

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/70

A61K 31/675 A61K 31/52

A61P 31/14



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99814147.X

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1173705C

[22] 申请日 1999.11.2 [21] 申请号 99814147.X

[30] 优先权

[32] 1998.11.2 [33] US [31] 60/106,664

[86] 国际申请 PCT/US1999/025673 1999.11.2

[87] 国际公布 WO2000/025797 英 2000.5.11

[85] 进入国家阶段日期 2001.6.6

[71] 专利权人 三角药物公司

地址 美国北卡罗来纳州

[72] 发明人 菲利普·A·弗曼

乔治·R·佩因特 戴维·巴里

弗兰克·鲁索

审查员 高宁星

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 2 页 说明书 20 页

[54] 发明名称 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环在制药中的应用及含有该化合物的药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及治疗人乙型肝炎病毒感染的方法，该方法包括以联合方式或交替方式给以协同有效量的已知的抗乙肝活性药剂。具体讲，本发明涉及治疗乙型肝炎病毒感染的方法，包括以联合形式或交替形式给以 FTC 和喷昔洛韦、泛昔洛韦或 Bis-POM-PMEA；此外，本发明涉及治疗乙型肝炎病毒感染的方法，包括以联合形式或交替形式给以 L-FMAU 和 DAPD、喷昔洛韦或 Bis-POM-PMEA；本发明还涉及治疗乙型肝炎病毒感染的方法，包括以联合形式或交替形式给以 DAPD 和 Bis-POM-PMEA。

ISSN 1008-4274

- 5 1. 协同有效量的 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环或其可药用的盐、酯或前药和有效量的第二种抗乙肝剂以联合形式或交替形式用于制备治疗或预防人乙肝病毒的药物应用，所述第二种抗乙肝剂选自喷昔洛韦、泛昔洛韦和 9-[2-(磷酰甲氧基)乙基]腺嘌呤或其可药用的盐、酯或前药。
- 10 2. 权利要求 1 的应用，其中 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环为(-)-光学异构体形式。
- 15 3. 权利要求 2 的应用，其中第二种抗乙肝剂为喷昔洛韦或其可药用的盐、酯或前药。
- 20 4. 权利要求 2 的应用，其中第二种抗乙肝剂为泛昔洛韦或其可药用的盐、酯或前药。
- 25 5. 权利要求 2 的应用，其中第二种抗乙肝剂为 9-[2-(磷酰甲氧基)乙基]腺嘌呤或其可药用的盐、酯或前药。
- 30 6. 一种用于治疗或预防人乙肝病毒的药物组合物，包括和有效量的第二种抗乙肝剂协同联合的有效量的 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环或其可药用的盐、酯或前药，所述第二种抗乙肝剂选自喷昔洛韦、泛昔洛韦和 9-[2-(磷酰甲氧基)乙基]腺嘌呤。
7. 权利要求 6 的组合物，其中 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环为(-)-光学异构体形式。
8. 权利要求 7 的组合物，其中第二种抗乙肝剂为喷昔洛韦或其可药用的盐、酯或前药。

9. 权利要求 8 的组合物，其中第二种抗乙肝剂为泛昔洛韦或其可药用的盐、酯或前药。

5 10. 权利要求 7 的组合物，其中第二种抗乙肝剂为 9-[2-(磷酸甲氧基)乙基]腺嘌呤或其可药用的盐、酯或前药。

β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1, 3-噁唑戊环在制药中的应用及含有该化合物的药物组合物

5 本发明属于治疗乙型肝炎病毒(也称作"HBV")方法的领域, 该方法包括对需要治疗的宿主用已知的具有抗乙肝活性的核苷进行有效的联合给药。

10 HBV 是人类仅次于烟草的致癌原因, HBV 致癌的机理尚不清楚, 尽管有人假定, 它可以直接引起肿瘤的发展, 或者通过慢性炎症、肝硬化以及与感染相关的细胞再生, 间接地引起肿瘤的发展。

15 乙肝病毒已经达到在全世界流行的程度。在经过了宿主未觉察到感染的 2-3 个月潜伏期后, HBV 感染可以导致急性肝炎和肝损伤, 引起腹部疼痛、黄疸和某些酶的血液浓度升高。HBV 可以引起暴发性肝炎, 这是一种快速进行性的、常常是致命的疾病形式, 其中大块的肝脏被破坏。

20 患者一般从急性肝炎阶段恢复, 但有些患者, 高浓度的病毒抗原在血液中延期或无限期持续存在, 导致慢性感染。慢性感染会引起慢性迁延性肝炎。在发展中国家, 慢性迁延性 HBV 感染患者是很常见的。至 1991 年上半年, 仅在亚洲就大约有 225 百万慢性 HBV 携带者, 全世界接近 300 百万携带者。慢性迁延性肝炎可以引起疲劳、肝硬化和肝细胞癌, 这是一种初期肝癌。

25 在西方发达国家, HBV 感染的高危人群包括那些与 HBV 携带者或其血样接触的人群。HBV 的流行病学与获得性免疫缺乏综合征(AIDS)非常相似, 这也是为什么 HBV 感染在 AIDS 或 AIDS 相关综合征患者中普遍的缘故。但是, HBV 比 HIV 更具有传染性。

30

然而，在最近，业已通过基因工程生产出疫苗并在广泛使用。不幸的是，疫苗对已经感染 HBV 的人没有什么帮助。虽然也可以指望每天用 α -干扰素（一种基因工程蛋白）进行治疗，但这种疗法对治疗的患者只有约三分之一是成功的，此外，干扰素不能口服给药。

5

许多合成的核苷类已被证实具有抗 HBV 活性。Liotta 等人的 U.S. 专利 5,539,116 所保护的 BCH-189 的(-)-对映体，称作 3TC，已经被美国食品和药物管理局批准用于治疗乙型肝炎。另见 BioChem Pharma, Inc.递交申请的 EPA 0494 119 A1。

10

Liotta 等人的 U.S.专利 5,814,639 和 5,914,331 所保护的 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环("FTC")显示出抗 HBV 活性，见 Furman 等人“顺式-5-氟-1-[2-(羟甲基)-1,3-噁嗪戊环-5-基]-胞嘧啶(-)和(+)对映体的抗乙型肝炎活性，细胞毒性和代谢分布” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992 年 12 月，第 2686-2692 页，以及 Cheng 等人，Journal of Biological Chemistry, Volume 267(20), 13938-13942 (1992)。

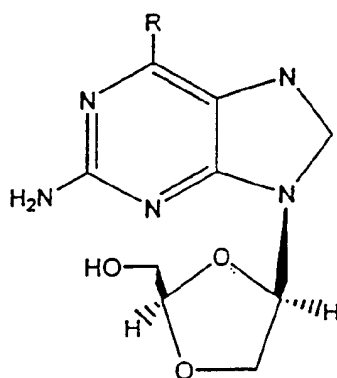
15

U.S.专利 5,565,438、5,567,688 和 5,587,362 (Chu 等人)公开了使用 2'-氟-5-甲基- β -L-阿拉伯呋喃糖基尿苷(L-FMAU) 治疗乙型肝炎和 Epstein Barr 病毒。

20

Emory 大学和乔治亚大学研究基金会公司的 U.S.专利 5,767,122 公开并要求保护对映纯的下式 β -D-二氧戊环基核苷：

25



30

其中 R 为 NH₂、OH、Cl 或 H。在 Raymond F. Schinazi 的 U.S.专利 5,684,010 中要求保护一种联合使用 DAPD 和 FTC 治疗 HBV 感染的方法。

5 喷昔洛韦 (Penciclovir) (2-氨基-1,9-二氢-9-[4-羟基-3-(羟甲基)丁基-6H-嘌呤-6-酮; PCV)具有确定的抗乙肝活性, 见 U.S.专利 5,075,445 和 5,684,153。

10 Adefovir (9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤, 也称作 PMEa 或[[2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)乙氧基]甲基磷酸),同样具有确定的抗乙肝病毒活性。参见例如 U.S.专利 5,641,763 和 5,142,051。

耶鲁大学和乔治亚大学研究基金会公司在 WO 92/18517 公开了使用 L-FDDC (5-氟-3'-硫代-2',3'-二脱氧胞苷)治疗乙肝病毒。

15 von Janta-Lipinski 等人公开了使用 3'-氟-修饰的 β-2'-脱氧核糖核苷 5'-三磷酸酯的 L-旋光对映体抑制乙型肝炎聚合酶(J. Med. Chem., 1998, 41, 2040-2046)。具体地讲, 公开了 3'-脱氧-3'-氟-β-L-胸苷 (β-L-FTTP)、2',3'-二脱氧-3'-氟-β-L-胞苷(β-L-FdCTP)和 2',3'-二脱氧-3'-氟-β-L-5-甲基胞苷 (β-L-FMethCTP) 的 5'-三磷酸酯作为 HBV DNA 聚合酶的有效抑制剂。

25 人们已经认识到, 长时间使用抗病毒剂治疗, 会产生 HBV 的抗药性变体, 通常抗药性都是通过基因突变产生的, 该基因对在病毒生命循环中所使用的酶编码, 对于 HBV 而言最常见的是, DNA 聚合酶。最近, 已经有人证明, 将化合物与第二种、甚至第三种会导致不同于主药所引起的突变的抗病毒化合物进行联合给药, 可以增进抗 HBV 感染药物的功效。另外, 药物的药动学、生物分布或其它参数也可以通过这样的联合治疗而改变。总而言之, 联合治疗可以对病毒同时产生

30 多样的应激反应。

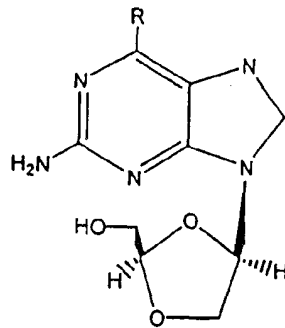
据美国专利 5,808,040 公开, L-FMAU 可以与 FTC、3TC、carbovir、阿昔洛韦、干扰素、AZT, DDI (2',3'-二脱氧肌苷)、DDC (2',3'-二脱氧胞苷) L-DDC、L-F-DDC、和 D4T 进行联合给药。

5

美国专利 5,674,849 公开将核苷与低聚核苷酸联合使用, 治疗病毒性疾病。

美国专利 5,684,010 公开治疗乙型肝炎的方法, 包括将下式化合物:

10



15

其中 R 是 NH₂、OH 或 Cl,

与 FTC、3TC、carbovir 或干扰素联合给药或交替给药。

20

WO 98/23285 公开了治疗或预防人或动物患者乙肝病毒感染的方法, 包括对患者给以有效量或预防剂量的喷昔洛韦(或其生物前体, 如泛昔洛韦) 和 α -干扰素。

25

鉴于事实上乙肝病毒已经到了在全球范围流行的程度, 并且对感染的患者具有严重的而且常常是悲剧性的伤害, 对于被病毒感染的人, 仍然强烈需要提供新的有效的、对宿主低毒性的治疗。

30

因此, 本发明的目的是为感染了乙肝病毒和相关病症的病人或其它宿主提供新的治疗方法, 包括以联合方式给以协同有效量的抗 HBV 药剂。

发明概要

现已发现具有乙肝活性的药剂的某些联合具有协同作用，因此，以有效的联合或交替剂量模式给药时，可以对患者带来更高的利益。

5

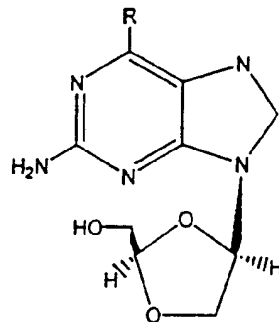
在本发明的一个优选实施方案中，公开了治疗人 HBV 感染和相关病症的方法，包括给以协同有效量的 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环(FTC)，优选实质上为(-)-光学异构体形式，或其可药用的盐、酯或前药和喷昔洛韦(2-氨基-1,9-二氢-9-[4-羟基-3-(羟甲基)丁基-6H-嘌呤-6-酮；也称作“PCV”)。在本发明的任一实施方案中，泛昔洛韦(Famciclovir)或其它任何喷昔洛韦的生物前体均可以代替喷昔洛韦。

本发明的另一个优选实施方案是治疗人 HBV 感染和相关病症的方法，包括以联合或交替的方式，给以协同有效量的 β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环(FTC)，优选实质上为(-)-光学异构体形式，或其可药用的盐、酯或前药和 9-[2-(磷酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤(PMEA，以下也称作 Bis-POM-PMEA 或 BP-PMEA) 或其可药用的盐、酯或前药，任选在可药用载体中。

20

在本发明的另一个优选实施方案中，公开了治疗人 HBV 感染和相关病症的方法，包括以联合或交替的方式，给以协同有效量的 2'-氟-5-甲基- β -L-阿拉伯呋喃糖基尿苷(L-FMAU)或其可药用的盐、酯或前药和具有下式的化合物，或其可药用的盐、酯或前药：

25



30

优选 β -D-(2R,4R)-2-氨基-9-[(2-羟甲基)-1,3-二氧杂戊环-4-基]嘌呤(DAPD), 且该化合物优选以基本纯净的形式给药, 任选在可药用载体中。

5

在本发明的另一个优选实施方案中, 公开了治疗人 HBV 感染和相关病症的方法, 包括以联合或交替的方式, 给以协同有效量的 2'-氟-5-甲基- β -L-阿拉伯呋喃糖基尿苷(L-FMAU)或其可药用的盐、酯或前药和喷昔洛韦或其可药用的盐、酯或前药, 任选在可药用载体中。

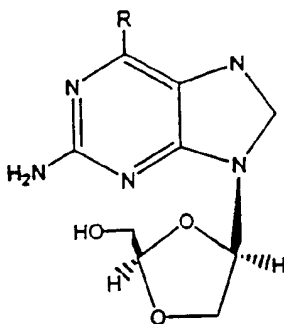
10

在本发明的另一个优选实施方案中, 公开了治疗人 HBV 感染和相关病症的方法, 包括给以协同有效量的 2'-氟-5-甲基- β -L-阿拉伯呋喃糖基尿苷(L-FMAU)或其可药用的盐、酯或前药和(9-[2-(磷酰基甲氧基)乙基]腺嘌呤(PMEA) 或其可药用的盐、酯或前药, 任选在可药用载体中。

15

本发明的另一个优选实施方案包括治疗人 HBV 感染和相关病症的方法, 包括给以协同有效量的下式的化合物或其可药用的盐、酯或前药和 PMEA 或其可药用的盐、酯或前药,

20



25

其中 R 是 NH_2 、OH、H 或 Cl (这里一起称作 DAPD 类化合物), 优选 β -D-(2R,4R)-2-氨基-9-[(2-羟甲基)-1,3-二氧杂戊环-4-基]嘌呤(DAPD), 且该化合物优选以基本纯净的形式给药, 任选在可药用载体中。

30

发明详述

本文所用的术语“经分离的对映体”是指核苷组分包括大约95%-100%，更优选超过97%的核苷的单一对映体。

5

术语“基本纯净的形式”或基本不含其相反的对映体是指核苷组分的一种对映体中包括不多于约5%的另一种对映体，更优选不多于约2%，最优选存在少于约1%。

10

化合物或其可药用酯或盐的协同联合作用还用于预防和治疗HBV感染和其它相关病症，如抗-HBV抗体阳性和HBV-阳性状况、由HBV引起的慢性肝炎、肝硬化、急性肝炎、暴发性肝炎、慢性迁延性肝炎和疲劳。这些协同制剂还可以用于预防或阻止个体的临床病情进展，这些个体是抗-HBV抗体阳性或HBV抗原阳性，或者是已经接触

15

HBV。
活性化合物可以通过与适当的酯化试剂如酰氯或酸酐反应，转化为可药用的酯。活性化合物或其可药用衍生物按照常规方法，如与适当的碱作用可以转化为它们的可药用盐。这些酯或盐可以转化为母化合物，例如通过水解。

20

术语“协同联合”是指药物的联合，按照本文所述的方法测定，在体内或体外产生了协同作用。

25

I. 活性化合物及其生理上可接受的盐

本文所公开的活性化合物是已知的具有抗乙肝活性的用于治疗核苷或者环状的或开链式的核苷类似物。业已发现核苷的某些联合优于单一疗法，或者优于其它的联合方式。并非已知抗-HBV药物的所有的联合都带来益处，常见的情况是药物对抗作用。

30

活性化合物可以以任何衍生物的形式给药，只要该衍生物给予受者后，能够直接或间接地释放母化合物或者其本身具有活性。非限定性的例子是可药用盐（也称作“生理上可接受的盐”），活性化合物的 5'和 N⁴-胞嘧啶基或 N⁶-腺嘌呤基酰化(酯化)衍生物（也称作“生理活性衍生物”）。在一个实施方案中，酰基是羧酸酯，其中酯基的非羰基部分选自直链或支链的、或环状的烷基或低级烷基，烷氧基烷基（包括甲氧基甲基），芳烷基（包括苄基），芳氧基烷基如苯氧基甲基，芳基（包括任选被卤素、C₁-C₄ 烷基或 C₁-C₄ 烷氧基取代的苯基）；或者是磺酸酯，如烷基或芳烷基磺酸酯（包括甲磺酸酯），磷酸酯包括但不限于一、二或三磷酸酯，三苯甲基或一甲氧基三苯甲基、取代的苄基、三烷基甲硅烷基（如二甲基-5-丁基甲硅烷基）或二苯基甲基甲硅烷基酯。酯部分的芳基任选包括苯基。

对活性化合物，尤其是在 N⁴-胞嘧啶基或 N⁶-腺嘌呤基和 5'-O 位置上进行修饰，可以影响活性物质的生物利用度和代谢速率，并由此获得对活性物质释放的控制。此外，修饰还可以影响化合物的抗病毒活性，在某些情况下可以增强母化合物的活性。按照本文所述的方法和本领域技术人员熟知的方法制备衍生物并测试它的抗病毒活性，可以容易地对此进行评估。

20

前药

本文所述的任何抗乙肝药剂均可以以前药的形式进行给药，以提高核苷的活性、生物利用度、稳定性或改变其性质。许多羟基连接的前药配基是已知的。一般情况下，羟基的烷基化、酰化或其它亲脂性的修饰，核苷的一、二或三磷酸酯都会增强核苷的稳定性。可以在羟基上或磷酸酯部分置换一个或多个氢的取代基例子是烷基、芳基、类固醇、碳水化合物（包括糖）、1,2-二酰基甘油和醇。更多的描述在 R. Jones 和 N. Bischofberger, 抗病毒研究(Antiviral Research), 27 (1995)1-17, 所有这些均可用于和所公开的核苷联合，以达到期望的效果。

30

一些 U.S.专利公开了适当的亲脂性的可以以共价键结合到核苷上的取代基, 优选结合到核苷的 5'-OH 或开链式的核苷类似物(如 PMEA 或喷昔洛韦)的羟基上。非限定性的例子包括 U.S.专利 5,149,794 (1992 年 9 月 22 日, Yatvin 等人)、5,194,654 (1993 年 3 月 16 日, Hostetler 等人)、5,223,263 (1993 年 6 月 29 日, Hostetler 等人)、5,256,641 (1993 年 10 月 26 日, Yatvin, 等人)、5,411,947 (1995 年 5 月 2 日, Hostetler 等人)、5,463,092 (1995 年 10 月 31 日, Hostetler 等人)、5,543,389 (1996 年 8 月 6 日, Yatvin 等人)、5,543,390 (1996 年 8 月 6 日, Yatvin 等人)、5,543,391(1996 年 8 月 6 日, Yatvin 等人)和 5,554,728 (1996 年 9 月 10 日, Basava 等人)。

一些外国专利申请公开了可结合到本发明活性化合物上的亲脂性取代基和亲脂性制剂, 包括 WO89/02733、WO 90/00555、WO 91/16920、WO 91/18914、WO 93/00910、WO94/26273、WO/15132、EP 0350287、EP 93917054.4 和 WO 91/19721。

II. 活性化合物的制备

用于本发明协同联合的治疗性核苷及其制备方法是本领域已知的。

β -2-羟甲基-5-(5-氟胞嘧啶-1-基)-1,3-噁嗪戊环(FTC)及其对映体可以按照 U.S.专利 5,204,466、5,700,937、5,728,575 和 5,827,727 公开的方法制备。

2'-氟-5-甲基- β -L-阿拉伯呋喃糖基尿苷(L-FMAU) 可以按照 Chu 等人的 U.S.专利 5,565,438、5,567,688 和 5,587,362 公开的方法制备。

DAPD 类化合物, 包括(2R,4R)-2-氨基-9-[(2-羟甲基)-1,3-氧杂戊环-4-基]嘌呤(DAPD)的制备方法公开在 U.S.专利 5,767,122、

5,684,010、5,444,063 和 5,179,104 上。

喷昔洛韦可以按照公开在 U.S 专利 5,075,445 和 5,684,153 中的方法进行制备。

5

PMEA 可以按照公开在 U.S.专利 5,641,763 和 5,142,051 的方法制备。

10 活性核苷的一、二和三磷酸酯衍生物可以按照已公开的方法进行。制备一磷酸酯可以按照 Imai 等人, J. Org. Chem., 34(6), 1547-1550 (June 1969)所述的方法制备, 二磷酸酯可以按照 Davisson, 等人, J. Org. Chem., 52(9), 1794-1801(1987)所述的方法制备, 三磷酸酯可以按照 Hoard 等人, J. Am. Chem. Soc., 87(8), 1785-1788 (1965)所述的方法制备。

15

III. 联合治疗

20 已经确认, 在长期使用抗病毒剂治疗后, 会产生 HBV 的抗药性变体, 通常抗药性都是通过基因突变产生的, 该基因对在病毒生命循环中所使用的酶编码, 对于 HBV 而言最常见的是, DNA 聚合酶。最近, 已经有人证明, 将化合物与第二种、甚至第三种会导致不同于主药所引起的突变的抗病毒化合物进行联合给药, 可以延长、增强或恢复抗 HBV 感染药物的功效。另外, 药物的药动学、生物分布或其它参数也可以通过这样的联合治疗而改变。总而言之, 联合治疗可以对病毒同时产生多样的应激反应。

25

实施例 1

测试化合物: DAPD, DXG, (-)- β -FTC, L-FMAU

DMVI 试验对照: 未处理细胞, 3TC (拉米夫定), 喷昔洛韦(PCV)

30 详细的试验方法可见于 Korba 和 Gerin, 抗病毒研究(Antiviral Res.)19: 55-70(1992) 和 Korba, 抗病毒研究(Antiviral Res.)29:49-52

(1996)。对四个测试浓度的每个浓度，均为六个独立培养样品，进行抗病毒评价。所有培养平板的所有样孔进行等密度同时接种。

5 由于细胞外和细胞内 HBV DNA 浓度的固有差异，相对于未处理细胞中的这些 HBV DNA 形式的平均水平，只有 HBV 病毒颗粒 DNA 受到 3 倍以上的阻抑，一般才认为在统计学上是有意义的[P<0.05] (Korba 和 Gerin, 抗病毒研究(Antiviral Res.)19: 55-70, 1992)。对于未处理细胞，细胞外 HBV 病毒颗粒 DNA 的典型值在 80-150pg/ml 培养基(平均约 92 pg/ml)。

10

为了便于参照，在这些试验中进行了杂交分析，该方法使得约 1.0 pg 细胞外的 HBV DNA/ml 培养基等价于 3×10^5 病毒颗粒/ml。

15 为了探知所观察到的抗病毒效果是否归因于对细胞活力的整体影响，进行了毒性分析，所用的方法是中性红染料摄取法 (Uptake of neutral red dye)，这是一种标准的和广泛应用的细胞活力测定方法，适于各种病毒-宿主体系，包括 HSV 和 HIV。该方法的细节见毒性的表格说明。

20 试验参量

25 测试化合物在收到时包装良好，室温下为固体。将测试化合物溶解于 100%的组织培养品级(tissue culture grade)的 DMSO (Sigma, Corp.)，浓度为 100mM (DAPD, FTC, L-FMAU)或 50mM (DXG)。在独立的试管中，将化合物制成每日等分试样，并储藏在-20℃。每天进行治疗时，在室温下将每日等分试样悬浮于培养基中，并立即加入到细胞培养物中。

30 为了进行抗病毒分析，将融合的培养物置于 96-孔平底组织培养板。对于每种药物治疗，均采用两个独立的培养板(平行测定)；每个培养板上的全部 3 个培养物，都用抗病毒剂的各个稀释度进行治疗(每

个稀度 6 个培养物)。培养物接续用 9 个日剂量的测试化合物进行治疗，每天更换含新鲜的测试化合物的培养基。然后只测定细胞外(病毒颗粒)HBV DNA 浓度。

5 毒性分析采用 96-孔平底组织培养板进行。按照抗病毒分析所采用的相同程序并在同样的培养条件下，将用于毒性分析的细胞进行培养和用测试化合物处理，每个化合物在 4 种浓度下进行测试，每个浓度一式三份培养物，采用中性红染料摄入法，在最后一次处理 24 小时后测定毒性的相对强度。将内化染料在 510 nm 处的吸光度 (A_{510})
10 用于定量分析，其值表示为平均 A_{510} 值的百分数(\pm 标准偏差)，未处理细胞的 9 个独立培养物样品与测试化合物处于同一 96-孔培养板上。

联合治疗采用基本的分析方式进行，不同的是，对每个药物联合采用 6 个系列的 3 倍稀释液，每个联合稀释液共使用 8 个独立培养物。
15 化合物按照设定的摩尔比混合，以 EC_{90} 值计，得到接近等效的抗病毒效果。对每种联合采用三种不同的摩尔比，以判断相对效能的变化性。这些摩尔比贯穿于稀释液系列。与联合治疗相平行，采用标准的基本分析方式进行相应的单一治疗。

20 为了报导结果，所述联合治疗的 SI 、 EC_{50} 、 EC_{90} 和 CC_{50} 值是联合混合物中第一个化合物的值。混合物中第二个化合物的浓度、 SI 、 EC_{50} 、 EC_{90} 和 CC_{50} 值是可以根据具体混合物的指定摩尔比计算出来的。对于所实施的联合方案更详细的分析可见于 BE Korba (1996) 抗病毒研究(Antiviral Res). 29:49。

25 采用 CalcuSyn™ 程序(Biosoft, Inc.)进行数据分析，分析确定出协同作用、加和作用或拮抗作用，该程序采用广为认可的 Chou 和 Talalay 方法，并采用 Monte Carlo 统计软件包，结合统计学求值，评价药物的相互作用。采用几种不同的格式来展示数据，包括中值-效应和剂量-
30 效应图、等辐射热测量图 (isobolograms) 和联合指数[CI]图，并给

出标准偏差。对后面的分析而言，CI 大于 1.0 表示拮抗作用，CI 小于 1.0 显示协同作用。

5 对于联合治疗相关的毒性分析，将试验方案限于混合物中毒性更大的化合物或原液浓度（例如，相对于可加入到培养物中而不产生毒性的 DMSO 总体积，此毒性是指由 DMSO 导致不是指由测试化合物导致）。

抗病毒评价

10 对照试验： 在正常的波动范围内，未处理的细胞在被攻击期（challenge period），细胞外的 HBV (病毒颗粒) DNA 浓度保持恒定。阳性治疗对照，3TC (拉米夫定) [((-)-β,L,2',3'-二脱氧-3' 硫代胞苷] 和喷昔洛韦 [PCV] (二者均购自 Moraveck Biochemicals, La Brea, CA), 在所使用的浓度下对 HBV DNA 复制均产生明显的阻抑。在这些分析测试中
15 中所观察到的 3CT 活性与已有试验相一致，在对 2.2.15 细胞进行连续 9 天的治疗后，相对于未处理细胞的平均水平，0.15-0.2μM 的 3TC 对 HBV 病毒颗粒 DNA 产生 90%阻抑[EC₉₀](例如，参见 Korba 和 Boyd, Antimicrob. Agents Chemother. (1996) 40:1282-1284)。在这些分析测试
20 中所观察到的 PCV 活性高于已有试验所报告的值(EC₉₀ 约为 0.7 - 0.9μM, Korba 和 Boyd, Antimicrob. Agents Chemother. (1996) 40:1282-1284)。但是，在几个其它非相关试验中，这些试验所用的 PCV 制剂在本文所报告的范围内始终产生抗-HBV 活性。

25 化合物测试： 测试化合物 DAPD、FTC、DXG 和 L-FMAU 对于由 2.2.15 细胞产生的细胞外(病毒颗粒)HBV DNA 水平，产生显著的、选择性的阻抑。

30 与 FTC 合并治疗，DAPD 的抗病毒活性增强。除最高测试浓度外，DAPD 的抗病毒活性在 3:1 或 1:1 的摩尔比的所有浓度下是协同的。随着 FTC 相对浓度的增加，两种药剂的协作效应下降。在 1:3 的

摩尔比情况下，两种药剂显现出拮抗作用。

DAPD 和 PCV 在全部三种摩尔比和所有浓度下，均显现出拮抗作用。

5

在 1:10 和 1:1 的摩尔比情况下，DAPD 和 L-FMAU 显现出拮抗作用。在 1:3 的摩尔比(约等于 EC_{90} 的效果)情况下，两种药剂的相互作用更为复杂。在较低浓度下，DAPD 和 L-FMAU 表现出中等的协同作用以至加和作用，在较高浓度下逐渐发展为拮抗的作用。但后来的测试表明，DAPD 与 L-FMAU 是相互协同的。

10

与 FTC 合并治疗，L-FMAU 的抗病毒活性增强。除最高测试浓度外，L-FMAU 的抗病毒活性在 3:1 或 10:1 的摩尔比情况的所有浓度下是中等协同作用的。随着 FTC 相对浓度的增加，两种药剂的协作效应下降。在 1:1 的摩尔比情况下，两种药剂显现出拮抗作用。

15

与 PCV 合并治疗，L-FMAU 的抗病毒活性也是增强的。在所有测试浓度下，L-FMAU 的抗病毒活性在 1:1 或 1:3 的摩尔比具有弱的协同作用。随着 PCV 相对浓度的增加，两种药剂的协作效应下降。在 1:10 的摩尔比情况下，两种药剂显现出拮抗作用。

20

毒性评价

在抗病毒评价中所用浓度下的 3TC、PCV、或者任一测试化合物均未观察到明显的毒性(对从未处理细胞观察到的染料摄入水平，有大于 50% 的阻抑)。

25

在不同的混合物中，联合治疗均未显出增强其中任一药剂毒性的趋势。一些联合混合物的毒性明显高于相应的单一治疗，因为所报告的值是以各混合物中所列第一化合物浓度作为参数的。这一点对含有 PCV 的混合物尤为显著。但是，按照混合物中第二化合物(如 PCV)重

30

新计算毒性趋势，则看出：所有的表观毒性是由更多的毒性化合物引起的，而这些联合并没有增强毒性。

实施例 2

5 测试化合物：(-)- β -FTC

DMVI 测试对照：未处理细胞, 3TC (拉米夫定), 喷昔洛韦(PCV)

10 详细的测试方法如上面所给出，测试化合物在收到时包装良好，室温下为固体。将测试化合物溶解于 100%的组织培养品级的 DMSO (Sigma, Corp.)，浓度为 100mM。在独立的试管中，将测试化合物制成每日等分试样，并储藏在-20°C。

化合物测试：测试化合物 FTC 对于 2.2.15 细胞生产的细胞外(病毒颗粒)HBV DNA 水平，产生显著的、选择性的阻抑。

15 与 PCV 合并治疗，FTC 的抗病毒活性增强。在测试的所有摩尔比下，联合治疗的抗病毒活性是协同的。随着 PCV 相对浓度的增加，两种药剂的协作效应下降。

毒性评价

20 在抗病毒评价中所用浓度(表 S1、T1)下，3TC、PCV、FTC 或者任一联合治疗均未观察到明显的毒性(对从未处理细胞观察到的染料摄入水平，有大于 50% 的阻抑)。

25 在不同的混合物中，联合治疗均未显出增强其中任一药剂毒性的趋势。一些联合混合物的毒性明显高于相应的单一治疗，是因为所报告的值是以各混合物中所列第一化合物浓度作为参数的。

实施例 3

测试化合物：PMEA, (-)- β -FTC, DAPD, L-FMAU

30 DMVI 试验对照：未处理细胞, 3TC (拉米夫定)

详细的测试方法如上面所给出，测试化合物（Bis-POM-PMEA 除外）在收到时包装良好，在干冰冷却下为粉末物质并储藏在-20℃。测试化合物 Bis-POM-PMEA 在收到时为 100mM 的 DMSO 溶液。在独立的试管中，制成测试化合物的每日等分试样，并储藏在-20℃。每天进行治疗时，在室温下将每日等分试样悬浮于培养基中，并立即加入到细胞培养物中。

化合物测试（原始分析）：全部测试化合物对于 2.2.15 细胞生产的细胞外(病毒颗粒)HBV DNA 水平，均产生显著的、选择性的阻抑。但是，(-)-β-FTC、DAPD 和 L-FMAU 的效力低于先前分析测试所观察到的结果，对于 DAPD 和 L-FMAU 最为明显。

Bis-POM-PMEA (BP-PMEA) + FTC。BP-PMEA 和 FTC 的混合物产生的抗-HBV 活性全部是中等协同的。混合物的效力随着 FTC 的相对比例增加而增强。但总的来说，FCT 的浓度按比例降低的情况下，产生最好的相互作用。在 30:1 混合物的所有浓度下，一般均能观察到相对同样程度的协同作用。在 10:1 和 3:1 混合物的较低浓度下，观察到相对更强的协同作用；在 3:1 混合物的最高浓度下，观察到中等的以至强的拮抗作用。

BP-PMEA + DAPD。BP-PMEA 和 DAPD 的混合物产生的抗-HBV 活性，在相对较低的 DAPD 浓度下为中等至弱的协同作用，而在相对较高的 DAPD 浓度下为中等至强的拮抗作用。混合物的效力也随着 DAPD 相对比例的增加而下降。在不同混合物的较低浓度下，观察到相对较强的协同作用。

BP-PMEA + L-FMAU。BP-PMEA 和 L-FMAU 的混合物产生的抗-HBV 活性，在相对较低的 L-FMAU 浓度下是中等协同的，在相对较高的 L-FMAU 浓度下是加和性的以至弱拮抗性的。在相对最高浓度(1:1 摩尔比)的 L-FMAU 下，混合物的效力最低。两种化合物摩尔比

为 3:1 时, 总的来说观察到最好的相互作用。在不同混合物的较低浓度下, 观察到相对较强的协同作用。

毒性评价

5 在抗病毒评价中所用浓度下, 3TC、任一测试化合物或者任一化合物的混合物均未观察到明显的毒性(对从未处理细胞观察到的染料摄入水平, 有大于 50% 的阻抑)。化合物的混合物均未明显地增强毒性。所观察到的化合物混合物毒性模式与单一治疗所观察到的相似或一致。

10

IV. 药物组合物的制备

 对于患有由 HBV 感染引起的所述疾病的人可如下进行治疗, 对患者给以有效量的具有确定协同作用的抗-HBV 药剂, 以联合形式给药, 或者以独立剂量形式联合治疗或交替治疗, 所述药剂任选在可药用载体或稀释剂中。活性物质可以以液体或固体形式, 通过任何适当的途径给药, 例如口服、肠胃外给药、静脉注射、透皮给药、皮下给药或局部给药。

15

 将足量的活性化合物包含在可药用载体或稀释剂中, 对患者释放出治疗有效量的化合物以抑制病毒在体内的复制, 尤其是 HBV 的复制, 而对受治疗的患者不产生严重的毒性作用。"抑制剂量" 是指足够产生抑制作用例如按照上述测试方法测定的抑制作用的活性成分的量。

20

 在所有的上述条件下, 优选的化合物剂量可以是约 1-50 mg/kg, 优选 1-20 mg/kg 体重每天, 更一般的情况下, 每天每千克受者体重 0.1-约 100 mg。可药用衍生物的有效剂量范围可以根据释放的母体核苷的重量进行计算。如果衍生物本身具有活性, 可以按照上述方法用衍生物的重量, 或者按照本领域技术人员所熟知的其它方法估算有效剂量。

25

30

化合物可方便地以单位剂量形式或任何适当的剂量形式给药，包括但不限于每单位剂量形式含有 7-3000mg，优选 70-1400mg 的活性成分。通常 50-1000 mg 的口服剂量是方便的，更常见的是 50-300 mg。

5

活性化合物的理想给药方式是活性化合物的血浆峰浓度达到约 0.2-70 μ M，优选约 1.0-10 μ M，这一点可以通过，例如静脉注射 0.1- 5% 活性成分的溶液（任选在生理盐水中），或者以活性成分的大丸剂形式给药来实现。

10

活性化合物在药物组合物中的浓度依赖于药物的吸收作用、失活作用和排泄速率，以及其它的本领域技术人员已知的因素。值得一提的是剂量标准也随着治疗病情的严重程度而变化。可以理解的还有：对于具体的受治疗者，应当根据个体的需要和主管给药人员的专业判断，随时间调整具体的剂量配给方案。本文所述的浓度范围仅仅是示范性的，而不是用来限定要求保护的组合物的范围和实施。活性成分可以一次性给药，也可以分成数个较小的剂量在不同的时间间隔给药。

15

20

活性化合物优选的给药方式是口服，口服组合物通常含有惰性稀释剂或可食的载体。它们可以包封在明胶胶囊或压成片剂。为了便于口服给药治疗，活性化合物可以与赋型剂混合，以片剂、锭剂或胶囊形式使用。药学上适合的粘结剂和/或辅剂也可以作为部分组成包括在内。

25

片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有以下任意组分或性质相似的化合物：粘结剂如微晶纤维素、黄耆胶或明胶；赋型剂如淀粉或乳糖；崩解剂如海藻酸、Primogel 或玉米淀粉；润滑剂如硬脂酸镁或 Sterotes；助滑剂如胶质二氧化硅；甜味剂如蔗糖或糖精；或矫味剂如薄荷油、水杨酸甲酯或橙味调味料。如果剂量单位形式是胶囊，那

30

么，除了上述类型物质以外，还可以含有液体载体如脂肪油。此外，剂量单位形式可以含有改善剂量单位物理形状的各种物质，例如，糖衣、虫胶包衣或其它肠衣剂。

5 化合物可以作为酞剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂、咀嚼胶或类似剂型的一个组分给药。糖浆剂除了活性化合物以外，可以含有蔗糖作为甜味剂，以及一些防腐剂、染料、着色剂和调味香料。

10 化合物或其可药用的衍生物或盐还可以和无损于所需作用的其它活性物质相混合，或者与具有增补所需作用的物质相混合，例如抗生素、杀真菌剂、抗炎剂、蛋白酶抑制剂，或其它核苷类或核苷类抗病毒剂，如上面详细所述。用于肠胃外给药、透皮给药、皮下给药或局部应用的溶液或悬浮液可以包括下面的组分：无菌稀释剂如注射用水、生理盐水、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；
15 抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及张力调节剂如氯化钠或葡萄糖。肠胃外给药制剂可以封装在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器和多倍剂量的小瓶中。

20 如果是静脉注射，优选的载体是生理盐水或磷酸盐缓冲盐水（PBS）。

在优选的实施方案中，活性化合物的制剂载体能够防止化合物从体内快速排除，如缓释制剂，包括植入物和微囊包封的缓释体系。可以
25 使用能进行生物降解的、生物相容性的聚合物，如乙烯-乙酸乙烯基酯、聚酞类、聚羟基乙酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这些制剂的制备方法对本领域技术人员而言是显而易见的，所需物质还可以从 Alza Corporation 公司商购。

30 脂质体悬浮液（包括脂质体，其靶向带病毒抗原单克隆抗体的受

染细胞)也是优选的可药用载体。这些均可以按照本领域技术人员所熟知的方法制备,如 U.S.专利 4,522,811 所述。举例来讲,制备脂质体制剂可以将适当的脂质如硬脂酰磷脂酰基乙醇胺、硬脂酰磷脂酰基胆碱、二十烷酰磷脂酰基胆碱和胆固醇溶解于无机溶剂,然后蒸发,在容器表面留下一层干脂质薄膜,将活性化合物或其单磷酸酯、二磷酸酯和/或三磷酸酯衍生物的水溶液加入到容器中,然后用手旋转摇动容器,以使容器壁上的脂质物质脱离并分散脂质聚集体,从而形成脂质体悬浮液。

10 本发明参照其优选实施方案进行了描述。从本发明上面的详细描述,对本发明进行变化和修饰,对本领域技术人员而言是显而易见的,这些变化和修饰均包括在本发明范围之内。