加的作用。用 MICOTIL 或用所述药物组合物治疗的动物在第 7 天和第 14 天时表现出每日平均重量增加比盐水对照组显著 ($p < 0.01$) 提高。用 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg

的所述药物组合物治疗的动物比用 MICOTIL 治疗的动物表现出改善的重量增加。用 1.25 mg/kg 的所述药物组合物治疗动物的重量增加表现出与用 MICOTIL 治疗的动物的重量增加类似。

表 6

治疗	7 天内的每日平均重量增	14 天内的每日平均重量
	加 (kg/天)	增加 (kg/天)
盐水 (6.6mL)	-1.18	0.36
MICOTIL (10mg/kg)	0.60	0.78
药物组合物 (1.25mg/kg)	0.71	0.77
药物组合物 (2.5mg/kg)	1.00	1.20
药物组合物 (5mg/kg)	1.20	1.35

实施例 7

将约 1.25 mL - 约 5 mL 的药物组合物给予处于高危的发生细菌性牛呼吸疾病的小牛，其中所述的药物组合物具有 6.0 pH 且在该药物组合物中含有：以 200 mg/mL 药物组合物的用量存在的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 混合物，其中 200 mg/mL 是“实际功效”数，N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的比例约为 95% - 约 99% 的 N-(正丙基)异构体 I 和约 1% - 约 5% 的 N-(正丙基)异构体 II；以 60.00mg/mL 药物组合物的用量存在的柠檬酸；以 251.01 mg/mL 药物组合物的用量存在的丙二醇；和以 569.00 mg/mL 药物组合物的用量存在的水。

商购 222 头小牛(平均体重为 200 kg)、使它们在集装时群居约 2 天且用运输卡车将经转运约 1,000 英里转运至动物实验室。在商购过程中或研究前装卸的任意时间均没有给予抗菌治疗。在达到时，将动物卸下装入接受围栏中、给耳部贴标签并提供水和饲料的入口。给动物接种含有修饰的活病毒 IBR、PI、BVD 和 BRSV 的 BOVISHIELD 4+L5 疫苗和含有 5 个抗钩端螺旋体属(*Leptospira*)的血清型 (servovars)

的菌苗(Pfizer Animal Health)。此外,将它们用抗寄生虫药 DECTOMAX (Pfizer Animal Health)治疗。从达到后的当天(第0天)评价各动物的临床情况并记录疾病得分。在分组的当天(第0天)在没有疾病临床症候的情况下表现出包括抑郁或缺乏瘤胃充满在内的疲劳症候的动物不具有疾病得分大于或等于1的资格。选择表现出疾病得分大于或等于1且体温为104.0°F的动物包括在本研究中。一旦进行了选择,则使用系统性随机化分配方式将动物随机分入5个治疗组之一(20头小牛/组)。将第一批选择的10头动物指定为第一围栏。将随后的动物划分入10头动物组的围栏至所有围栏栏满为止。各围栏中包含来自治疗组的1头或多头动物。在第0天治疗前记录各动物的体重、体温和疾病得分。在达到后的前30小时内对各批动物经皮下注射单剂量的下列溶液之一:(1)约6.6 mL的无菌0.9%氯化钠(盐水);(2)约6.6 mL的MICOTIL;(3)约1.25 mL剂量为1.25 mg/kg体重的所述药物组合物;(4)约2.5 mL剂量为2.5 mg/kg体重的所述药物组合物;或(5)约5 mL剂量为5 mg/kg体重的所述药物组合物。将所有溶液以单剂量注射的方式给药。在注射后24小时和48小时进行急性注射部位耐受性观察。每日对所有动物记录体温和疾病得分。在数据分析时将表现出疾病得分显示大于或等于1且体温大于或等于104.0°F的动物确定为病态(拉出)。对发生严重肺炎(即疾病得分为4)的动物实施安乐死并列为死亡。对在本实验过程中死亡的动物称重并实施尸体剖检。取出它们的肺并主要检查肺炎损害。测定并记录受侵害的肺组织百分比的估计值。如果可能,从所有动物体内收集来自典型患病区域的肺样品用于细菌培养。在第14天时,对所有存活的动物实施安乐死并实施尸体剖检且如上所述主要对它们的肺损害进行评价并收集用于细菌培养。通过估计各个体重量增加来评价动物的情况。在第7天和第14天对每头动物称重。

基于对平均每日疾病得分、体温和肺损害得分的分析来确定对功效的评价。将第14天时的各次治疗中的成功反应者的比例定为最初动物的数量/治疗与死亡和再发病者数量之差。使用 χ^2 分析和Fisher精

确检验来评价各组内第 14 天时显示疾病得分为 0(正常)或大于或等于 1 的动物比例的治疗组之间的比较。使用重复测定 ANOVA 来评价治疗组之间体温和重量增加的差异。还使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来比较治疗组之间的死亡率、发病率和反应者比例。

在这种天然疾病研究中呼吸疾病的爆发是中度严重的。盐水对照组的发病率为 60%且这些动物中的 25%死于急性肺炎。盐水对照组的平均肺损害得分为 24.3%。疾病临床症状发作的时间过程以通常在有该年龄和背景环境的小牛的贸易饲养场观察到的为典型。在所有治疗组中与盐水对照组相比时平均每日直肠温度降低具有统计学显著性($p < 0.01$)。在整个 10 天的研究过程中治疗组中的体温保持低于盐水对照组中的体温。用任意三种剂量的所述药物组合物治疗的动物与用 MICOTIL 治疗的动物的平均每日直肠温度相比表现出具有统计学显著性的降低($p < 0.01$)。用 2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的动物的差异的等级最大。用 MICOTIL 或所述药物组合物对小牛进行后防御性治疗使得平均每日疾病得分比盐水对照组显著($p < 0.01$)降低。当比较抗生素治疗时,用 5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的小牛在平均每日疾病得分方面与 MICOTIL 治疗的动物相比表现出具有统计学显著性的($p < 0.05$)降低。用 1.25 mg/kg 或 2.5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的动物在疾病得分反应方面表现出与用 MICOTIL 治疗的小牛的疾病得分反应类似。

将发病率、死亡率和肺损害得分数据概括在下面的表 7 中。在这种中等严重的天然感染性研究中,盐水对照组表现出 60%的发病率。所有的抗生素治疗在发病率方面比盐水对照组显著($p < 0.05$)降低。用所述药物组合物治疗的动物在发病率方面表现出比 MICOTIL 对照组大量减少;然而,没有统计学显著性的差异。在本研究过程中盐水对照组中 20 头小牛中的 6 头(30%)小牛死于支气管肺炎。给予 MICOTIL 使得死亡的数量比盐水对照组减少。对全部三组用所述药物组合物治疗的动物也观察到了死亡率比盐水对照组显著($p < 0.05$)降低。盐水对照组小牛的肺损害得分为 24.3%。用 MICOTIL 或所述药物组合

物治疗的动物在平均肺损害得分方面表现出比盐水对照组显著 ($p < 0.01$) 降低。用 5 mg/kg 药物组合物治疗的小牛在平均肺损害得分方面比用 MICOTIL 治疗的动物的平均肺损害得分显著 ($p < 0.05$) 降低。用 1.25 mg/kg 或 2.5 mg/kg 的所述药物组合物治疗的动物在平均肺损害得分方面表现出比用 MICOTIL 治疗的小牛的平均肺损害得分降低。

表 7

治疗 (皮下注射)	发病率	死亡率	肺损害得分
盐水 (6.6mL)	12/20 (60%)	6/20 (30%)	24.3%
MICOTIL (10mg/kg)	5/20 (25%)	1/20 (5%)	10.4%
药物组合物 (1.25mg/kg)	1/20 (5%)	0/20 (0%)	3.4%
药物组合物 (2.5mg/kg)	3/20 (15%)	0/20 (0%)	5.3%
药物组合物 (5mg/kg)	2/20 (10%)	0/20 (0%)	2.0%

通过从最初动物数量/治疗中扣除死亡和发病的数量来计算每次治疗的反应者比例。将反应者比例概括在表 8 中。对各种治疗观察到的相对反应者比例的差异与上述对发病率所述的差异类似。将临床上健康的小牛定为在第 14 天时疾病得分为 0 的那些小牛。在本研究中, 在第 14 天时盐水对照组中仅有 1 头小牛在临床上健康的。在第 14 天时观察到的临床上健康的用 MICOTIL 或所述药物组合物治疗的动物的比例显著 ($p < 0.01$) 高于盐水对照组。类似地, 发现用任意所述剂量的药物组合物治疗的动物比用 MICOTIL 治疗的动物在临床上更为健康的比例更高。不过, 这些差异没有统计学显著性 ($p > 0.05$)。

表 8

治疗	反应者比例	临床上健康动物的比例
盐水 (6.6mL)	8/20 (40%)	1/20 (5%)
MICOTIL (10mg/kg)	15/20 (75%)	10/20 (50%)
药物组合物 (1.25mg/kg)	19/20 (95%)	14/20 (70%)
药物组合物 (2.5mg/kg)	17/20 (85%)	13/20 (65%)
药物组合物 (5mg/kg)	18/20 (90%)	14/20 (70%)

表 9 概括了后防御性治疗对 7 天和 14 天重量增加的作用。用 MICOTIL 或用所述药物组合物治疗的动物在第 7 天和第 14 天时的每日平均重量增加比盐水对照组显著 ($p < 0.05$) 提高。不同抗生素治疗的重量增加反应类似。

表 9

治疗	7 天内的每日平均重量增	14 天内的每日平均重量
	加 (kg/天)	增加 (kg/天)
盐水 (6.6mL)	0.21	0.46
MICOTIL (10mg/kg)	1.15	0.94
药物组合物 (1.25mg/kg)	1.09	1.20
药物组合物 (2.5mg/kg)	0.96	1.00
药物组合物 (5mg/kg)	1.55	1.25

在 24 小时和 48 小时检查急性注射部位并使用下列等级进行评价：0-没有观察到受影响的区域(隆起/炎症)；1=直径小于 6 英寸的小的受影响区域(隆起/炎症)；2=直径为 6-8 英寸的中等受影响区域(隆起/炎症)；3=直径大于 8 英寸的大的受影响区域(隆起/炎症)；4=直径大于 8 英寸的极大的受影响区域(隆起/炎症)和/或扩散入动物胸部或导致跛行。对等级的划分取决于急性受影响区域的大小和程度。将 24 和 48 小时评价概括在表 10 中。在本研究中，评价注射后 24 小时时各治疗得分大于或等于 2 的动物的比例差异的统计学显著性。在治疗组

之间没有统计学显著性差异。然而，用 MICOTIL 治疗的动物的异常注射部位的数量高于用所述药物组合物治疗的动物的异常注射部位的数量。

表 10

治疗	24 小时评价					48 小时评价				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
盐水 (6.6mL)	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%
MICOTIL (10mg/kg)	80%	15%	5%	0%	0%	95%	5%	0%	0%	0%
药物组合物 (1.25mg/kg)	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%
药物组合物 (2.5mg/kg)	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%
药物组合物 (5mg/kg)	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%

实施例 8

将约 0.5 mL - 约 2mL 的药物组合物给予处于高危的发生大叶性肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 感染的猪，其中所述的药物组合物具有 6.1 pH 且在该药物组合物中含有：以 50 mg/mL 药物组合物的用量存在的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 混合物，其中 50 mg/mL 是“实际功效”数，N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的比例约为 95% - 约 99% 的 N-(正丙基)异构体 I 和约 1% - 约 5% 的 N-(正丙基)异构体 II；以 15.00mg/mL 药物组合物的用量存在的柠檬酸；以 250.13mg/mL 药物组合物的用量存在的丙二醇；和以 734.43 mg/mL 药物组合物的用量存在的水。

商购 130 头具有平均体重约为 10 kg 的临床健康的猪、使用耳部标签鉴别并在研究开始前 2 天使它们适应本研究的部位。在第-1 天

时，给所有动物称重并选择 100 头体重一致（约 10kg）且缺乏临床异常症候的动物。将选择的动物（20 头/治疗组）随机划分入治疗组并分入各个围栏。再将一组 25 头的动物随机划分为种猪（5 头/治疗组）。在第 0 天时，给动物经肌肉注射单剂量的下列溶液之一：(1) 约 1.5 mL 的无菌 0.9% 氯化钠（盐水）；(2) 约 0.5 mL 剂量为 1.25mg/kg 体重的达氟沙星；(3) 约 0.5 mL 剂量为 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物；(4) 约 1 mL 剂量为 5 mg/kg 体重的所述药物组合物；或(5) 约 2 mL 剂量为 10 mg/kg 体重的所述药物组合物。仅在接下来的 2 天中的每 1 天再给予达氟沙星。将所有其它治疗组以单剂量注射的方式给药。在第 0 天的同时给 25 头种猪用 3mL/鼻孔的大叶性肺炎放线杆菌攻击培养物进行攻击。将 5 头感染的种猪并入到 20 头实验动物的每一围栏中。将测试动物与种猪合并。从围栏中除去在本研究中过程中死亡的种猪。在攻击后 48 小时时，从治疗的围栏中取出存活的种猪并实施安乐死。每日记录体温和疾病得分。对在本实验过程中死亡的动物实施尸体剖检。取出它们的肺并主要检查肺炎损害。测定并记录受侵害的肺组织百分比的估计值。将肺损害得分大于或等于 5% 的动物看作发病。在第 7 天时，对所有存活的动物实施安乐死。对动物实施尸体剖检并主要检查肺损害情况。

基于对平均每日疾病得分、体温和肺损害得分的分析来确定对功效的评价。通过变量的反复测定分析来评价治疗组之间平均每日直肠温度和疾病得分的差异。使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来评价第 7 天时各组内表现出疾病得分为 0（正常）或大于或等于 1 的动物比例的治疗组之间的比较。使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来比较治疗组之间的发病率（大于或等于 5% 的肺损害得分）和死亡率。

80% 的种猪在攻击的 24 小时内死于肺炎，这一结果表明测试动物与细菌病原体有足够的接触。与所述药物组合物和达氟沙星治疗的组相比，盐水治疗的猪的体温在接触后第 1 天时开始升高并在整个研究期限过程中保持显著升高。用 5 mg/kg 和 10 mg/kg 所述药物组合物治疗的组的平均每日直肠温度显著 ($p < 0.05$) 低于达氟沙星治疗的猪。

用 2.5 mg/kg 所述药物组合物治疗的猪与用达氟沙星治疗的猪相比发生最初的体温降低。然而，这两个治疗组之间在平均每日直肠温度方面没有统计学显著性的差异 ($p > 0.05$)。当与达氟沙星和所述的药物组合物治疗的动物相比时，在盐水治疗的猪中的平均每日疾病得分方面存在统计学显著性 ($p < 0.05$) 升高。然而，在达氟沙星和药物组合物治疗的猪之间在平均每日疾病得分方面没有差异。对第 7 天表现出疾病得分为 0 (正常) 或大于或等于 1 的各组内的动物比例的治疗组之间进行的比较证实在任意的治疗组中没有差异。

将概括发病率和死亡率的数据列在表 11 中。发病率的标准根据具有平均肺损害得分大于或等于 5% 的猪来确定。在本研究中观察到盐水对照组比达氟沙星和药物组合物治疗的猪在发病率方面具有统计学显著性 ($p < 0.05$) 的增加。然而，在达氟沙星和药物组合物治疗的猪之间的发病率没有差异。

表 11

治疗	发病的猪的比例
盐水 (1.5 mL)	13/20 (65%)
达氟沙星 (1.25 mg/kg)	6/20 (30%)
药物组合物 (2.5 mg/kg)	6/20 (30%)
药物组合物 (5 mg/kg)	1/20 (5%)
药物组合物 (10 mg/kg)	5/20 (25%)

将不同治疗对死亡率和肺损害得分的作用概括在下面的表 12 中。盐水对照组猪的平均肺损害得分为 22.2%。当与盐水对照组相比时，用达氟沙星和所述药物组合物治疗的猪在平均肺损害得分方面表现出统计学显著性 ($p < 0.05$) 的降低。然而，在达氟沙星和药物组合物治疗的猪之间的平均肺损害得分方面没有统计学显著性 ($p < 0.05$) 差异。

表 12

治疗	死亡率	平均肺损害得分
盐水 (1.5mL)	2/20 (10%)	22.2%
达氟沙星 (1.25mg/kg)	0/20 (0%)	4.8%
药物组合物 (2.5mg/kg)	0/20 (0%)	4.6%
药物组合物 (5mg/kg)	0/20 (0%)	0.6%
药物组合物 (10mg/kg)	0/20 (0%)	3.1%

实施例 9

将约 3 mL - 约 6 mL 的药物组合物给予用 2mL 球虫属攻击培养物攻击的小牛，其中所述的球虫攻击培养物中含有 125,000 形成孢子的卵囊与种类百分比计数为 93% 的 *Eimeria bovis*、4% 的 *Eimeria auburnensis* 和 3% 的祖氏艾美球虫 (*Eimeria zuernii*) 的球虫属卵囊，所述的药物组合物具有 5.4 pH 并该药物组合物中含有：以 100 mg/mL 药物组合物的用量存在的 N-(正丙基)异构体 I 和 N-(正丙基)异构体 II 的平衡混合物，其中 100 mg/mL 是实际功效数；以 0.1 mmol/mL 药物组合物的用量存在的柠檬酸；以 19.58 mg 浓酸(按重量效率计 36-38%)/mL 药物组合物的用量存在的盐酸；以 0.09 mg 的 1.0 M 氢氧化钠溶液/mL 药物组合物的用量存在的氢氧化钠；以 0.09 mg 的 10 M 氢氧化钠溶液/mL 药物组合物的用量存在的氢氧化钠；以 501.25 mg/mL 药物组合物的用量存在的丙二醇；和以 418.20 mg/mL 药物组合物的用量存在的水。

从当地的乳牛场商购 60 头体重约为 110-125 kg 的纯种小牛、称重、通过耳部标签鉴别并观察一般健康评价。将认为身体异常、尺寸过小或达到时垂死的动物排除在本研究之外。使小牛寄居在 5 个监控围栏中(12 头动物/围栏)。在攻击前将小牛保持 7 天以便使它们适应环境。在攻击前根据研究者的判断排除小牛。在第攻击前-6、-4 和 2 天时，获得粪便样品用于半定量卵囊计数。如果存在，那么在攻击前-4 天时，形成卵囊。

在达到后的第 8 天(研究的第 0 天), 给小牛经口腔接种艾美球虫属(*Eimeria*)培养物。在研究期限中从第 1 天开始基本上在每天的同时测定并记录体温。每日评价形态、水化和粪便稠度得分。在攻击后的第 2、4、6、8 和 10 天采集粪便样品。在攻击后第 10 天形成卵囊。在攻击后第 10 天, 使用随机化分段划分将 50 头动物随机分入 5 个治疗组之一。各围栏中代表同样的治疗。给动物经皮下注射单剂量的下列溶液之一: (1) 约 4 mL 的无菌 0.9%氯化钠(盐水); (2) 约 4 mL 剂量为 10 mg/kg 体重的 300 mg/mL MICOTIL; (3) 约 6 mL 剂量为 5 mg/kg 体重的所述药物组合物; (4) 约 3 mL 剂量为 2.5 mg/kg 体重的所述药物组合物; 或给动物经口服顿服给予 (5) 约 2 盎司的安普罗铵(amprolium)的 9.6%口服溶液、剂量为 10 mg/kg 体重。仅在接下来 4 天中的每 1 天再给予安普罗铵。将所有的其它治疗均以单剂量注射方式给药。在治疗后的第 12、14、16 和 18 天对粪便样品中脱落的球虫属卵囊进行半定量方式的检查。从第 19 天开始并持续至第 28 天, 评价每日粪便样品的半定量计数。在第 19-21、23、26 和 28 天时形成脱落的卵囊。将在本研究过程中死亡或因与临床球虫病相关的垂死疾病而实施安乐死的小牛计为死亡。对死亡的动物进行尸体剖检并记录发现的总体情况。在第 28 天终止本研究时, 对所有保持存活的动物称重、实施安乐死并进行死后的(post-mortem)检查。

基于对平均每日临床得分、体温和卵囊脱落的分析来确定对药物功效的评价。通过反复测定的 ANOVA 来评价不同治疗组之间在临床得分和体温方面的差异。通过因子 ANOVA 确定重量增加的差异。使用 χ^2 分析和 Fisher 精确检验来对治疗组之间死亡率和卵囊脱落情况进行比较。

在攻击后第 19 天时, 检测卵囊的脱落情况。各治疗组中的平均每日直肠温度在本研究期限过程中保持在正常范围。没有检测到治疗组之间存在显著性差异($p > 0.05$)。临床得分评价包括对粪便稠度、水化和形态的得分。形态和粪便得分表明用 MICOTIL、安普罗铵或各剂量水平的所述药物组合物治疗的小牛比盐水对照组小牛对治疗产生有

利的反应。粪便得分、水化得分和形态得分的增加与可检测到的卵囊脱落时间(第19天)一致。用安普罗铵、MICOTIL 或各剂量水平的所述药物组合物治疗的动物在平均每日粪便稠度得分方面比盐水治疗的小牛表现出具有统计学显著性的降低($p < 0.05$)。在卵囊脱落前 2-3 天发生粪便得分增加且在整个 28 天研究中保持升高。在对用安普罗铵、MICOTIL 或所述药物组合物治疗的小牛进行比较时没有检测到差异。用安普罗铵治疗的小牛在每日平均水化得分方面比盐水治疗的小牛表现出统计学显著性降低($p < 0.05$)。在用安普罗铵、MICOTIL 或所述药物组合物治疗的小牛之间观察到在水化得分方面没有差异。用安普罗铵、MICOTIL 或各剂量水平的所述药物组合物治疗小牛与盐水对照组相比在平均每日形态得分方面产生显著性降低($p < 0.05$)。在卵囊脱落峰值时间时的安普罗铵与盐水治疗的小牛之间注意到了形态得分的差异。在本研究中最后 7 天过程中用 MICOTIL 或各剂量水平的所述药物组合物治疗的动物与盐水对照组小牛相比在形态得分方面表现出显著降低。在 MICOTIL、安普罗铵或药物组合物治疗组之间没有观察到显著性差异($p > 0.05$)。

将死亡率概括在表 13 中。在本研究中 5 头小牛因球虫病而死亡。在攻击后的第 23 天有 3 头小牛死亡而在感染后第 28 天有 2 头小牛死亡。在各盐水和 MICOTIL 治疗组中有 2 头动物死亡。在本研究过程的安普罗铵治疗组中有 1 头动物死亡。在用所述药物组合物治疗的动物中没有动物死亡。在非盐水治疗的动物中在死亡率方面没有统计学显著性($p > 0.05$)差异。

表 13

治疗	死亡率
盐水 (6mL)	2/10 (20%)
安普罗铵 (2 盎司)	1/10 (10%)
MICOTIL (10mg/kg)	2/10 (20%)
药物组合物 (2.5mg/kg)	0/10 (0%)

药物组合物 (5mg/kg) 0/10 (0%)

表 14 概括了治疗对重量增加的作用。在所有治疗组中观察到了确定的平均每日平均重量增加。在用所述药物组合物和安普罗铵治疗的小牛中观察到比盐水和 MICOTIL 治疗组中的动物在重量增加方面提高。当评价 21-天每日平均体重增加时, MICOTIL-和盐水治疗的动物的反应类似。然而, 在非盐水治疗的组中没有观察到体重增加方面的统计学差异。

表 14

治疗	21-天每日平均重量增加 (kg)
盐水 (6mL)	0.30
安普罗铵 (2 盎司)	0.60
MICOTIL (10mg/kg)	0.21
药物组合物 (2.5mg/kg)	0.45
药物组合物 (5mg/kg)	0.44

在攻击前和攻击后监测艾美球虫属的卵囊脱落情况。首先在攻击后第 19 天时检测到卵囊脱落情况。在本研究中, 当与 MICOTIL-、安普罗铵-和药物组合物治疗的动物比较时在盐水治疗的动物中观察到了在卵囊脱落方面具有统计学显著性 ($p < 0.05$) 增加。此外, MICOTIL-治疗的动物与用安普罗铵治疗的动物相比在卵囊脱落方面表现出具有统计学显著性 ($p < 0.05$) 的增加。然而, 当将 MICOTIL-和安普罗铵-治疗的小牛与用各剂量的所述药物组合物治疗的小牛比较时, 在卵囊脱落方面没有观察到具有统计学显著性 ($p > 0.05$) 的差异。

在本研究中, 在攻击后第 19、20、21、23、26 和 28 天时盐水对照组中有 40-100% 的动物表现出卵囊持续脱落。用安普罗铵、MICOTIL 或所述药物组合物治疗的动物与盐水对照组相比表现出卵囊脱落减少。在本研究中, *E. bovis* 约占脱落卵囊的 60-100%/样品。E.

auburnensis 和 *E. zuernii* 约占脱落卵囊的 10-40%/样品。在攻击后的第 28 天时祖氏艾美球虫 (*E. zuernii*) 卵囊的脱落明显增加, 这一结果与 *E. bovis* 卵囊的脱落减少一致。然而, 在整个监测脱落期内, 看起来测试化合物中没有一种可以显著改变脱落卵囊的形成分布。

在尸体剖检时, 大部分动物显示出符合中度至重度球虫感染的主要病理学特征。在本研究中, 来自全部治疗组的小牛表现出出血性回肠炎和结肠炎的症候。在本研究中 14% 的小牛 (7/50) 在尸体剖检时没有显示出主要病理学特征。然而, 从各治疗组中脱落的卵囊提示在这些动物中存在一定程度的球虫属的感染。

本发明并不限于用于解释本发明的几个方面的实施例中所公开的特定实施方案的范围。在功能上等同的任何实施方案均属于本发明的范围。实际上, 本领域技术人员显然可以对包括本文证实和描述的那些在内的实施方案作各种修改且它们均属于所附权利要求的范围。

将本文公开的所有参考文献的全部内容引入本文作为参考。