



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104684925 B

(45) 授权公告日 2021.11.30

(21) 申请号 201380041532.3

(22) 申请日 2013.08.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104684925 A

(43) 申请公布日 2015.06.03

(30) 优先权数据
12005744.3 2012.08.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.02.05

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/066530 2013.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/023757 EN 2014.02.13

(73) 专利权人 波利弗尔股份公司
地址 瑞士阿斯克维尔

(72) 发明人 G·E·达勒 D·奥伯莱希特
F·伯尔纳迪尼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 谭玮

(51) Int.Cl.
C07K 7/64 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2007/079605 A2,2007.07.19
W0 2007/079597 A1,2007.07.19
Entenza J M et al.Tigecycline in
combination with other antimicrobials:a
review of in vitro,animal and case report
studies.《International Journal of
Antimicrobial Agents》.2009,8.e1-8.e9.
Page M G et al.Prospects for the next
anti-pseudomonas drug.《Current Opinion in
Pharmacology》.2009,558-565.

审查员 李影

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

含有主链环化肽的组合

(57) 摘要

一种新的组合,其包含下式的 β -发夹肽模拟物环(-Thr-Trp-Ile-Dab-Orn-^DDab-Dab-Trp-Dab-Dab-Ala-Ser-^DPro-Pro)(I),和甘氨酸环素类的化合物,特别是替吉环素,所述组合能够在比任一种单独施用的化合物更低的各种化合物剂量治疗性地控制人或动物中的特定细菌感染。所述组合可以用作药物以治疗例如皮肤或软组织感染;眼、耳、血流或腹内感染;与呼吸系统疾病、骨疾病、心血管疾病、生殖泌尿道疾病或胃肠道疾病有关的感染。

1. 一种组合,其包含下式的 β -发夹肽模拟物
环(-Thr-Trp-Ile-Dab-Orn-^DDab-Dab-Trp-Dab-Dab-Ala-Ser-^DPro-Pro) (I),
其中
Dab是(S)-2,4-二氨基丁酸;
^DDab是(R)-2,4-二氨基丁酸;
Orn是(S)-2,5-二氨基戊酸;
和
替吉环素或其药学上可接受的盐。
2. 用于治疗人或动物中由铜绿假单胞菌引起的感染或与由铜绿假单胞菌引起的这样的感染有关的疾病的根据权利要求1所述的组合。
3. 用于在治疗人或动物中由铜绿假单胞菌引起的感染或与由铜绿假单胞菌引起的这样的感染有关的疾病中使用的根据权利要求1所述的组合。
4. 根据权利要求1所述的组合用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于治疗人或动物中由铜绿假单胞菌引起的感染或与由铜绿假单胞菌引起的这样的感染有关的疾病。
5. 一种药物组合物,其含有根据权利要求1所述的组合和至少一种药学上惰性的载体。
6. 根据权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物呈适合于口服、局部、透皮、注射、输注、经颊、透粘膜或吸入施用的形式。
7. 根据权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物呈适合于直肠、阴道或肺施用的形式。
8. 根据权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物呈片剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶、硬膏剂、乳膏剂、软膏剂、浆料、粉剂、喷雾剂、喷雾器或栓剂的形式。
9. 根据权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物呈溶液、混悬剂或糖浆剂的形式。
10. 根据权利要求5-9中任一项所述的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗人或动物中由铜绿假单胞菌引起的感染或与由铜绿假单胞菌引起的这样的感染有关的疾病。
11. 一种试剂盒,其包含含有根据权利要求1所述的式(I)的 β -发夹肽模拟物或其药学上可接受的盐的部分,和含有替吉环素或其药学上可接受的盐的部分。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒用于制备药物中的用途,所述药物用于治疗在人或动物中由铜绿假单胞菌引起的感染或与由铜绿假单胞菌引起的这样的感染有关的疾病。

含有主链环化肽的组合

[0001] 本发明提供了多种化合物的组合,所述组合能够在比任一种单独施用的化合物更低的各种化合物剂量治疗性地控制人或动物中的特定细菌感染。所述化合物之一是病原体特异性的抗生素主链环化肽,其包含与模板(其为 β -发夹样构象提供特殊结构约束(structural constraint))连接的12个 α -氨基酸残基的链,所述肽表现出高效力和生物利用度以及显著更长的体内半衰期。

[0002] 日益增长的微生物对确定抗生素的耐药性的问题已经刺激了开发具有新作用模式的新的抗微生物剂的强烈兴趣(H.Breithaupt,Nat.Biotechnol.1999,17,1165-1169)。一类新出现的抗生素是基于天然存在的阳离子肽(T.Ganz,R.I.Lehrer,Mol.Medicine Today 1999,5,292-297;R.M.Epand,H.J.Vogel,Biochim.Biophys.Acta 1999,1462,11-28)。这些包括二硫键连接的 β -发夹和 β -折叠肽(诸如protegrins [O.V.Shamova, H.A.Korneva,R.I.Lehrer,FEBS Lett.1993,327,231-236]、中国鲎肽[T.Nakamura, H.Furunaka,T.Miyata,F.Tokunaga,T.Muta,S.Iwanaga,M.Niwa,T.Takao,Y.Shimonishi, Y.J.Biol.Chem.1988,263,16709-16713]和防卫素[R.I.Lehrer,A.K.Lichtenstein, T.Ganz,Annu.Rev.Immunol.1993,11,105-128]、两亲的 α -螺旋肽(例如杀菌肽、皮抑菌肽、爪蟾抗菌肽和蜂毒素[A.Tossi,L.Sandri,A.Giangaspero,Biopolymers 2000,55,4-30])、以及其它直链和环结构肽。尽管尚未充分理解抗微生物阳离子肽的作用机制,它们的主要相互作用部位是微生物的细胞膜(H.W.Huang,Biochemistry 2000,39,8347-8352)。在暴露于这些药剂后,细胞膜经历透化,继之以快速的细胞死亡。但是,不可排除更复杂的作用机制,例如,涉及受体介导的信号传递(M.Wu,E.Maier,R.Benz,R.E.Hancock,Biochemistry 1999,38,7235-7242;M.Scocchi,A.Tossi,R.Gennaro,Cell.Mol.Sci.2011,68,2317-2330)。

[0003] 这些阳离子肽中的许多的抗微生物活性经常与它们的优选二级结构有关,所述二级结构在水溶液中或在膜样环境中观察到(N.Sitaraj,R.Nagaraj, Biochim.Biophys.Acta 1999,1462,29-54)。通过核磁共振(NMR)光谱法进行的结构研究已经证实,由于两个二硫键的强迫作用,阳离子肽诸如protegrin 1 (A.Aumelas,M.Mangoni, C.Roumestand,L.Chiche,E.Despauux,G.Grassy,B.Calas,A.Chavanieu, A.Eur.J.Biochem.1996,237,575-583;R.L.Fahrner,T.Dieckmann,S.S.L.Harwig, R.I.Lehrer,D.Eisenberg,J.Feigon,J.Chem.Biol.1996,3,543-550)和中国鲎肽I (K.Kawano,T.Yoneya,T.Miyata,K.Yoshikawa,F.Tokunaga,Y.Terada,S.J.Iwanaga, S.J.Biol.Chem.1990,265,15365-15367)呈现非常确定的 β -发夹构象。但是,高溶血活性阻碍它们作为抗生素的广泛应用。最近通过NMR进行的结构研究已经指示,高溶血活性似乎与该环状 β -发夹样分子的高度两亲性质相关联,但是通过调节构象和两亲性可能使抗微生物活性和溶血活性解离(L.H.Kondejewski,M.Jelokhani-Niaraki,S.W.Farmer,B.Lix, M.Kay,B.D.Sykes,R.E.Hancock,R.S.Hodges,J.Biol.Chem.1999,274,13181-13192; C.McInnes,L.H.Kondejewski,R.S.Hodges,B.D.Sykes,J.Biol.Chem.2000,275,14287-14294)。

[0004] 最近,分别在W02007079605和W02007079597中公开了遵循这些设计标准的一系列抗生素化合物,它们将特异性地针对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的高效力与低血毒效应相组合。该系列遵循在W02002070547和W02004018503中介绍这些概念的先前公开内容。利用其中描述的化合物,介绍了一种新策略来稳定主链环状阳离子肽模拟物 (peptide mimetics) 中的 β -发夹构象,所述肽模拟物表现出选择性的高抗微生物活性。这涉及将阳离子的和疏水的发夹序列移植到模板上,所述模板的功能是将肽环主链限制成为发夹几何形状。

[0005] 还已经在文献中描述了这类模板结合的发夹模拟物肽 (D.Obrecht, M.Altorfer, J.A.Robinson, *Adv. Med. Chem.* 1999, 4, 1-68; J.A.Robinson, *Syn. Lett.* 2000, 4, 429-441), 并且已经确立了使用组合的和平行的合成方法制备 β -发夹肽模拟物的能力 (L.Jiang, K.Moehle, B.Dhanapal, D.Obrecht, J.A.Robinson, *Helv. Chim. Acta.* 2000, 83, 3097-3112)。

[0006] 消除日益增加的多药耐药性细菌的流行和传播的一个替代方案是,从常用种类修饰和进一步开发抗生素物质。一个重大成就是,近年来替吉环素的开发,从而产生了一个新类别的非常有效的抗生素,其被称作甘氨酸环素。这类新的广谱抗生素已经在体外试验中显示出对以下生物的高微生物学活性:需氧性的至厌氧性的、革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,以及非典型生物,但是尤其重要的是,万古霉素耐药性的肠球菌 (*enterococci*)、甲氧西林耐药性的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、青霉素耐药性的肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和多药耐药性的革兰氏阴性细菌的许多种 (综述: G.A.Pankey, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, 56, 470-480)。体内研究和临床试验可以证实高效力并且确立有利的安全性谱,因为市场认可的它们的一系列适应症目前被批准 (综述: Y.Cai, R.Wang, B.Liang, N.Bai, Y.Liu, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 1162-1172; D.Yahav, A.Lador, M.Paul, L.Leibovici, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, 66, 1963-1971; E.Tasina, A.B.Haidich, S.Kokkali, M.Arvanitidou, *Lancet Infect. Dis.*, 2011, 11, 834-844)。

[0007] 另外,替吉环素作为广谱抗生素的治疗用途不甚完美,从而留下低应答病原体 (例如铜绿假单胞菌) 的漏洞。由于不利的风险收益比,替吉环素对于某些医院感染 (例如医院获得性肺炎) 也具有有限的应用。

[0008] 因此,替吉环素 (作为甘氨酸环素类抗生素的一种代表) 的治疗窗的扩展将是非常有益的。

[0009] 在一个方面,这可以通过治疗选择来实现,所述治疗选择将效力扩展至对替吉环素具有高易感性断点的细菌,或能够降低所述治疗药物在临床病例 (其到目前为止被判断为与不利的风险收益比有关) 中的有效量。在临床场合中避免替吉环素单一疗法的缺点的标准方案是,将该药物与互补抗生素组合。

[0010] 在历史上,采用不同的方法来表征单独的和组合的两种药理学活性成分的生物效应 (E.Jawetz, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1967; 203-209; T.-C.Chou, P.Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, 1984, 22, 27-55)。同时,关于观察到的药物-药物相互作用的分类,特别是对于抗生素,达到了广泛的同意。根据该术语,主要基于组合剂量-响应作用的量,如果两种活性组分性能彼此独立地分别具有相似联合作用,那么将药物-药物相互作用确定为“累加的”或“中性的 (indifferent)”。术语“拮抗作用”用于这样的情况: 其中可以观察到施

加的活性化合物对彼此的负面影响,主要是它们彼此抵消的情况。最后,“协同作用”用于这样的情况:其中剂量-响应显著增强,超过单独的每种个别药物的固有水平(J.M.T.Hamilton-Miller,J.Antimicrob.Chemother.,1985,15,655-657;G.M.Eliopoulos,R.C.Moellering Jr.,“Antibiotics in laboratory medicine”,1991,第3版,The William & Wilkins Co.,432-492)。

[0011] 可以在不同的临床和临床前阶段评估抗生素的具体药物-药物相互作用。目前,最广泛地使用的研究抗生素组合的体外方法是西洋跳棋盘技术(checkerboard technique)(其产生分级抑制浓度指数)和杀死曲线方法(H.O.Hallender等人,Antimicrob.Agents Chemother.,1982;22,743-752;M.J.Hall等人,J.Antimicrob.Chemother.,1983,11,427-433)。经补充几种应用基本上相同原理的技术(例如R.C.Li等人,Antimicrob.Agents Chemother.,1993;37,523-531;Chr.C.Sanders等人,Antimicrob.Agents Chemother.,1993;37,260-264),这些试验的意图主要是鉴别用于临床应用的潜在协同组合或避免拮抗组合在临床实践中的应用。但是,所有体外技术到目前为止都受阻于标准化的缺乏,特别是对体内情形的预测力的缺乏。因此,强烈地建议直接评估共同施用的药物化合物的效力的体内实验。

[0012] 在替吉环素的情况下,已经针对宽范围的敏感的和多耐药性的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌研究了与多种其它抗菌剂的组合(综述:J.M.Entenza,P.Morreillon,Int.J.Antimicrob.Agents,2009,34,8.e1-8.e9)。在体外,大多数组合主要产生中性应答,即既没有观察到协同作用也没有观察到拮抗作用。

[0013] 尽管如此,仅少数组合对特定细菌的某些分离物表现出协同作用。

[0014] 仍然存在日益增加的补充当前武器库(arsenal)的需要,以克服在对于患者有利的风险收益比治疗病原体的困难。因此,在体内提供强协同效应的药物组合会提供向前的重大一步。

[0015] 本发明提供了一种新的组合产品(combination),其包含下式的 β -发夹肽模拟物(peptidomimetic)环(-Thr-Trp-Ile-Dab-Orn-^DDab-Dab-Trp-Dab-Dab-Ala-Ser-^DPro-Pro)(I),

[0016] 其中

[0017] Dab是(S)-2,4-二氨基丁酸;

[0018] ^DDab是(R)-2,4-二氨基丁酸;

[0019] Orn是(S)-2,5-二氨基戊酸;

[0020] 如果没有明确地指定为D-氨基酸残基,按照标准的IUPAC命名法,所有其它氨基酸残基是L-氨基酸残基,

[0021] 和

[0022] 甘氨酰环素类的化合物,特别是替吉环素,

[0023] 或其药学上可接受的盐或水合物或溶剂合物。

[0024] 为了避免疑义,在下文中给出了氨基酸的缩写(其对应于通常采用的惯常实践)的列表,所述氨基酸或所述氨基酸的残基适合用于本发明的目的并在本文件中提及。

[0025] 描述信息L和D(例如在^DPro中)分别表示在 α -氨基酸的 α -位的立体化学,并且根据IUPAC的Fischer-Rosanoff惯例使用。

- [0026] Ala L-丙氨酸 (S) -2-氨基丙酸
[0027] Ile L-异亮氨酸 (2S,3S) -2-氨基-3-甲基戊酸
[0028] Orn L-鸟氨酸 (S) -2,5-二氨基戊酸
[0029] Pro L-脯氨酸 (S) -2-吡咯烷甲酸
[0030] ^DPro D-脯氨酸 (R) -2-吡咯烷甲酸
[0031] Ser L-丝氨酸 (S) -2-氨基-3-羟基丙酸
[0032] Thr L-苏氨酸 (2S,3R) -2-氨基-3-羟基丁酸
[0033] Trp L-色氨酸 (S) -2-氨基-3- (1H-吡啶-3-基) 丙酸
[0034] Dab (S) -2,4-二氨基丁酸
[0035] ^DDab (R) -2,4-二氨基丁酸;

[0036] 在另一个实施方案中,本发明提供了多种化合物的组合产品,所述组合产品能够在比单独施用的相同化合物更低的式(I)的 β -发夹肽模拟物的剂量治疗性地控制人或动物中的特定细菌感染。

[0037] 本发明的化合物的组合产品可以用在宽范围的应用中,以便抑制微生物的生长或杀死微生物,从而在人类中产生期望的治疗效果,或者由于它们的类似病原学,在其它脊椎动物中产生期望的治疗效果。具体地,要求保护的组合可以用于抑制以下生物的生长或将其杀死:多种需氧性的或厌氧性的、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌的微生物,或非典型生物体,但是特别是万古霉素耐药性的肠球菌、甲氧西林耐药性的金黄色葡萄球菌、青霉素耐药性的肺炎链球菌和以及铜绿假单胞菌。

[0038] 当用于治疗或预防感染或与这样的感染有关的疾病、特别是下述病症时,作为本发明的组合产品的组分的化合物或它们的药物组合物各自可以作为单个或单独的物理实体同时地以及依次地(即根据剂量方案具有特定时间推移(time-shift))来施用:与疾病诸如呼吸器相关性肺炎(VAP)、医院获得性肺炎(HAP)、健康护理相关的肺炎(HCAP)有关的医院感染;导管相关的和非导管相关的感染诸如泌尿道感染(UTI);与呼吸系统疾病诸如肺炎、囊性纤维化、肺气肿和哮喘有关的感染;与皮肤或软组织疾病诸如外科手术的创伤、创伤性伤口和烧伤创面有关的感染;与眼疾病诸如角膜炎和眼内炎有关的感染;与耳疾病诸如耳炎有关的感染;与CNS疾病诸如脑脓肿和脑膜炎有关的感染;与骨疾病诸如骨软骨炎和骨髓炎有关的感染;与心血管疾病诸如心内膜炎和心包炎有关的感染;血流感染(BSI)诸如败血症;与生殖泌尿道疾病诸如附睾炎、前列腺炎和尿道炎有关的感染;与胃肠道疾病诸如流行性腹泻、坏死性小肠结肠炎、盲肠炎、胃肠炎或胰腺炎有关的感染;或腹内感染诸如细菌性腹膜炎。

[0039] 因此,明白地理解,这些组分作为功能单元以协同方式起作用,从而将本发明的具体实施方案形成为“各部分的试剂盒(kit-of-parts)”。

[0040] 通过常规混合、溶解、造粒、制造包衣片剂、磨细、乳化、包封、包埋或低压冻干方法,可以制备包含本发明的化合物(单独地或组合地)的药物组合物。可以以常规方式使用一种或多种促进将活性加工成可以在药学上使用的制剂的生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅剂配制药物组合物。合适的制剂取决于所选的施用方法。

[0041] 对于局部施用,本发明的药学活性化合物可以配制为本领域众所周知的溶液、凝胶、软膏剂、乳膏剂、混悬剂等。

[0042] 全身性制剂包括设计用于通过注射(例如皮下、静脉内、肌肉内、鞘内或腹膜内注射)施用的那些,以及设计用于透皮、透粘膜、口服或肺部施用的那些。

[0043] 对于注射剂,本发明的化合物可以配制在适当的溶液中,优选地在生理上相容的缓冲液诸如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐水中。所述溶液可以含有配制用试剂诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。可替换地,本发明的活性药物成分可以呈用于在使用之前与合适的媒介物(例如无菌无热原水)组合的粉末形式。

[0044] 对于透粘膜的施用,如本领域已知的,将适合于要渗透的屏障的渗透剂用于所述制剂中。

[0045] 对于口服施用,通过与本领域众所周知的药学上可接受的载体组合,可以容易地配制本发明的化合物。这样的载体使得可以将本发明的化合物配制为片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、浆料、悬浮液等,用于待治疗的患者的口服摄入。对于口服制剂,例如,粉剂、胶囊剂和片剂,合适的赋形剂包括:填充剂诸如糖诸如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇;纤维素制品诸如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP);造粒剂;和粘合剂。如果需要的话,可以加入崩解剂,诸如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐,诸如海藻酸钠。如果需要的话,使用标准技术,可以给固体剂型包被糖包衣或肠溶衣。

[0046] 对于口服液体制剂例如混悬剂、酏剂和溶液,合适的载体、赋形剂或稀释剂包括水、二醇、油、醇等。此外,可以加入矫味剂、防腐剂、着色剂等。

[0047] 对于经颊施用,组合物可以呈通常配制的片剂、糖锭等的形式。

[0048] 对于吸入施用,本发明的化合物可以方便地以来自增压包装或喷雾器的气溶胶喷雾的形式递送,使用合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氧化碳或另一种合适的气体。在加压气雾剂的情况下,通过提供阀门来递送计量的量,可以确定剂量单元。可以配制用于吸入器或吹入器中的例如明胶的胶囊和药筒,其含有本发明的化合物和合适的粉末基质(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0049] 所述化合物还可以与适当栓剂基质(诸如可可脂或其它甘油酯)一起配制为直肠或阴道组合物诸如用于灌肠剂的溶液或栓剂。

[0050] 除了前面描述制剂之外,本发明的化合物还可以配制为贮库制剂。通过植入(例如皮下地或肌肉内地)或通过肌内注射,可以施用这样的长效制剂。为了制备这样的贮库制剂,可以将本发明的化合物与合适的高分子材料或疏水材料一起(例如,作为在可接受的油中的乳剂)或与离子交换树脂一起配制,或者配制为微溶性的盐。

[0051] 此外,可以使用其它药物递送系统,诸如本领域众所周知的脂质体和乳剂。还可以使用某些有机溶剂诸如二甲亚砜。另外,使用持续释放系统,诸如含有治疗剂的固体聚合物的半透性基质,可以递送本发明的药学活性化合物。各种持续释放材料已得到确定,并且是本领域技术人员众所周知的。取决于其化学性质,持续释放胶囊可以释放化合物数天至超过3年。取决于治疗剂的化学性质和生物学稳定性,可以使用与蛋白稳定化类似的额外策略。

[0052] 由于本发明的 β -发夹肽模拟物以及甘氨酸环素类的化合物含有带电荷的残基,分别可以含有带电荷的亚结构,它们可以独立地原样或作为药学上可接受的盐包含在任意上述制剂中。与对应的游离碱形式相比,药学上可接受的盐倾向于更可溶于水性溶剂和其它

质子溶剂中。

[0053] 另外,本发明的化合物和它们的药学上可接受的盐可以以其本身或在呈形态学上不同固态形式的任意适当制剂中使用,所述制剂可以含有或不含有不同量的溶剂,例如从结晶过程中保留的水合物。

[0054] 本发明的 β -发夹肽模拟物以及甘氨酸环素类的化合物或其组合物通常以有效地实现预期目的量和比例使用。应当理解,使用的量将取决于特定应用。

[0055] 就治疗或预防微生物感染或与这样的感染有关的疾病的用途而言,以治疗有效量施用或应用本发明的化合物或其组合物。治疗有效量是指这样的量:其有效地改善微生物感染或与其有关的疾病的症状,或改善、治疗或预防微生物感染或与其有关的疾病。治疗有效量的确定完全是在本领域技术人员的能力范围内。

[0056] 例如,对于全身施用,治疗有效剂量可以首先从体外测定进行估计。例如,可以在动物模型中配制一定剂量以达到循环的活性药物成分浓度范围,其包括在细胞培养物中确定的 IC_{50} (即对50%的细胞培养物致死的试验化合物浓度)、在细胞培养物中确定的MIC (即阻止微生物的可见生长的试验化合物浓度)。还可以使用本领域众所周知的技术,例如如下面在实施例部分中所述,从体内数据 (例如动物模型) 确定最初剂量。本领域普通技术人员可以基于动物数据容易地优化给人类的施用。

[0057] 采用的活性成分的有效剂量可以根据所采用的特定化合物或药物制剂、施用模式 and 治疗的病症的严重程度和类型而变化。因而,根据包括施用途径和清除途径 (例如患者的肾和肝功能) 在内的因素,选择剂量方案。本领域中熟练的医师、临床医师或兽医可以容易地确定和开处方预防、改善或阻止病症或疾病的进展所需的单个活性成分或它们的组合产品的量。无毒性地达到活性成分浓度的最佳精确度需要基于活性成分向靶位点的利用度的动力学的方案。这涉及活性成分的分布、平衡和消除的考虑。

[0058] 在局部施用或选择性摄取的情况下,本发明的化合物的有效局部浓度可以与血浆浓度无关。本领域技术人员将能够优化治疗上有效的局部剂量,无需过多实验。

[0059] 通过多种体外测定,可以预评估确定所述组合或以及本发明的各种化合物作为药物在临床场合中的效力、剂量、给药方案和一般治疗指数的其它参数。这些关键参数中的一些是例如最低杀菌浓度、最低抑制浓度、抗细菌的杀死曲线、细胞毒性、溶血、血浆稳定性和血浆半衰期、微粒体稳定性、药物代谢 (包括药物-药物相互作用)、蛋白结合、膜渗透性、可溶性等。

[0060] 现在将在以下实施例中进一步描述本发明,所述实施例意图仅仅作为例证,不当被解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0061] 体内效力试验:

[0062] 在鼠肺炎模型中针对铜绿假单胞菌PAX11045的效力和 ED_{50} 的估计

[0063] 参考1:

[0064] 在小鼠肺炎模型中确定式 (I) 的化合物 (“化合物1”) 针对铜绿假单胞菌临床分离物PAX11045的效力和 ED_{50} 。在治疗后20小时,确定肺和脾中的菌落计数。

[0065] 小鼠的感染

[0066] 将得自5%马血琼脂平板的PAX11045新鲜过夜菌落悬浮于0.9%无菌盐水中至大约 10^8 CFU/ml,并进一步稀释至大约 5×10^7 CFU/ml。将雌性小鼠 (DBA/2,远系杂交种,18-22g, Charles River) 用0.08ml Zoletil (替来他明+唑拉西洋) 麻醉,并经由鼻子用移液器接种0.05ml含有大约 10^6 CFU的细菌悬浮液。接种后4小时,用45 μ l neurophen (20mg布洛芬/ml, 对应于大约30mg/kg) 经口治疗小鼠作为疼痛缓解。

[0067] 用化合物1治疗小鼠

[0068] 将2个管形瓶所含的10mg活性化合物1溶解在2.25ml 0.9%无菌盐水中,各自达到4.5mg/ml的浓度。将一瓶用盐水进一步稀释2倍至2.25、1.125、0.56和0.28mg/ml。在感染后4小时以基于20g的平均动物重量计算的剂量,在颈区域中用0.2ml单次剂量皮下地治疗小鼠。作为阳性对照,以相同的方式用19mg/kg的固定剂量使用环丙沙星。

[0069] 取样

[0070] 在接种后4小时(未治疗的小鼠)和24小时(治疗的小鼠和仅媒介物治疗的小鼠),确定菌落计数。在处死小鼠后,立即将肺和脾收集并在-20℃冷冻。融化以后,将所述器官在1ml 0.9%盐水中匀浆化。然后将每个样品在盐水中稀释10倍,并将20 μ l点样施加于血琼脂平板上。将所有琼脂平板在35℃在环境空气中温育18-48小时。

[0071] CFU计数

[0072] 将接种物的CFU/ml确定为 $7.92 \log_{10}$ CFU/ml,其对应于 $6.62 \log_{10}$ CFU/小鼠。

[0073] 在仅媒介物组中,在感染后4小时平均 \log_{10} CFU/肺为5.28,并且CFU水平在24小时以后保持在类似水平。在仅媒介物组中,收集脾的类似物基线数据,具有在4小时1.96的平均 \log_{10} CFU/脾,其在24小时后增加至2.60。

[0074] 与媒介物治疗相比(对于较高浓度, $p < 0.001$),使用化合物1的治疗在两种器官中导致CFU水平的浓度依赖性的显著降低。环丙沙星 (19mg/kg) 也对减小细菌接种量具有有效影响 ($p < 0.001$)。

[0075] 使用S形剂量-响应模型(可变斜率)在鼠肺中评价化合物1针对PAX11045的ED₅₀的剂量-响应曲线,揭示了4.33mg/kg的估计值。下面的表1总结了有关的效力值。

[0076] 实施例1:

[0077] 在小鼠肺炎模型中确定了与替吉环素组合的式(I)的化合物(“化合物1”)针对铜绿假单胞菌临床分离物PAX11045的效力和ED₅₀。在治疗后20小时,确定肺中的菌落计数。

[0078] 小鼠的感染

[0079] 将得自5%马血琼脂平板的PAX11045新鲜过夜菌落悬浮于0.9%无菌盐水中至大约 10^8 CFU/ml,并进一步稀释至大约 5×10^7 CFU/ml。将雌性小鼠 (DBA/2,远系杂交种,18-22g, Charles River) 用0.08ml Zoletil麻醉,并经由鼻子用移液器接种0.1ml含有大约 10^6 CFU的细菌悬浮液。接种后4小时,用45 μ l neurophen (20mg布洛芬/ml, 对应于大约30mg/kg) 经口治疗小鼠作为疼痛缓解。

[0080] 用替吉环素治疗小鼠

[0081] 将53mg替吉环素(Tygacil, Wyeth) 溶解在5.3ml 0.9%无菌盐水中至10mg/ml的浓度,并用盐水进一步稀释至1.25mg/ml。在感染后3小时在颈区域中用0.2ml单次剂量皮下地治疗小鼠,基于20g的平均动物重量,所述剂量对应于12.5mg/kg。

[0082] 用化合物1治疗小鼠

[0083] 将2个管形瓶含有的5mg活性化合物1溶解在2.5ml 0.9%无菌盐水中,各自达到2mg/ml的浓度。将一瓶用盐水进一步稀释2倍至1.1、0.55、0.275和0.137mg/ml。在感染后4小时以基于20g的平均动物重量计算的剂量,在颈区域中用0.2ml单次剂量皮下地治疗小鼠。作为阳性对照,以相同的方式以20mg/kg的固定剂量使用环丙沙星。

[0084] 取样

[0085] 在接种后4小时(未治疗的小鼠)和24小时(治疗的小鼠和仅媒介物治疗的小鼠),确定菌落计数。在处死小鼠后,立即将肺收集并在-20℃冷冻。融化以后,将所述器官在1ml 0.9%盐水中匀浆化。然后将每个样品盐水中稀释10倍,并将20μl点样施加于血琼脂平板上。将所有琼脂平板在35℃在环境空气中温育18-24小时。

[0086] CFU计数

[0087] 将接种物的CFU/ml确定为 $7.6 \log_{10}$ CFU/ml,其对应于 $6.3 \log_{10}$ CFU/小鼠。

[0088] 在仅媒介物组中,在感染后4小时平均 \log_{10} CFU/肺为6.13,并且CFU水平在24小时以后保持在类似水平。

[0089] 与媒介物治疗相比($p < 0.001$),使用化合物1和替吉环素的组合的治疗导致CFU水平的浓度依赖性的显著降低。环丙沙星(20mg/kg)也对降低细菌接种量($p < 0.001$)具有有效作用。

[0090] 使用单独替吉环素(12.5mg/kg)的治疗对细菌接种量不具有作用。

[0091] 使用S形剂量-响应模型(可变斜率)在鼠肺中评价在有固定剂量的替吉环素(12.5mg/kg)存在下的化合物1针对PAX11045的ED₅₀的剂量-响应曲线,揭示了1.33mg/kg的估计值。下表总结了有关的效力值。

[0092] 表1:化合物1的效力值

| | 化合物 1 | 在有 12.5 mg/kg 替吉环素存在下的化合物 1 |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 最高水平 (top level) | $1.3 \log_{10}$ CFU/ml | $0.13 \log_{10}$ CFU/ml |
| 最低水平 (bottom level) | $-2.2 \log_{10}$ CFU/ml | $-2.37 \log_{10}$ CFU/ml |
| E _{max} | $3.5 \log_{10}$ CFU/ml | $2.5 \log_{10}$ CFU/ml |
| ED ₅₀ | 4.33 mg/kg | 1.33 mg/kg |
| 静态剂量 | 1.55 mg/kg | 0.74 mg/kg |
| 1 对数杀死剂量 | 8.1 mg/kg | 1.2 mg/kg |
| 2 对数杀死剂量 | 20 mg/kg | 2.1 mg/kg |
| R ² | 0.55 - 0.75 | 0.77 |

[0093]