



1. 包括丙烯醛衍生的链段和聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物在制备用于通过将其全身地给药而治疗受试者中的肠胃外病毒感染的药物中的用途,所述共聚物具有不超过1000道尔顿的分子量。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述丙烯醛衍生的链段为包括两个或更多个丙烯醛残基的聚丙烯醛低聚物。
3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物具有300至1000道尔顿的分子量。
4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述聚亚烷基二醇低聚物链段具有在200至600道尔顿范围内的分子量。
5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述聚亚烷基二醇为聚乙二醇。
6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述聚乙二醇具有在200至400道尔顿范围内的分子量。
7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物通过选自口服给药、吸入、经皮递送或注射的途径给药。
8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物通过口服给药。
9. 根据权利要求1所述的用途,其中将所述共聚物注射到循环系统中。
10. 根据权利要求1所述的用途,其中将所述共聚物注射到血流中。
11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物作为水溶液给药,所述水溶液包括在0.01重量%至20重量%的范围内的成分。
12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物以片剂或液体的形式口服给药。
13. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物以囊片或糖浆剂的形式口服给药。
14. 根据权利要求1所述的用途,其中所述共聚物以在1mg至1000mg/千克体重/天范围内的剂量全身给药。
15. 根据权利要求1所述的用途,其中所述病毒感染选自流感病毒、HIV、肝炎、罗斯河和疱疹病毒感染。
16. 根据权利要求1所述的用途,其中所述病毒感染为流感。
17. 根据权利要求1所述的用途,其中所述病毒感染为甲型流感。
18. 包括聚丙烯醛低聚物链段和聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物在制备用于治疗受试者中的肠胃外病毒感染的药物中的用途,其中所述共聚物用于对受试者进行口服或肠胃外给药,该共聚物具有不超过1000道尔顿的分子量。
19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述聚亚烷基二醇低聚物链段的分子量在200至600道尔顿的范围内。

## 抗病毒剂和治疗病毒感染的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用包括丙烯醛衍生的链段和聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物治疗病毒感染、特别地肠胃外(非肠道, parenteral)病毒感染的方法, 其中所述共聚物具有最高达1500道尔顿、优选地最高达1000道尔顿的分子量, 并且涉及通过丙烯醛在聚亚烷基二醇的水溶液中的聚合制备共聚物的方法。

### 背景技术

[0002] 具有脂质包膜或外衣的病毒(通常是疏水性的)是重要的人和动物病原体。与这样的病毒相关的病症(情况)的实例包括正粘病毒(Orthomyxoviruses)(流感病毒)、HIV、肝炎、罗斯河(Ross River)和疱疹。疱疹病毒引起原发性和继发性感染两者, 其范围从平凡的粘膜溃疡到免疫妥协患者中威胁生命的疾病。疱疹组包括HSV-1、HSV-2、带状疱疹(水痘/缠腰龙)、HCMV(人巨细胞病毒)、爱泼斯坦巴尔病毒(EB病毒)(EBV)、疱疹6,7(蔷薇疹, 移植后感染)和疱疹8(与卡波西肉瘤有关)。

[0003] 感染疱疹类型病毒的人典型地经历其中发生症状的爆发(发作)和无症状的潜伏期的循环。在潜伏期期间, 病毒存在于神经节内, 其中它为非活性的, 并且病人无症状。然而, 虽然无症状, 但病人仍可感染其他人。这称为病毒脱落(散发, shedding)。当病毒被再激活时可发生症状的再现。再激活可由许多不同的事件触发, 并且在免疫妥协患者中尤其成问题。

[0004] 本领域需要替代的抗病毒疗法。本发明在一组实施方案中解决这些需求并提供治疗病毒感染的方法。

[0005] 丙烯醛由于其高反应性而对身体组织是极度破坏性的。在来自烟草香烟的烟雾中丙烯醛气体与肺癌风险之间存在联系(Feng, Z; Hu W; Hu Y; Tang M (2006年10月). "Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53mutational hotspots and inhibition of DNA repair". Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (42) :15404-15409)。单独的纯聚丙烯醛未知呈现出显著的抗病毒活性。然而, 包括US 5290894、Melrose等在内的许多专利公开了改性聚丙烯醛的制备和作为用于经由胃肠道治疗病毒感染的潜在抗病毒剂的用途。这种类型的聚丙烯醛的进一步的实例描述于US 6723336、US 7629002和US 9119394中。丙烯醛是极度反应性的单体, 并且在聚合时迅速地形成高分子量的难处理的(难治疗的intractable)网络。通常, 阴离子聚合在不含水的溶剂中进行并提供快速聚合以形成高分子量聚合物。

[0006] 现有技术中描述的聚合物认识到的优势之一是, 它们不能穿透肠壁, 使得它们的活性被限制于胃肠道。US 9119394(Melrose)描述了聚丙烯醛聚合物, 其可通过丙烯醛和/或其缩醛与烷醇的碱催化聚合形成。所述聚合物具有降低的迁移穿过膜、特别地胃肠道的膜的倾向的优势。

[0007] 美国专利6,060,571(Werle等)描述了释放丙烯醛的聚合物, 其释放足够的丙烯醛以提供作为水体系中的消毒剂的活性。这样的聚合物由于在水介质中释放的显著水平的丙

烯醛的毒性而不适于体内使用。

[0008] 这里包括对本发明的背景的讨论以解释本发明的来龙去脉。这并不被视为承认所提及的任何材料是在截止任何权利要求的优先权日时公布的、已知的或为公共常识的一部分。

## 发明内容

[0009] 我们现在已经发现,可制备包括丙烯醛衍生的(得自丙烯醛的)链段和聚亚烷基二醇低聚物链段的低分子量共聚物以将共聚物的分子量限制在不超过1500道尔顿,优选地不超过1000道尔顿。进一步,我们发现,所述低分子量共聚物提供强效的(有效力的)抗病毒活性,并且可用于治疗肠胃外病毒感染,而不释放丙烯醛单体。事实上,在与更高分子量的丙烯醛聚合物相比时,活性增强。

[0010] 根据一组实施方案,提供用于治疗、控制或预防受试者(患者, subject)中的病毒感染的方法,该方法包括向受试者给药(施用)包括丙烯醛衍生的链段和(优选200至600道尔顿的分子量的)聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物,所述共聚物具有不超过1500道尔顿、优选地不超过1000道尔顿的分子量。

[0011] 根据另一组实施方案,提供体内治疗病毒感染(优选地肠胃外病毒感染)的方法,包括使至少一种目标感染细胞在体内与有效量的包括丙烯醛衍生的链段和聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物接触的步骤,所述共聚物具有不超过1500道尔顿、优选地不超过1000道尔顿的分子量。

[0012] 病毒感染可由一系列病毒引起,如包衣(包被)病毒(如脂质包衣病毒)、包括疱疹、HIV、巨细胞病毒和流感。优选地,通过本发明方法治疗和/或控制的病毒感染可为HSV-1、HSV-2、瓦德塞拉带状疱疹病毒(Vadcella Zoster Virus)(以水痘或缠腰龙的形式)、HCMV、EBV、疱疹6、疱疹7和疱疹8。

[0013] 在另一实施方案中,病毒是流感病毒例如甲型流感。

[0014] 在又一实施方案中,病毒是罗斯河病毒。

[0015] 本发明的方法可特别地适于治疗免疫抑制个体中的病毒感染。本发明的方法也可用作其它抗病毒疗法的辅助疗法。

[0016] 在又一方面,提供制备包括丙烯醛衍生的链段(例如聚丙烯醛低聚物)和聚亚烷基二醇低聚物的共聚物的方法,包括在如下的条件下使丙烯醛和聚亚烷基二醇低聚物共聚:pH不超过12.0和在12.0-7.0的pH范围内的碱性催化,在包括至少20%重量/重量水的水溶液中,和(优选地200至600道尔顿的分子量的)聚亚烷基二醇低聚物以至少4、优选地至少10的聚亚烷基二醇/丙烯醛的重量比。

[0017] 定义

[0018] 术语“身体”是指人和/或动物的身体;术语“受试者”是指这样的身体,其为所述受试者。

[0019] 静脉(静脉注射)疗法(简称IV疗法或iv疗法)是将液体物质直接地输注到静脉中。

[0020] 如本文中所用的,术语“肠胃外”是指以不同于通过完整消化道的方式进入(摄入)身体内。也就是说,不在正常的胃或肠内;非肠内的。

[0021] 术语“肠胃外病毒感染”是指在身体内不在胃肠道内感染的病毒感染。

[0022] 术语“肺给药(施用)”是指通过吸入(吸气)将本发明的制剂给药至肺中。

[0023] 如本文中所用的,术语“吸入”是指将空气摄入肺泡中。在具体实例中,摄入可通过如下发生:在吸入的同时的本发明的制剂的自给药,或者通过经由呼吸机给药,例如给药至在呼吸机上的患者。关于本发明的制剂使用的术语“吸入”与“肺给药”同义。

[0024] 如本文中使用的短语“药学上可接受的载体”是指在将主题共聚物和/或组合物从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一器官或身体的一部分中涉及的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封(胶囊)材料。各载体必须在与制剂的其它成分相容的意义上是“可接受的”,并且不对患者造成不适当的伤害。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和药物制剂中使用的其它无毒相容物质。

[0025] 所述共聚物可以提供治疗的治疗有效量(或“药学上有效或活性量”)使用。所述量将取决于给药方式例如口服、肌内(肌内注射)、静脉内(静脉注射)、吸入或经皮给药。如本文中使用的短语“治疗有效量”是指有效地产生一些所需的抗病毒治疗效果的共聚物和/或包括共聚物成分的组合物、材料或组合物的量。

[0026] 术语丙烯醛衍生的链段是指包括一个或多个丙烯醛单体残基的共聚物链段。

[0027] 术语低聚物、聚亚烷基二醇低聚物和聚丙烯醛低聚物是指由至少两个单体单元、优选地至少三个单体单元组成的聚合物。低聚物典型地包括2至20个单体单元;在一项实施方案中,单元的数量为2至10。

[0028] 术语“单体单元”和“单体残基”是指存在于由反应单体例如丙烯醛和聚亚烷基二醇衍生的(得到的)共聚物中的单元。

[0029] 多分散指数是聚合物的重均分子量( $M_w$ )与聚合物的数均分子量( $M_n$ )之比。聚合物的重均分子量和数均分子量可通过分析方法例如高效液相色谱测定。一旦测定了重均分子量和数均分子量,通过将重均分子量除以数均分子量 $M_w/M_n$ 可容易地计算多分散指数。假定单分散的聚合物具有1.000的多分散指数。然而,典型的商购聚合物例如市售可获得的树脂具有10或更多的多分散指数。具有宽的分子量分布的聚合物具有较高的多分散指数,而具有窄的分子量分布的聚合物具有较低的多分散指数。

[0030] 在整个说明书中,术语“包括”或“包含”或关于其的语法变体的使用应当被用来指定所陈述的特征、整体、步骤或组分的存在,但不排除存在或增加一个或多个未具体提及的其它特征、整体、步骤、组分或其集合。

## 附图说明

[0031] 参考附图描述本发明的实施方案。在附图中:

[0032] 图1为显示如实施例3中所述的随浓度的以%抑制表示的变化的CPE 测定结果的图。

[0033] 图2为如实施例3中所述的实施例1的制剂的随浓度(%)的以%抑制表示的变化的PRNT测定结果的图。

[0034] 图3为显示两组感染病毒的小鼠的百分比存活率的图:组1用本发明的共聚物治疗,以及组2根据实施例4的感染的对照。

### 具体实施方式

[0035] 治疗方法包括给药包括链段和(优选地200-600道尔顿的分子量的)聚亚烷基二醇低聚物链段的共聚物,该共聚物具有不超过1500道尔顿、优选地不超过1000道尔顿的分子量。

[0036] 丙烯醛衍生的链段可包括一个或多个丙烯醛单体残基。在一项实施方案中,丙烯醛衍生的链段包括聚丙烯醛低聚物。

[0037] 聚亚烷基二醇可为聚( $C_1$ 至 $C_4$ 亚烷基二醇)或其混合物或共聚物,但通常聚亚烷基二醇最优选地为聚乙二醇,优选地200至600道尔顿范围内的分子量的聚乙二醇。

[0038] 本领域技术人员将理解,术语聚乙二醇优选地不包括一缩二乙二醇。平均分子量200至600道尔顿的聚乙二醇包括标称平均分子量200至600道尔顿的聚乙二醇,其中平均分子量不大于标称值的110%且不小于标称值的 90% (优选地不大于105%且不小于95%)。聚乙二醇具有式  $H-[OCH_2CH_2]_n-OH$ 。n的平均值为至少3,并且通常为3至13(尽管平均值不需要是整数)。聚乙二醇可广泛地以药学(药物)等级从商业供应商获得,并以规定的标称分子量出售,这通常意味着平均分子量不超过标称值的105%且不低于标称值的95%。粘度和分子量测定方法公开于在USP NF Official Compendium of Standards第11180-1182卷[2007版]中。在一组实施方式中,聚乙二醇的分子量为200至400。在一些实施方案中,可优选地使用特定的纯乙二醇低聚物,例如式 $H-[OCH_2CH_2]_n-OH$ 的化合物,其中n为3或4。

[0039] 在一组实施方案中,共聚物的分子量(本文中总是指指数均分子量)为至少 300道尔顿、优选地至少400道尔顿,例如在400至1500道尔顿的范围内,以及更优选地分子量在400至1000道尔顿的范围内。

[0040] 治疗可为预防性或治愈性的。

[0041] 在另一实施方案中,将所述共聚物系统地(全身地)给药,例如通过口服给药、吸入、经皮递送或者通过注射例如到血流中或肌内注射或者通过静脉疗法如通过注射或输注。通常认为,分子量不超过约1000、特别地少于约 800道尔顿的分子具有跨越腹膜的合理地(相当地)自由通道。口服给药需要共聚物通过肠壁吸收并进入系统循环(体循环)。在该实施方案中,特别优选的是,口服给药的共聚物具有不超过1000道尔顿的分子量,例如在400至 800道尔顿的范围内的分子量。我们已经发现这种分子量的共聚物在口服给药时被运送到系统循环中以提供肠胃外病毒感染的治疗。对于在该范围内的较低分子量的共聚物而言,通过肠壁吸收的共聚物的比例通常较大。

[0042] 共聚物可作为气雾剂(气溶胶)、凝胶、局部泡沫或软膏施用或者浸渍到用于施用至皮肤或粘膜的敷料中以经皮或穿粘膜递送。共聚物可经由气雾剂等作为吸入剂施用。

[0043] 在进一步的实施方案中,共聚物通过经皮递送由可包括用于聚合物的渗透促进剂的组合物给药。贴片(patch)、微针(显微针)或类似装置可用于增强经皮递送。

[0044] 本发明的组合物还可包含佐剂(辅剂),例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通

过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等可确保防止微生物的作用。包括调节张度(tonicity)的试剂例如糖、氯化钠等也可为合乎需要的。可注射药物形式的延长(长期)吸收可通过包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0045] 在另一优选的实施方案中,药物组合物呈适于皮下(s.c.)给药的形式。

[0046] 适于口服给药的药物剂型包括片剂(包衣的或未包衣的)、胶囊(硬壳或软壳)、囊片(小胶囊)、丸剂、锭剂、糖浆剂、溶液、散剂(粉末)、颗粒剂、酏剂和混悬液、舌下片剂、包药干糊片(糯米纸囊剂,wafer)或贴片例如口腔贴片。

[0047] 由于所述共聚物是可溶的且在1至14的整个pH范围内保持可溶的,其可以含水组合物配制。共聚物可以具有已知的药学上可接受的载体和赋形剂的组合物给药;然而,含水制剂提供显著的优点。取决于待治疗的特定病毒和给药方式,组合物可包括宽范围的浓度的共聚物。在一组实施方案中,含水药物组合物中的共聚物的浓度在组合物的0.01重量%至20重量%的范围内。因此,在一组优选实施方案中,共聚物作为水溶液给药。

[0048] 组合物可以片剂、囊片、糖浆剂或液体的形式口服给药,并且口服给药的剂量将取决于病毒的严重性和类型,但可在例如1mg-1000mg/千克体重/天,例如10mg-500mg/千克体重/天的范围内。

[0049] 由于被认为与其活性有关的作用机理,本文中的丙烯醛共聚物针对肠胃外疾病的活性的发现是预料不到的。专利No.US 6723336使用添加的蛋白质来完全抑制(猝灭)丙烯醛-聚合物的抗微生物活性。现有技术的焦点在于通过如下在胃肠道中治疗感染:口服给药具有足够高的分子量的丙烯醛-聚合物,以防止其跨肠的迁移。事实上,丙烯醛单体的反应性使得迄今为止尚未认为以下是可行的:使丙烯醛聚合以得到具有不超过约1,000道尔顿的分子量的产物。由于其潜在的毒性(包括与血清蛋白的反应),还已经刻意避免针对肠胃外疾病的给药。

[0050] 在聚丙烯醛的现有技术制备中,认为聚合机理是阴离子的,并且需要使水含量最小化以避免阴离子的猝灭(抑制,quenching)或产物的离解。我们已经发现,通过控制单体的比例,用水稀释丙烯醛和聚乙二醇,并且与现有技术相比,将pH保持在较低的范围内(维持pH不超过12.0,并且优选地在12.0-7.0的pH范围内),可将分子量限制为1000道尔顿或更低。也就是说,为了实现新的聚合机理,pH范围降低两个完整的pH单位,或比现有技术聚合中使用的羟基离子浓度低100倍。

[0051] 在一组实施方案中,本发明提供制备用于治疗肠胃外病毒疾病的共聚物的方法,该方法包括在包含(优选地分子量200至600道尔顿的)聚乙二醇的水溶液中的丙烯醛的碱催化聚合,其中聚亚烷基二醇/丙烯醛的比例为至少4、优选地至少8、更优选地至少10,并且水以组合物的至少20重量%的量存在。

[0052] 在一组优选实施方案中,所述方法包括将丙烯醛的水溶液(优选地具有不超过50%重量/重量的丙烯醛浓度)加入到包括至少10%重量/重量的水并具有不超过12.0的pH、优选地不超过pH 11的聚乙二醇的水溶液中。

[0053] 在还更优选的实施方案中,将丙烯醛作为水溶液加入到pH 9至11的聚亚烷基二醇的水溶液中。

[0054] 总体来说,我们已发现,在所述方法中使用的含水体系中,相对低的pH例如不超过12.0、如不超过11.5(优选地不超过11)提供相对于现有技术的用于聚合丙烯醛的最高达

pH 14的pH范围的显著优点。如在现有技术中对于延长的时间使用的相对高的pH提供氧化并引入改善溶解度的羧基。相比之下,我们发现,在本发明的方法中提供溶解度,而无需在相对高的pH 下的延长的加热,且结果,羧基和/或羧基含量非常低,典型地共聚物的 0-10%。最小的羧基或羧基含量被认为使与混杂(各种)来源的蛋白质的不希望的反应或对酸性和阴离子性的病菌(胚芽)的包衣的排斥两者最小化,从而在两种情况下增强抗生素作用。

[0055] 不希望受理论束缚,据认为在本发明的方法中,丙烯醛在碱的存在下的聚合在如此大量的水的存在下不是通过完全阴离子机理进行的,而是具有显著的自由基聚合机理。

[0056] 该结论得到以下事实的支持:(a)由于双自由基氧的存在而促进聚合,(b) 作为溶剂的主要组分的水是阴离子淬灭性的,(c) 聚合在环境温度和更高下是显著的,快速、放热的,并被典型的自由基抑制剂氢醌抑制,所有观察代表自由基聚合,而不是离子聚合(Florey;Odian)。再次,不希望受理论束缚,认为,反应机理涉及在氧和羟基离子之间形成引发剂自由基(引发基),随后自由基转移到聚乙二醇溶剂,由此引发聚合;然后涉及溶剂-羟基的溶剂转移终止以限制在与共聚物内的羧基相邻的活性自由基位点处聚合的丙烯醛残基的数量。

[0057] 认为聚亚烷基二醇低聚物提供链转移和/或链终止,由此(与含水稀释一起)限制与总羟基含量成正比的分子量。

[0058] 概括地说,合成的核心策略(与现有技术US 9119394的不同)是使所得共聚产物的两个链段通过如下机理连接,该机理被认为(不希望被理论束缚) 通过自由基机理而不是通过亲核迈克尔加成来进行。这通过如下实现:使传播(propagating)自由基活性中心的形成最大化(使自由基氧的存在最大化),和最小化pH、最小化用于亲核迈克尔加成的氢离子缺乏的活性中心的形成。

[0059] 通过HPLC显示活性共聚物与氨基酸模型(模范)半胱氨酸(巯基)或苏氨酸(羟基)的任一种具有可忽略的(无关重要的)反应,并且对于靶细胞膜的稳定性,共聚物的抗疾病活性可单独地归因于在共聚物内的所鉴别的邻近碳处的非共价的物理疏水效应。因此,现有技术中依靠改性聚丙烯醛中的羧基与蛋白质的化学反应的作用机理不被认为是造成本发明共聚物的抗病毒活性的原因。

[0060] 与教导丙烯醛聚合物与蛋白质的破坏性的反应性的现有技术相比,我们已发现所述共聚物的抗病毒活性不因蛋白质的存在而被显著降低。我们已发现,所述共聚物的抗病毒活性足够快以超过与导致毒性的任何和蛋白质的血管内化学反应或与体内清除过程竞争。在现有技术的观点中,一贯地,这些观察和结论与如本文中的合成和然后肠胃外使用所述共聚物(例如实施例1 的共聚物)的进展是反直觉的。

[0061] 本文中公开的共聚物呈现出比来自现有技术的丙烯醛聚合物毒性低得多的血管内挑战。我们已经发现,可制备具有低的多分散性的共聚物,并且优选地小于5、更优选地小于2,以及最优选地小于1.5、还更优选地小于1.2 的低的多分散性增强共聚物的性能,特别地,其中分子量小于1000,例如 400至1000道尔顿、更优选地400至800道尔顿例如400-600道尔顿。本发明的聚合物可作为具有约1的多分散指数的窄对称且单一的聚合物制备。先前描述的丙烯醛聚合物通常包含较高的多分散性,或在W0 09/059350的实施例6的聚合物的情况下,在非常灵敏的UV检测中,包含约1%和约8倍多的各种各样的较低分子量的聚合物/

残基,这是从折射率检测不易检测到的。本文中的共聚物可定量地、以多分散性接近单一的窄分子量分布形成。与现有技术的经高度加热和自氧化的丙烯醛-聚合物相比,所述共聚物包含少得多的潜在毒性的污染物(副产物和原料,包括残留的催泪的丙烯醛)。在本发明的优选的实施方案中,羧基含量和在利用碱催化的制备中使用的pH 两者处于前所未有的最低水平,并且这两个因素可用于使如下最小化:副产物及它们的潜在毒性,特别地来自与羧基的坎尼扎罗(Cannizarro)反应,并且该现有技术已被发现在丙烯-聚合物中是异常快速的。

[0062] 已经发现该共聚物具有活性的(积极的)抗病毒活性。这代表新的、普遍且成功的治疗受试者中的病毒感染的方法。

[0063] 除丙烯醛单体之外,其它单体例如丙烯酸、丙烯酰胺、丙烯腈、氯乙烯、苯乙烯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、乙酸乙烯酯、乙烯基吡啶和乙烯基吡咯烷酮可在包括聚亚烷基二醇低聚物链段和丙烯醛衍生的链段的共聚物的制备中用作另外的单体,如本文中所述的。另外的单体可以未不利于共聚物的抗病毒活性的量存在。可选择单体的比例以保持共聚物的水溶性,并且记住单体反应性,可通过相对单体浓度和反应条件来控制另外的单体的引入。通常,优选的是,另外的单体构成共聚物的单体残基的不超过15摩尔%,优选地不超过10摩尔%,且最优选地共聚物仅由聚亚烷基二醇和丙烯醛单体残基组成。

[0064] 作为本发明的共聚物的特征的疏水机理是通过提供对以下的控制的工艺步骤实现的:分子量;对与病毒体(病毒粒子)和感染病毒的细胞的抗病毒反应的亲和力;在蛋白质的存在下的增强的抗病毒活性;以及共聚物中的羧基和羧基含量的最小化。

[0065] 本文中提供的共聚物抗病毒通常提供针对各种类型的病毒的效力,无论是对其它化学疗法耐受还是不耐受的。

[0066] 在一组优选实施方案中,制备本发明的共聚物的方法包括以下步骤:

[0067] 提供聚亚烷基二醇(优选地分子量在200-600道尔顿的范围内的聚乙二醇)的略微碱性(优选地pH不超过12.0;更优选地pH 9-11)的水溶液;

[0068] 剧烈地搅拌略微碱性的溶液以夹带(携带)空气;(优选地在例如至少2分钟、更优选地至少5分钟的时间段内缓慢地)将丙烯醛作为浓度不超过丙烯醛水溶液(通常包括防腐剂(保存剂))的50%重量/重量的水溶液添加;

[0069] 保持反应温度在10°C至40°C的范围内;

[0070] 以及一旦丙烯醛单体被耗尽(消耗),加入酸以提供小于9且优选地不大于8的pH。

[0071] 得到的共聚物的分子量通过聚亚烷基二醇的分子量来控制,并且与其羟基浓度成正比。(聚合在环境温度下开始,然后随着放热聚合略微地上升,这来自防腐剂的黄色的出现和然后消失(进展)来看是明显的。)

[0072] 在反应过程中,优选地持续搅拌,并且仅作为必需的使pH保持略微碱性(优选地pH不超过12.0,更优选地pH 9至11)。更多的碱的添加和其浓度被最小化以减少降解/副反应并减少产物中的羧基或羧基形成。

[0073] 最后,溶液的pH值可降低。在一组优选实施方案中,通过添加酸将pH 调节至接近中性。丙烯醛的极度刺激性气味在共聚物产物中不再是明显的,其通常以至少99%的产率形成。

[0074] 得到的丙烯醛-共聚物典型地具有在250至1000道尔顿(例如300至1000 道尔顿、

400至1000道尔顿或400至800道尔顿)的范围内的分子量。共聚物没有将由聚丙烯醛的任何内容物(含量)预料到的混浊性。丙烯醛衍生的链段和聚乙二醇低聚物链段的含量及其之间的结合以前面提出的方式通过如下证实:所有共聚物的尺寸分离-HPLC,各自具有单一的、窄的、对称的、占优势的和不可分辨的(不可解析的,不可分解的)质量峰,而没有指示残留的丙烯醛单体或实质的聚丙烯醛;此外,与如果链段之间的缔合仅仅是物理相互吸附时的可分辨的(可解析的,可分解的)变化以及预期相反,来自实施例2的共聚物MW1000在与在所有共聚物的原始制备中使用的那些相当的碱性条件下用聚乙二醇MW200平衡后,在尺寸分离-HPLC中没有变化,抗病毒活性也没有变化(参见实施例2)。

[0075] 在共聚物的制备中使用的丙烯醛:聚乙二醇的重量比优选地在1:4和 1:40之间,更优选地在1:8和1:20之间。

[0076] 优选的碱是碱金属氢氧化物的水溶液;更优选地,碱金属氢氧化物为氢氧化钠。

[0077] 优选的酸是稀盐酸,尽管乙酸对于pH缓冲的目的是有用的。

[0078] 优选的是,将丙烯醛加入到聚亚烷基二醇的水溶液中花费约10分钟,并且反应至完成(完全)一般花费约40分钟,且优选地不超过90分钟。

[0079] 典型地,我们已经发现50分钟的反应时间适于获得向所述共聚物产物的基本上完全转化。

[0080] 丙烯醛优选地作为水溶液加入到含水聚亚烷基二醇,更优选地以在 10-30重量%的范围内的丙烯醛单体的浓度,基于待加入聚亚烷基二醇水溶液中的丙烯醛水溶液的重量。

[0081] 得到的共聚物具有小于10%、更优选地小于5%,并且还更优选0%的反应性羧基含量(加上任何羧基含量)。

[0082] 丙烯醛溶液通常包含抑制剂氢醌,例如不超过0.5%并且典型地 0.01-0.5%,以及更优选地0.1%重量/重量。

[0083] 对于本领域技术人员明晰的是,本文中的共聚物可被包括在多种组合物和物理形式中。具体地,组合物和体内药学使用方法将是明晰的,其利用共聚物的较慢的清除率。另外,明晰的是,可在药理学上利用分子量的变化以调节穿过膜、组织和器官的穿透率(速率)、以及所得的在人体或动物体内的吸收或分布;在这种情况下,较低分子量的共聚物如例如300-800道尔顿比超过1000道尔顿分子量的共聚物更快地被吸收和分布。

[0084] 鉴于本文中的结果,也可想到的是添加蛋白质、特别地肉汤(broth)以提高共聚物的使用中的抗病毒活性。

[0085] 本文中的主题产品是水溶性的,并且可通过医学中已知的常用方法向人/动物给药(特别地通过口或注射),以及可能够以任何实践性的药物方式,单独地或以组合物的形式,在器官和组织内、或与人或动物接触地或在其体内血管系统中使用。当向人和动物给药所述共聚物时,它们可以其本身或作为包含例如与药学上可接受的载体组合的0.1%至99.5%(更优选地0.5%至90%)的活性成分的药物组合物给药。

[0086] 组合物可为包括药理学有效量的共聚物的物质的固体、溶液、凝胶、乳剂或混悬液。本发明的化合物可与一种或多种其它化学治疗剂组合使用。本发明化合物的剂量可针对任何药物-药物反应进行调整。在一项实施方式中,所述化学治疗剂选自:有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂如CAMPTOSAR(伊立替康)、生

物反应调节剂、抗激素药、抗血管生成剂(血管生成抑制剂)如MMP-2、MMP-9和COX-2抑制剂、抗雄激素物质、铂配位络合物(顺铂等)、取代的脲如羟基脲;甲基肼衍生物,例如丙卡巴肼;肾上腺皮质抑制剂例如米托坦、氨鲁米特、激素和激素拮抗剂例如肾上腺皮质类固醇(例如泼尼松)、孕激素(黄体酮)(例如己酸羟孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚)、抗雌激素药例如他莫昔芬、雄激素例如丙酸睾酮、和芳香酶抑制剂例如阿那曲唑和AROMASIN(依西美坦)。

[0087] 所述共聚物及其组合物对病毒具有实质活性。

[0088] 不希望受理论束缚,作用机理提供以下优点:

[0089] ●本发明描述的共聚物取决于共聚物与病变细胞的外膜的蛋白质之间的非特异性疏水反应—细胞的外膜的疏水性越大,反应越强并且代谢活性削弱细胞,这增加内渗透压一大于周围的细胞中的;

[0090] ●所述反应削弱所述膜。

[0091] 因此,具有较大的内部代谢活性的细胞将具有较大的内部渗透压和较高的在外膜上的向外压力,由所述共聚物的作用获得相当大的对破裂的敏感性。

[0092] 该假设已被投入测试并且被证明是成功的。此外,它是普遍的,即非特异性的,且可应用于含有所有类型的病毒的细胞。

[0093] 对于本领域技术人员明晰的是,尤其含有病毒的细胞的代谢活性、渗透压和膜张力将大于周围细胞中的,并且外膜将对本发明所述的聚合物更敏感。

[0094] 本领域技术人员还知晓,细菌感染可导致癌症,由于引起慢性炎症的感染或释放癌症诱导代谢物的感染(导致癌症的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)是众所周知的实例)。因此,由于已经发现在本发明中描述的共聚物作为针对细菌的抗生素药物是实用的,因此如这里所述的其病毒和癌症活性应处于有利地位并且可能是协同的。另外,由于病毒感染(特别地通过流感病毒的病毒感染)经常也与细菌感染相关,再次,在一种药物中的同时的抗病毒和抗生素性质有利地是协同的。

[0095] 还明晰的是,由于实施例1具有相同或相似的所得的针对细菌的抗菌活性的程度,无论突变是否发生以形成它的超级细菌/耐受性形式,这里出现对形式的相同的不敏感性,即无论病毒是否处于超级(耐受性)形式(通常通过突变而进化),出现相同的倾向。

[0096] 还明晰的是,可考虑将除这里描述的那些以外的其它抗生素(抗菌药)、抗病毒药添加到共聚物制剂中,以实现加成的药物作用。

[0097] 现在将参照以下实施例进一步描述本发明。将理解,这些实施例是为了说明本发明而提供的,并且它们绝不限制本发明的范围。

[0098] 实施例

[0099] 来自实施例1和比较例1的共聚物具有抗病毒特性。已经发现来自实施例1的较低的MV500(在体内总是)比丙烯醛和PEG的较高分子量的聚合物更有效。

[0100] 羰基含量的评估

[0101] 本文中报道的羰基含量的评估是基于已建立的方法(Peters 1962; Melrose 2009)。一式两份地,将共聚物(1g)的水样品溶液称重至0.01g的精度—加入水(9g),且然后如适当地通过添加0.01M盐酸或0.01M氢氧化钠水溶液将溶液调节至pH 6.00。

[0102] 用0.01M氢氧化钠水溶液将1%的盐酸羟胺溶液(50mL)调至pH 6.00。

[0103] 将上述共聚物和试剂的溶液混合,并在室温下放置30分钟;然后将反应物用0.01M

氢氧化钠水溶液 (VmL) 反滴定 (回滴定) 至 pH 6.00。

[0104] 因此,原始样品溶液 (W g) 的重量/重量% 羰基含量作为丙烯醛评估,等于:  $V \times 0.10 \times 5.6 / W$ 。

[0105] 通过HPLC的共聚物的定量分析

[0106] 高效液相色谱法 (HPLC) 在Shimadzu Prominence设备上同时使用折射率和UV (268nm) 检测器进行;对于通过尺寸排阻的分离,柱是Waters Hydrogel 120或Waters Hydrogel 250的一种或两种(串联)。

[0107] 通过平均MW范围200至10,000道尔顿的Sigma-Aldrich聚乙二醇的排阻时间对log MW的直线图进行MW校准。因此,从测定方法看出,丙烯醛共聚物的分子量(其总是在此基础上测定并在本文中报道)始终是指数均分子量(校正至最接近的500道尔顿)。

[0108] 用水-溶剂 (0.6mL至1.0mL/分钟) 对溶质的水溶液 (0.020mL; 0.4% 重量/重量) 进行分离。

[0109] 通过质谱法的共聚物的定量分析

[0110] 采用两种独立的技术(蒙Shimadzu Scientific Instruments (Oceania) Pty Ltd 允许)来进行:

[0111] ●直接注入质谱仪中,没有在先的色谱法;

[0112] ●质谱法,在在先的色谱法之后。

[0113] 设备;实验条件为:Nexera UHPLC Binary High Pressure Gradient 和 LCMS-8060(在Q3扫描下运行以模拟单个四极质谱法;流动相均等地分配在水中的0.02% 甲酸和在乙腈中的0.02% 甲酸,以及柱Phemonenex Aeris XB C18 300A 150x2.1mm)。

[0114] 聚合物溶液的定量UV/可见光分析

[0115] 用于分析的溶液通过如下制备:将共聚物 (250mg) 在水 (20g) 和然后如果可应用的化学计量摩尔当量的反应物中稀释;然后在Shimadzu UVmini-1240 设备上取UV光谱之前用水稀释1:9。

[0116] 实施例1和对比例1

[0117] 实施例1描述了分子量约500道尔顿的本发明的共聚物的制备,其包括聚丙烯醛低聚物链段和分子量200道尔顿的聚乙二醇低聚物链段。所述共聚物有目的地由在pH 12.0的制备说明,因为这是对于如本文中所述的在不引入不希望的副反应水平的情况下可靠的建议的最高pH。所述共聚物的抗病毒活性与分子量约2500道尔顿的对于共聚物相比总体上较高。

[0118] 实施例1-MW约500道尔顿的共聚物的制备

[0119] 在10分钟内将新鲜蒸馏的丙烯醛 (5g; 用0.1% 重量/重量氢醌抑制) 在水 (20g) 中的溶液缓慢加入到水 (20g) 和聚乙二醇 (60g; MW200) 的溶液(其已通过加入1M氢氧化钠水溶液使其达到pH 12) 中;在10分钟期间,氧化的氢醌的黄色迅速出现,然后消失。在此过程中,持续且剧烈地搅拌组合物以提供与空气的丰富接触。发生放热和快速的聚合,并且反应物的温度保持在约 25°C 和35°C 之间。

[0120] 在另外的50分钟后,通过加入1M盐酸水溶液将清澈的溶液调节至pH 7.5;产物是清澈的、几乎无色的(非常淡的黄色的)溶液。对样品进行的所有测试和本文中的结果都是在没有任何纯化并且已经在7°C下储存4或6年的情况下对样品进行的;这被认为是产物的

高纯度和高稳定性的指示。

[0121] 产物的UV-可见光200-600nM光谱在200-300nM区域的远边缘处具有实质吸收。这与可忽略的与羰基共轭的不饱和的含量一致,且这可与对迈克尔反应的倾向性相关。

[0122] HPLC表明聚合产率为99-100%重量/重量,并且任何残留的丙烯醛单体小于1ppm重量/重量;MW为约500道尔顿。质谱法显示312的碱峰,并且表明共聚物包括与两个2-丙醛(ex丙烯醛)残基线性共价连接的五个氧乙烯(ex PEG)残基。

[0123] 当测试低到pH 1(并且最高达pH 14)时,共聚物保持为可溶的。该共聚物具有约0-10%重量/重量的羰基含量或羧基含量。

[0124] 产物在HPLC中的单峰保持为窄的且无法分辨的,无论是在水中在1ml/分钟下通过Waters Hydrogel 120、Waters Hydrogel 250单独地还是以交替顺序的串联方式进行HPLC。

[0125] 当在pH 8或pH 10下进行在聚合时出现相同的制备结果,并且始终具有完全相同的针对大肠杆菌(E.coli)的体外微生物率结果,以及相同的HPLC结果(除pH 8以外)给出具有总量小于1%重量/重量的表示丙烯醛的二聚物或低聚物的材料的量的产物;对于所有产物,体内微生物率测试是相同的。

[0126] 实施例1的制备被申请人实验室的另一成员独立地在8-12之间的不同pH下重复多次(包括分开地pH8,pH10和pH12),并给出相同的聚合结果、HPLC和针对大肠杆菌的体外率测试结果。

[0127] 对比例1-分子量约2500道尔顿的共聚物

[0128] 该例描述了包括2000的分子量的聚乙二醇链段的较高分子量(2500道尔顿)的非本发明的共聚物的制备。

[0129] 在10分钟内将新鲜蒸馏的丙烯醛(5g;用0.1%重量/重量氢醌抑制)在水(20g)中的溶液缓慢加入到水(30g)和聚乙二醇(20g;MW 2,000)的溶液(其已通过加入1M氢氧化钠水溶液使其达到pH 11)中;在该时期期间,氧化的氢醌的黄色迅速出现,然后消失。在加入之前和加入过程中剧烈地机械搅拌组合物以提供与空气的丰富接触。发生放热和快速的聚合,并且温度保持在25 °C和35°C之间。

[0130] 在搅拌额外的50分钟后,通过加入1M盐酸水溶液将清澈的溶液调节至pH 7.5;产物是清澈的、几乎无色的(非常淡的黄色的)溶液。

[0131] 值得注意的是,与现有技术中的所有聚丙烯醛产物一样,由于相对高分子量的产物对通过琼脂扩散的抗性,因而本文中未使用微生物分析的琼脂扩散技术。

[0132] 对样品进行的所有测试及记录在本文中的结果都是在没有任何纯化并且已经在7 °C下储存4至6年的情况下对样品进行的;这被认为是产物的高纯度和高稳定性的指示。

[0133] 产物的UV-可见光200-600nM光谱仅在200-300nM区域的远边缘处具有实质吸收。

[0134] HPLC表明聚合产率为99-100%重量/重量,并且任何残留的丙烯醛单体小于1ppm重量/重量;MW为约2,500道尔顿。当测试低到pH 1(并且最高达pH 14)时,聚合物保持为可溶的。该聚合物具有约0-10%重量/重量的羰基含量。

[0135] 产物在HPLC中的单峰保持为窄的且无法分辨的,无论是在水中在1ml/分钟下通过Waters Hydrogel 120、Waters Hydrogel 250单独地还是以交替顺序的串联方式进行HPLC。

[0136] 基于本文中所述的聚合机理,可计算出,在聚合中添加的丙烯醛单体的当量(相对于聚乙二醇的当量)在比较例1的情况下大于实施例1,因此任何形成任何不溶性聚丙烯醛的倾向在前者中较大,但是未观察到,即使在70 °C/6年静置后。用稀盐酸将丙烯醛-聚合物的稀溶液逐步地酸化至pH 2.5、且用稀氢氧化钠溶液进行的反滴定证明不存在羧基( $pK_a = 4.5$ )。

[0137] 两种共聚物在8°C下四年后仍然是稳定的,并且对模拟的pH条件在人胃中的停留时间期间是稳定的。

[0138] 所有观察是在pH 6.5和7.0之间进行的,这被非常自然地实现,并且避免与来自不同缓冲液的各种添加的盐的可能的相互作用的复杂性。

[0139] 实施例2

[0140] 该实施例说明包括分子量600道尔顿的聚乙二醇低聚物链段的约1000 道尔顿的分子量的本发明共聚物的制备。

[0141] 在10分钟内将新鲜蒸馏的丙烯醛(5g;用0.1%重量/重量氢醌抑制)在水(20g)中的溶液缓慢加入到水(20g)和聚乙二醇(60g;MW 600)的溶液(其已通过加入1M氢氧化钠水溶液使其达到pH 10)中;在加入丙烯醛之前和加入丙烯醛的过程中剧烈地搅拌组合物以夹带空气并提供与空气的丰富接触,产生放热和快速的聚合,并且温度保持在约25°C和35°C之间。在加入的开始后,氧化的氢醌的黄色迅速出现,然后消失,产生清澈的溶液。

[0142] 在另外的50分钟后,通过加入1M盐酸水溶液将清澈的溶液调节至pH 7-8;产品是清澈的、几乎无色的(非常淡的黄色的)溶液。(产物的UV-可见光200-600nM光谱仅在200-300nM区域的远边缘处具有实质吸收。)

[0143] HPLC表明聚合产率为99-100%重量/重量,并且任何残留的单体小于 1ppm重量/重量;MW为约1,000道尔顿。当测试低到pH 1(并且最高达pH 14)时,聚合物保持为可溶的。该聚合物具有约0-10%重量/重量的羧基含量。

[0144] 将聚乙二醇MW 200(120mg)加入到共聚物(383mg)中,然后加入一滴1M 氢氧化钠使pH达到11;在环境温度下放置2小时后,用一滴1M盐酸将pH 调节至7.5,并放置3天。作为该处理的结果,共聚物的HPLC和抗病毒活性都没有改变。

[0145] 实施例3

[0146] 部分1实施例1对甲型流感TX/36/91(H1N1)的体外抗病毒评价,首先,在CPE测定(和抗生素的细胞毒性)中,和其次,在PRNT研究中。

[0147] 实施例1的体外活性的以下两个实例分别代表当作用是预防性的/在细胞内和作用是治愈性的/在细胞外时的情况。

[0148] CPE-细胞病变效应测定-图1

[0149] ●将MDCK细胞接种到96孔板中并温育过夜

[0150] ●第二天,将细胞用IFV A/TX/36/91在0.01的MOI下在35°C下感染24 小时

[0151] ●第三天,在培养基(介质)中制备实施例1的系列稀释液(从 0.1% (1000ppm) 开始,以2倍稀释)

[0152] ●从细胞中除去接种物,并将系列稀释液在35°C下加入细胞1小时

[0153] ●除去化合物稀释液并通过ELISA评估细胞的病毒抗原。

[0154] 细胞毒性测定

- [0155] ●将MDCK细胞接种到黑壁的96孔板中并温育过夜
- [0156] ●第二天,从细胞中除去生长培养基并加入温育培养基
- [0157] ●第三天,如对于CEP测定所述地,制备实施例1的系列稀释液
- [0158] ●从细胞中抽吸出培养基并在35°C下加入化合物稀释液1小时。仅用培养基温育的细胞用于0%细胞毒性数据
- [0159] ●抽吸出培养基并在第5天用Promega's CelltiterGlo试剂盒裂解细胞以评估ATP含量
- [0160] ●得到的萤光素酶发光被量化并用于使用4-PL曲线拟合来计算CC50。
- [0161] PRNA-噬斑(蚀斑)减少中和测定(和抗生素的细胞毒性)-图2
- [0162] ●将Vero细胞接种到24孔板中并温育过夜
- [0163] ●第二天,在培养基中制备实施例1的系列稀释液(从0.1% (1000ppm)开始,以2倍稀释)和对照抗体
- [0164] ●将系列稀释液用200PFU的IFV A/TX/36/91在35°C下温育2小时
- [0165] ●之后在35°C下将接种物加入细胞1小时
- [0166] ●除去接种物并将板温育5天
- [0167] ●通过免疫噬斑测定确定病毒滴度(病毒价)
- [0168] 细胞毒性测定
- [0169] ●将Vero细胞接种到黑壁的96孔板中并温育过夜
- [0170] ●第二天,如对于PRNT测定所述地,制备实施例1的系列稀释液
- [0171] ●从细胞中抽吸出生长培养基加入化合物稀释液。仅用培养基温育的细胞用于0%细胞毒性数据
- [0172] ●1小时后除去化合物并加入新鲜的培养基,然后将板置于35°C下5天
- [0173] ●抽吸出培养基并在第5天用Promega's CelltiterGlo试剂盒裂解细胞以评估ATP含量
- [0174] ●得到的萤光素酶发光被量化并用于使用4-PL曲线拟合来计算CC50。结果示于表1中。
- [0175] 表1

数据				
配方 1(式 1) [%]	PRNT50		EC50	
	%抑制	SD	%抑制	SD
0.1	100.0	0.0	62.2	8.9
0.05	99.4	0.9	57.9	10.5
0.025	88.9	0.0	45.1	7.9
0.0125	68.6	14.8	51.2	1.1
0.00625	56.3	9.6	47.5	6.9
0.003125	31.1	12.2	42.2	2.0
0.001563	8.2	11.5		
0.000781	7.7	7.0		
0.000391	13.2	13.1		
0.000195	0.0	0.0		

[0176] [0177] 在如配方1(式1)所示的共聚物和MDCK(犬)细胞或Vero(猴)细胞之间没有观察到细胞毒性。

[0178] [0179] 实施例4-体内抗病毒评估 该实施例检验实施例1的共聚物在控制病毒感染、特别地甲型流感 TX/36/91 (H1N1) 方面的体内活性。

[0180] 将10只小鼠的治疗组“组1”与10只小鼠的未治疗组进行比较,以检验对病毒感染的反应。

[0181] 组1(通过鼻内给药的静脉内感染的;随后使用实施例1(70mg/kg)在最初5天的每一天期间以140mg/kg小鼠的剂量率治疗)。组2(通过鼻内给药的静脉内感染;未治疗)。4天后,小鼠开始出现疾病症状。未存活的小鼠,一只死亡,其余的被安乐死—作为具有(a)体重减少20%或(b)由于明显的疾病而丧失的活动性的结果。

[0182] [0183] 生存率示于表2中。 表2

天	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
组 1	100	100	100	100	90	40	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
组 2	100	100	100	100	10	10	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	%	%	%	%	%	%										

[0184] [0185] 结果显示在图3所示的图中。

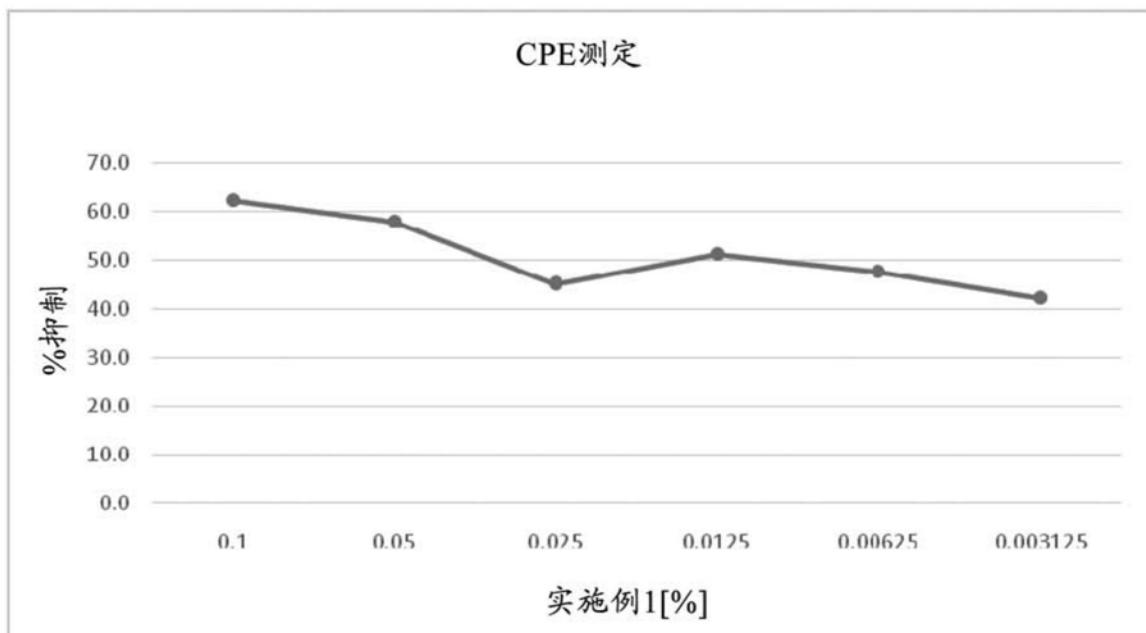


图1

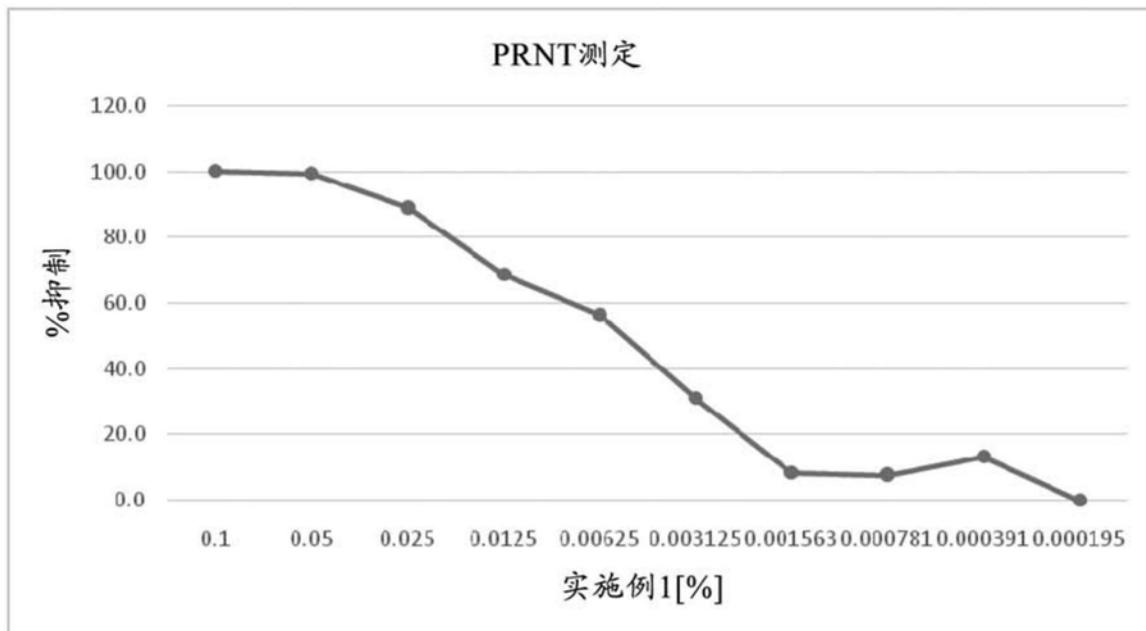


图2

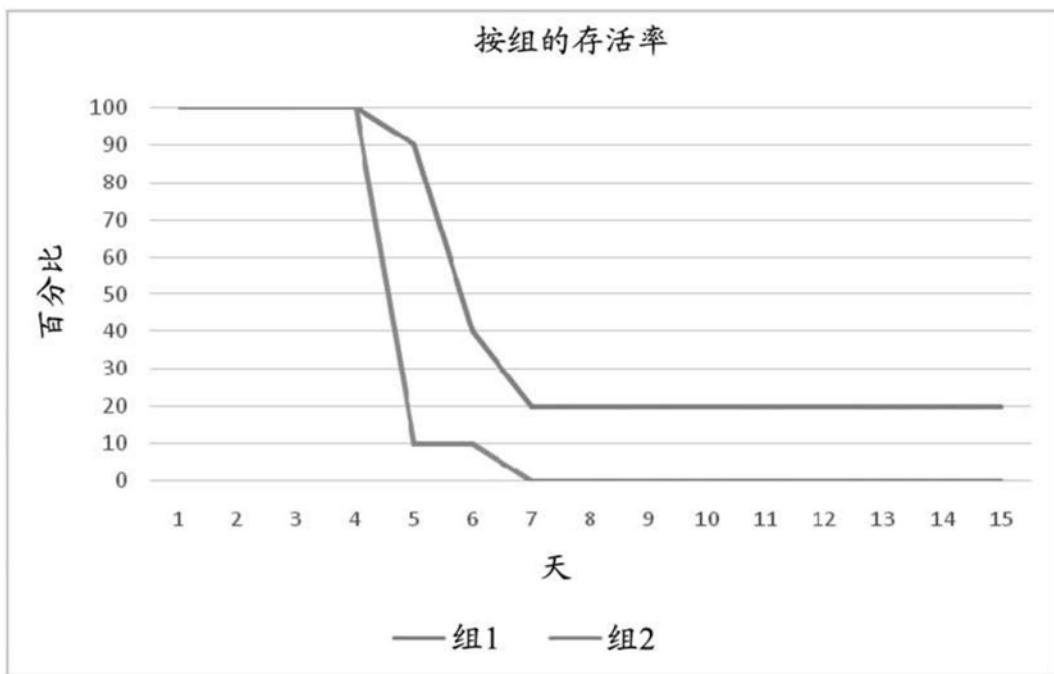


图3