



(21)申請案號：112146636 (22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 09 日

(51)Int. Cl. : *A61K31/18 (2006.01)* *A61K31/426 (2006.01)*
 A61K31/522 (2006.01) *A61K31/506 (2006.01)*
 A61K31/7088(2006.01) *A61K31/4745(2006.01)*
 A61K31/519 (2006.01) *A61K31/675 (2006.01)*
 A61K38/21 (2006.01) *A61K31/352 (2006.01)*
 A61K31/5377(2006.01) *A61P31/20 (2006.01)*

(30)優先權：2016/01/08 美國 62/276,722
 2016/05/31 美國 62/343,514
 2016/06/03 美國 62/345,476
 2016/10/17 美國 62/409,180
 2016/11/11 美國 62/420,969

(71)申請人：加拿大商艾爾布圖斯生技公司 (加拿大) ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION
 (CA)
 加拿大

(72)發明人：庫柯那提 安卓亞 CUCONATI, ANDREA (US)；李 艾咪 C H LEE, AMY C.
 H. (CA)；瑞恩布蘭德 柯內里斯 A RIJNBAND, CORNELIS A. (NL)；索非亞
 麥可 J SOFIA, MICHAEL J. (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：55 項 圖式數：0 共 237 頁

(54)名稱
用於治療 B 型肝炎之治療組合物及方法

(57)摘要
本發明提供適合用於治療 B 型肝炎之治療劑組合及治療方法。
The invention provides therapeutic combinations and therapeutic methods that are useful for treating Hepatitis B.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療B型肝炎之治療組合物及方法

【英文發明名稱】

THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS FOR
TREATING HEPATITIS B

【中文】

本發明提供適合用於治療B型肝炎之治療劑組合及治療方法。

【英文】

The invention provides therapeutic combinations and therapeutic methods that are useful for treating Hepatitis B.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療B型肝炎之治療組合物及方法

【英文發明名稱】

THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS FOR
TREATING HEPATITIS B

【技術領域】

本發明係有關適合用於治療B型肝炎之組合。特定而言，本發明係有關針對B型肝炎病毒具有不同作用機制之藥劑的組合。

【先前技術】

B型肝炎病毒(縮寫為「HBV」)為嗜肝DNA病毒家族之成員。病毒粒子(有時稱為病毒體)包括外部脂質包膜及由蛋白質組成之二十面體核衣殼核心。核衣殼封閉病毒DNA及具有逆轉錄酶活性之DNA聚合酶。外部包膜含有包埋之蛋白質，其參與病毒結合及進入易感細胞，典型地肝細胞。除感染性病毒粒子之外，感染個體之血清中亦可發現缺乏核心之絲狀及球狀體。此等粒子不具感染性且由形成病毒體表面之一部分的脂質及蛋白質(其稱為表面抗原(HBsAg))組成，且在病毒之生命週期期間過量產生。

HBV之基因組由環狀DNA構成，但其為反常的，因為DNA不完全為雙股的。全長股之一個末端鍵聯至病毒DNA聚合酶。基因組為3020-3320個核苷酸長(對於全長股)及1700-2800個核苷酸長(對於較短股)。負義(非編碼)股與病毒mRNA互補。在細胞感染之後不久在核中發現病毒DNA。存在四種已知由基因組編碼的基因，稱為C、X、P及

S。核心蛋白質由基因C編碼(HBcAg)，且其起始密碼子前面為產生前核心蛋白之上游框內AUG起始密碼子。HBeAg係藉由前核心蛋白之蛋白水解加工產生。DNA聚合酶由基因P編碼。基因S為編碼表面抗原(HBsAg)之基因。HBsAg基因為一種長開放閱讀框，但含有三個框內「起始」(ATG)密碼子，其將基因劃分成三個部分：前S1、前S2及S。由於有多個起始密碼子，故產生稱為大、中及小之三種不同尺寸之多肽。未充分瞭解由基因X編碼之蛋白質的功能，但其與肝癌之發展有關。HBV之複製為一複雜過程。雖然複製在肝臟中進行，但病毒擴散至血液，在感染人員中在血液中發現了病毒蛋白及針對其之抗體。HBV之結構、複製及生物學為綜述於D. Glebe及C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, 第33卷, 第2期, 第103-112頁(2013)中。

人類感染HBV可引起肝臟之感染性炎性疾病。感染個體可能多年不展現症狀。據估計，約三分之一的世界人口在其壽命中的一個點發生感染，包括35000萬慢性攜帶者。

病毒藉由暴露於感染性血液或身體流體進行傳播。圍產期感染亦可為主要感染途徑。急性疾病引起肝臟炎症、嘔吐、黃疸，且可能死亡。慢性B型肝炎可最終引起肝硬化及肝癌。

雖然感染HBV之大多數人通過其免疫系統之作用清除感染，但一些感染人員罹患侵襲性感染過程(猛爆性肝炎)；而其他人長期感染，藉此增加其肝病幾率。當前批准了若干藥物用於治療HBV感染，但感染個體以不同的成功程度對此等藥物作出反應，且此等藥物中無一者自感染人員清除病毒。

D型肝炎病毒(HDV)為一種小環狀包膜RNA病毒，其僅可在B型

肝炎病毒(HBV)存在下繁殖。特定而言，HDV需要HBV表面抗原蛋白來使自身繁殖。與感染單獨HBV相比，感染HBV與HDV兩者導致更嚴重之併發症。此等併發症包括在急性感染中經歷肝衰竭之可能性更大及快速進展至肝硬化，並且在慢性感染中發展肝癌之幾率增加。與B型肝炎病毒組合，D型肝炎在所有肝炎感染中具有最高死亡率。HDV之傳播途徑類似於HBV。感染很大程度上限制於處於HBV感染高風險之中的人員，特定而言注射藥物用戶及接收凝血因子濃縮物之人員。

因此，對用於治療動物(例如人類)之HBV感染以及用於治療動物(例如人類)中之HBV/HDV感染的組合物及方法存在持續需要。

【發明內容】

本發明提供適合用於治療諸如HBV之病毒感染的治療劑組合及治療方法。

本文所呈現之實例揭示使用針對HBV具有不同作用機制之藥劑的許多組合(例如二者組合)研究之結果。如本文所描述，藥劑之若干組合顯示意外協同相互作用，且組合通常缺乏拮抗作用。

在一個實施例中，本發明提供一種治療動物之B型肝炎的方法，其包括向動物投與至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及

f) 免疫刺激劑。

在另一實施例中，本發明提供一種套組，其包含至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑

其以組合形式用於治療或預防病毒感染，諸如B型肝炎。

在另一實施例中，本發明提供一種套組，其包含至少三種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑

其以組合形式用於治療或預防病毒感染，諸如B型肝炎。

在另一實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含醫藥學上可接受之載劑及至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；

- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑。

在另一實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含醫藥學上可接受之載劑及至少三種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本專利申請案主張2016年1月08日申請之美國申請案第62/276,722號及2016年5月31日申請之美國申請案第62/343,514號及2016年6月03日申請之美國申請案第62/345,476號及2016年10月17日申請之美國申請案第62/409,180號及2016年11月11日申請之美國申請案第62/420,969號的優先權益，該等申請以引用之方式併入本文中。

投與呈醫藥學上可接受之酸或鹼鹽的形式的化合物可為適當的。醫藥學上可接受之鹽的實例為使用例如以下之形成生理學可接受之陰離子的酸形成之有機酸加成鹽：甲苯磺酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、丙二酸鹽、酒石酸鹽、丁二酸鹽、苯甲酸鹽、抗壞血

酸鹽、 α -酮戊二酸鹽及 α -甘油磷酸鹽。亦可形成適合之無機鹽，包括鹽酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽、碳酸氫鹽及碳酸鹽。

醫藥學上可接受之鹽可使用此項技術中熟知之標準程序來獲得，例如藉由使諸如胺之足夠鹼性之化合物與適合之酸反應，從而提供生理學上可接受之陰離子。亦可製備羧酸之鹼金屬(例如鈉、鉀或鋰)或鹼土金屬(例如鈣)鹽。

逆轉錄酶抑制劑

在某些實施例中，逆轉錄酶抑制劑為核苷類似物。

在某些實施例中，逆轉錄酶抑制劑為核苷類似物逆轉錄酶抑制劑(NARTI或NRTI)。

在某些實施例中，逆轉錄酶抑制劑為核苷酸類似物逆轉錄酶抑制劑(NtARTI或NtRTI)。

術語逆轉錄酶抑制劑包括但不限於：恩替卡韋(entecavir)、克來夫定(clevudine)、替比夫定(telbivudine)、拉米夫定(lamivudine)、阿德福韋(adefovir)及替諾福韋(tenofovir)、替諾福韋雙索酯(tenofovir disoproxil)、替諾福韋艾拉酚胺(tenofovir alafenamide)、阿德福韋雙吡呋酯(adefovir dipovoxil)、(1R,2R,3R,5R)-3-(6-胺基-9H-9-嘌呤基)-2-氟-5-(羥甲基)-4-亞甲基環戊-1-醇(描述於美國專利第8,816,074號中)、恩曲他濱(emtricitabine)、阿巴卡韋(abacavir)、艾夫他濱(elvucitabine)、更昔洛韋(ganciclovir)、洛布卡韋(lobucavir)、泛昔洛韋(famciclovir)、噴昔洛韋(penciclovir)及安道索韋(amdoxovir)。

術語逆轉錄酶抑制劑包括但不限於恩替卡韋、拉米夫定及(1R,2R,3R,5R)-3-(6-胺基-9H-9-嘌呤基)-2-氟-5-(羥甲基)-4-亞甲基環戊

-1-醇。

術語逆轉錄酶抑制劑包括但不限於上述逆轉錄酶抑制劑之共價結合之胺基磷酸酯或胺基磷酸酯部分，或如例如美國專利第8,816,074號、US 2011/0245484 A1及2008/0286230A1中所描述。

術語逆轉錄酶抑制劑包括但不限於包含胺基磷酸酯部分之核苷酸類似物，諸如((((1R,3R,4R,5R)-3-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羥基-2-亞甲基環戊基)甲氧基)(苯氧基)磷醯基)-(D或L)-丙胺酸甲酯及((((1R,2R,3R,4R)-3-氟-2-羥基-5-亞甲基-4-(6-側氧基-1,6-二氫-9H-嘌呤-9-基)環戊基)甲氧基)(苯氧基)磷醯基)-(D或L)-丙胺酸甲酯。亦包括其個別非對映異構體，其包括例如((R)-((((1R,3R,4R,5R)-3-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羥基-2-亞甲基環戊基)甲氧基)(苯氧基)磷醯基)-(D或L)-丙胺酸甲酯及((S)-((((1R,3R,4R,5R)-3-(6-胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羥基-2-亞甲基環戊基)甲氧基)(苯氧基)磷醯基)-(D或L)-丙胺酸甲酯。

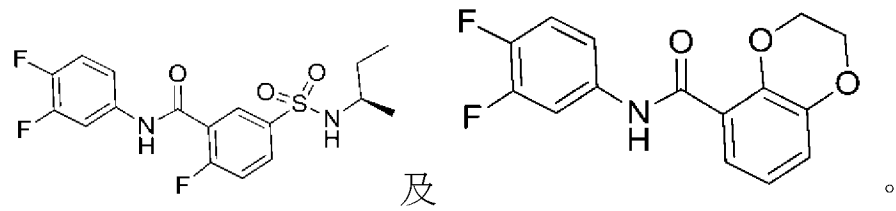
術語逆轉錄酶抑制劑包括但不限於胺基磷酸酯部分，諸如替諾福韋艾拉酚胺，以及描述於US 2008/0286230 A1中之彼等。製備立體選擇性含胺基磷酸酯或胺基磷酸酯之活性劑的方法描述於例如美國專利第8,816,074號以及US 2011/0245484 A1及US 2008/0286230 A1中。

衣殼抑制劑

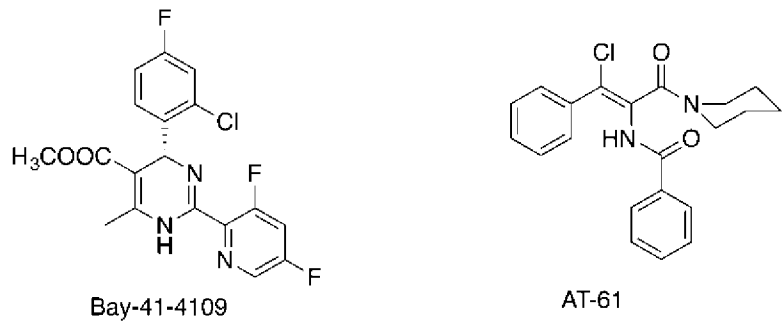
如本文所描述，術語「衣殼抑制劑」包括能夠直接或間接抑制衣殼蛋白之表現及/或功能的化合物。舉例來說，衣殼抑制劑可包括但不限於抑制衣殼組裝、誘導非衣殼聚合物形成、促進過量衣殼組裝或錯誤指導之衣殼組裝、影響衣殼穩定化及/或抑制RNA之衣殼化的

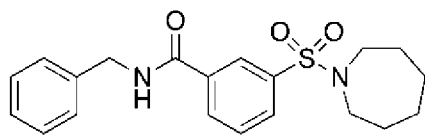
任何化合物。衣殼抑制劑亦包括抑制在下游事件中在複製過程內之衣殼功能(例如病毒DNA合成、松環DNA (rcDNA)運送至核中、共價閉環DNA (cccDNA)形成、病毒成熟、出芽及/或釋放及類似功能)的任何化合物。舉例來說，在某些實施例中，抑制劑可偵測地抑制如例如使用本文所描述之分析所量測的衣殼蛋白之表現水準或生物活性。在某些實施例中，抑制劑將病毒生命週期之rcDNA及下游產物的含量抑制至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

術語衣殼抑制劑包括描述於國際專利申請公開案第WO2013006394號、第WO2014106019號及第WO2014089296號中之化合物，包括以下化合物：

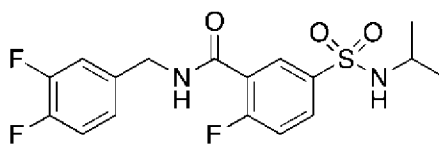


術語衣殼抑制劑亦包括化合物 **Bay-41-4109** (參見國際專利申請公開案第WO/2013/144129號)、**AT-61** (參見國際專利申請公開案第WO/1998/33501號；及King, RW等人，Antimicrob Agents Chemother., **1998**, 42, 12, 3179-3186)、**DVR-01**及**DVR-23** (參見國際專利申請公開案第WO 2013/006394號；及Campagna, MR等人，J. of Virology, 2013, 87, 12, 6931)及其醫藥學上可接受之鹽：





DVR-01

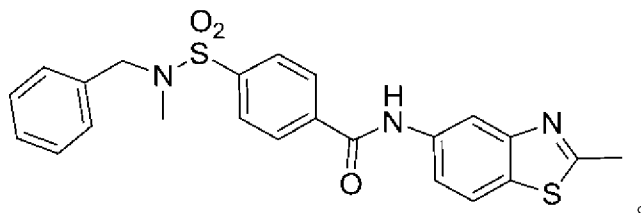


DVR-23

cccDNA形成抑制劑

共價閉環DAN (cccDNA)係在細胞核中由病毒rcDNA產生且充當病毒 mRNA之轉錄模板。如本文所描述，術語「cccDNA形成抑制劑」包括能夠直接或間接抑制cccDNA之形成及/或穩定性的化合物。舉例來說，cccDNA形成抑制劑可包括但不限於抑制衣殼分解、rcDNA進入核中及/或rcDNA轉化成cccDNA的任何化合物。舉例來說，在某些實施例中，抑制劑可偵測地抑制如例如使用本文所描述之分析所量測的cccDNA之形成及/或穩定性。在某些實施例中，抑制劑將cccDNA之形成及/或穩定性抑制至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

術語 cccDNA 形成抑制劑包括描述於國際專利申請公開案第 WO2013130703號中之化合物，包括以下化合物：



術語 cccDNA 形成抑制劑包括但不限於大體地且特定地描述於美國專利申請公開案第 2015/0038515 A1號中之彼等。術語 cccDNA 形成抑制劑包括但不限於 1-(苯基磺醯基)-N-(吡啶-4-基甲基)-1H-吡啶-2-甲醯胺； 1-苯磺醯基-吡咯啶-2-甲酸(吡啶-4-基甲基)-醯胺； 2-(2-氯-N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲

基)乙醯胺；2-(4-氯-N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-甲氧基苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-((1-甲基哌啶-4-基)甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(哌啶-4-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)丙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-3-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(嘧啶-5-基甲基)乙醯胺；2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(嘧啶-4-基甲基)乙醯胺；2-(N-(5-氯-2-氟苯基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙醯胺；2-[(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-(4-氟-苯磺醯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-乙醯胺；2-[(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-(甲苯-4-磺醯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-溴-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-[4-(4-甲基-哌嗪-1-基)-苯甲基]-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-苯甲基]-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-苯甲基-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-乙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-丙醯胺；2-[苯磺醯基-(2-氟-5-三氟甲基-苯基)-胺基]-N-吡啶-4-基甲基-乙醯胺；4 (N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-N-(吡啶-

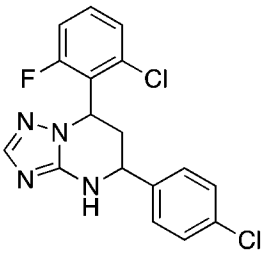
4-基-甲基)丁醯胺；4-((2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-乙醯胺基)-甲基)-1,1-二甲基哌啶-1-鎢氟化物；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-6-基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-6-基)-苯甲醯胺；4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-N-吡啶-4-基甲基-苯甲醯胺；N-(2-胺基乙基)-2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-乙醯胺；N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N-(2-(3,4-二氫-2,6-萘啶-2(1H)-基)-2-側氧基乙基)苯磺醯胺；N-苯并噻唑-6-基-4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-苯甲醯胺；N-苯并噻唑-6-基-4-(苯甲基-甲基-胺磺醯基)-苯甲醯胺；(2-(2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)乙醯胺基)-乙基)胺基甲酸第三丁酯；及4-((2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺醯胺基)-乙醯胺基)-甲基)哌啶-1-甲酸第三丁酯及(視情況)其組合。

sAg分泌抑制劑

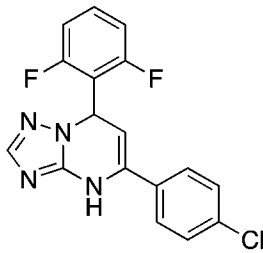
如本文所描述，術語「sAg分泌抑制劑」包括能夠直接或間接抑制自HBV感染之細胞分泌帶有sAg (S、M及/或L表面抗原)之亞病毒粒子及/或含有DNA之病毒粒子的化合物。舉例來說，在某些實施例中，抑制劑可偵測地抑制如例如使用此項技術中已知或本文所描述之分析(例如ELISA分析)或藉由西方墨點法(Western Blot)所量測的sAg之分泌。在某些實施例中，抑制劑將sAg之分泌抑制至少5%、至少

10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。在某些實施例中，抑制劑使患者中sAg之血清含量降低至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

術語sAg分泌抑制劑包括描述於美國專利第8,921,381號中之化合物以及描述於美國專利申請公開案第2015/0087659及2013/0303552號中之化合物。舉例來說，術語包括化合物PBHBV-001及PBHBV-2-15，及其醫藥學上可接受之鹽：



PBHBV-001



PBHBV-2-15

免疫刺激劑

術語「免疫刺激劑」包括能夠調節免疫反應(例如刺激免疫反應(例如佐劑))之化合物。術語免疫刺激劑包括聚肌苷酸:聚胞苷酸(聚I:C)及干擾素。

術語免疫刺激劑包括IFN基因刺激物(STING)及白介素之促效劑。術語亦包括HBsAg釋放抑制劑、TLR-7促效劑(GS-9620、RG-7795)、T細胞刺激劑(GS-4774)、RIG-1抑制劑(SB-9200)及SMAC-模擬物(Birinapant)。術語免疫刺激劑亦包括抗PD-1抗體及其片段。

寡聚核苷酸

術語靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸包括Arrowhead-ARC-520(參見美國專利第8,809,293號；及Wooddell CI等人，*Molecular Therapy*, **2013**, 21, 5, 973-985)。

寡聚核苷酸可經設計以靶向HBV基因組之一或多個基因及/或轉錄物。此類siRNA分子之實例為本文在表A中所闡述之siRNA分子。

靶向B型肝炎基因組之術語寡聚核苷酸亦包括分離之雙股siRNA分子，其各自包括有義股及雜交至有義股之反義股。siRNA靶向HBV基因組之一或多個基因及/或轉錄物。siRNA分子之實例為本文在表A中闡述之siRNA分子。

在另一態樣中，術語包括本文在表B中所闡述之分離之有義及反義股。

術語「B型肝炎病毒」(縮寫為HBV)係指正嗜肝DNA病毒屬之病毒種類，其為嗜肝DNA病毒科之病毒的一部分，且能夠在人類中引起肝臟炎症。

術語「D型肝炎病毒」(縮寫為HDV)係指D型肝炎病毒屬之病毒物質，其能夠在人類中引起肝臟炎症。

如本文所用之術語「小干擾RNA」或「siRNA」係指能夠當siRNA位於與目標基因或序列相同之細胞中時降低或抑制目標基因或序列之表現(例如藉由調節與siRNA序列互補之mRNA的降解或抑制其轉譯)的雙股RNA(亦即雙鏈體RNA)。siRNA可與目標基因或序列具有實質或完全一致性，或可包含錯配之區域(亦即錯配基元)。在某些實施例中，siRNA之長度可為約19-25個(雙鏈體)核苷酸，且較佳地長度之約20-24、21-22或21-23個(雙鏈體)核苷酸。siRNA雙鏈體可包含約1至約4個核苷酸或約2至約3個核苷酸之3'個突出物及5'磷酸酯末端。siRNA之實例包括但不限於由兩個單獨股分子組裝之雙股聚核苷酸分子，其中一條股為有義股而另一條股為互補反義股。

較佳地，siRNA為化學合成的。亦可藉由用大腸桿菌(*E. coli*) RNase酶III或Dicer裂解較長之dsRNA (例如長度大於約25個核苷酸之dsRNA)來產生siRNA。此等酶將dsRNA加工成生物活性siRNA (參見例如Yang等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002)；Calegari等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002)；Byrom等人，*Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003)；Kawasaki等人，*Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003)；Knight等人，*Science*, 293:2269-2271 (2001)；及Robertson等人，*J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968))。較佳地，dsRNA之長度為至少50個核苷酸至約100、200、300、400或500個核苷酸。dsRNA之長度可長達1000、1500、2000、5000個核苷酸或更長。dsRNA可編碼整個基因轉錄物或部分基因轉錄物。在某些情況下，siRNA可由質粒編碼(例如轉錄為自動摺疊成具有髮夾環之雙鏈體的序列)。

片語「抑制目標基因之表現」係指siRNA沈默、降低或抑制目標基因(例如HBV基因組內之基因)之表現的能力。為檢驗基因沈默之程度，將測試樣品(例如來自表現目標基因之相關有機體之生物樣品或表現目標基因之培養物中的細胞樣品)與沈默、降低或抑制目標基因之表現的siRNA接觸。將目標基因在測試樣品中之表現與目標基因在不與siRNA接觸之對照樣品(例如來自表現目標基因之相關有機體的生物樣品或表現目標基因之培養物中的細胞樣品)中之表現相比較。可為對照樣品(例如表現目標基因之樣品)分配100%之值。在特定實施例中，當測試樣品之值相對於對照樣品(例如僅緩衝液、靶向不同基因之siRNA序列、錯義siRNA序列等)為約100%、99%、98%、97%、

96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時達成目標基因之表現的沈澱、抑制或降低。適合之分析包括但不限於使用熟習此項技術者已知之技術檢驗蛋白質或mRNA水準，諸如熟習此項技術者已知之斑點墨點法(dot blot)、北方墨點法(Northern blot)、原位雜交、ELISA、免疫沈澱、酶功能以及表型分析。治療性核酸(諸如siRNA)之「有效量」或「治療有效量」為與在不存在siRNA之情況下偵測到之正常表現水準相比足以產生所要效應(例如目標序列之表現的抑制)的量。在特定實施例中，當相對於對照(例如僅緩衝液、靶向不同基因之siRNA序列、錯義siRNA序列等)使用siRNA所獲得之值為約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%時達成目標基因或目標序列之表現的抑制。適合用於量測目標基因或目標序列之表現的分析包括但不限於使用熟習此項技術者已知之技術檢驗蛋白質或mRNA水準，諸如熟習此項技術者已知之斑點墨點法、北方墨點法、原位雜交、ELISA、免疫沈澱、酶功能以及表型分析。

如本文所用之術語「核酸」係指呈單股或雙股形式之含有至少兩個核苷酸(亦即脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合物且包括DNA及RNA。「核苷酸」含有脫氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、鹼基及磷酸酯

基。核苷酸通過磷酸酯基鍵聯在一起。「鹼」包括嘌呤及嘧啶，其進一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷及天然類似物以及嘌呤及嘧啶之合成衍生物，其包括但不限於放置諸如但不限於胺、醇、硫醇、甲酸酯及鹵代烷之新的反應基團的修飾形式。核酸包括含有已知核苷酸類似物或經修飾之主鏈殘基或鍵聯之核酸，其為合成的、天然存在的及非天然存在的，且其具有與參考核酸類似之結合特性。此類類似物及/或經修飾殘基之實例包括但不限於硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸及肽-核酸(PNA)。另外，核酸可包括一或多個UNA部分。

術語「核酸」包括任何寡核苷酸或聚核苷酸，其中含有至多60個核苷酸之片段通常稱為寡核苷酸，而更長之片段稱為聚核苷酸。脫氧核糖寡核苷酸由稱為脫氧核糖之5-碳糖在此糖之5'及3'碳處共價連接至磷酸酯以形成交替不分枝聚合物而組成。DNA可呈例如反義分子、質粒DNA、預凝聚DNA、PCR產物、載體、表現盒、嵌合序列、染色體DNA或此等基團之衍生物及組合的形式。核糖寡核苷酸由其中5-碳糖為核糖之類似重複結構組成。RNA可呈例如小干擾RNA (siRNA)、Dicer-受質dsRNA、小髮夾RNA (shRNA)、不對稱干擾RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA (vRNA)及其組合的形式。因此，術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」係指由天然存在之鹼基、糖及糖間(主鏈)鍵聯組成的核苷酸或核苷單體之聚合物或寡聚物。術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」亦包括包含非天然存在之單體或其類似地發揮作用之部分的聚合物或寡聚

物。此類經修飾或取代之寡核苷酸與天然形式相比由於諸如增強之細胞攝入、降低之免疫原性及在核酸酶存在下增加之穩定性的特性而經常為較佳的。

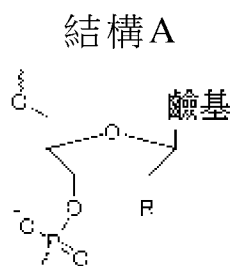
除非另外指出，否則特定核酸序列亦隱式地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)、等位基因、異種同源物、SNP及互補序列以及明確指出之序列。特定而言，可藉由產生其中一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代的序列來達成簡併密碼子取代(Batzer等人，*Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991)；Ohtsuka等人，*J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985)；Rossolini等人，*Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994))。

「分離」或「純化」之DNA分子或RNA分子為遠離天然環境存在之DNA分子或RNA分子。分離之DNA分子或RNA分子可以純化形式存在或可存在於非天然環境(諸如轉基因宿主細胞)中。舉例來說，「分離」或「純化」之核酸分子或其生物活性部分實質上不含其他細胞材料，或當藉由重組技術產生時實質上不含培養基，或當化學合成時實質上不含化學前驅體或其他化學品。在一個實施例中，「分離」之核酸不含在衍生核酸之有機體之基因組DNA中天然地側接核酸之序列(亦即位於核酸之5'及3'末端的序列)。舉例來說，在各個實施例中，分離之核酸分子可含有在衍生核酸之細胞的基因組DNA中天然地側接核酸分子之小於約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb或0.1 kb之核苷酸序列。

術語「基因」係指包含為製備多肽或前驅體多肽所必需之部分長度或整個長度的編碼序列之核酸(例如DNA或RNA)序列。

如本文所用，「基因產物」係指基因之產物，諸如RNA轉錄物或多肽。

術語「解鎖核鹼基類似物」(縮寫為「UNA」)係指其中核糖環之C2'及C3'原子未共價鍵聯之非環核鹼基。術語「解鎖核鹼基類似物」包括具有以下識別為結構A之結構的核鹼基類似物：



其中R為羥基，且鹼基為任何天然或非天然鹼基，諸如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及胸腺嘧啶(T)。UNA包括在美國專利第8,314,227號中識別為非環2'-3'-斷-核苷酸單體之分子。

術語「脂質」係指一組有機化合物，其包括但不限於脂肪酸之酯且特點在於不溶於水，但可溶於許多有機溶劑。其通常分成至少三個類別：(1)「簡單脂質」，其包括脂肪及油以及蠟；(2)「複合脂質」，其包括磷脂及醯脂；及(3)「衍生脂質」，諸如類固醇。

術語「脂質粒子」包括可用於將治療性核酸(例如siRNA)遞送至相關目標位點(例如細胞、組織、器官及類似位點)之脂質調配物。在較佳實施例中，脂質粒子典型地由陽離子脂質、非陽離子脂質及視情況存在之防止粒子聚集之結合型脂質形成。包括核酸分子(例如siRNA分子)之脂質粒子稱為核酸-脂質粒子。典型地，核酸完全囊封於脂質粒子內，藉此防止核酸發生酶促降解。

在某些情況下，核酸-脂質粒子極其適合用於全身性應用，因為

其在靜脈內(i.v.)注射後可展現延長之循環壽命，其可在遠端位點(例如與投與位點實體分離之位點)累積，且其可介導目標基因在此等遠端位點之表現的沈默。核酸可與凝聚劑複合且囊封於如PCT公開案第WO 00/03683號中所闡述之脂質粒子內，該公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm之平均直徑，且為實質上無毒的。此外，核酸當存在於脂質粒子中時在水溶液中對使用核酸酶降解具抗性。核酸-脂質粒子及其製備方法揭示於例如美國專利公開案第20040142025號及第20070042031號中，該等專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

如本文所用，「囊封之脂質」可指為治療性核酸(諸如siRNA)提供完全囊封、部分囊封或兩者之脂質粒子。在一較佳實施例中，核酸(例如siRNA)完全囊封於脂質粒子中(例如以形成核酸-脂質粒子)。

術語「脂質結合物」係指抑制脂質粒子之聚集的結合型脂質。此類脂質結合物包括但不限於PEG-脂質結合物，諸如偶合至二烷氧基丙基之PEG(例如PEG-DAA結合物)、偶合至二醯基甘油之PEG(例

如PEG-DAG結合物)、偶合至膽固醇之PEG、偶合至磷脂醯乙醇胺之PEG及結合至神經醯胺之PEG (參見例如美國專利第5,885,613號)、陽離子PEG脂質、聚噁唑啉(POZ)-脂質結合物(例如POZ-DAA結合物)、聚醯胺寡聚物(例如ATTA-脂質結合物)及其混合物。POZ-脂質結合物之其他實例描述於PCT公開案第WO 2010/006282號中。PEG或POZ可直接結合至脂質或可經由連接子部分鍵聯至脂質。可使用適合用於將PEG或POZ偶合至脂質之任何連接子部分,包括例如不含酯連接子部分及含酯連接子部分。在某些較佳實施例中,使用不含酯連接子部分,諸如醯胺或胺基甲酸酯。

術語「兩親脂質」部分指其中脂質材料之疏水性部分取向至疏水相中,而親水性部分朝向水相取向的任何適合之材料。親水性特徵衍生自極性或帶電荷基團之存在,諸如碳水化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根合、胺基、硫氫基、硝基、羥基及其他類似基團。可藉由包括非極性基團來賦予疏水性,該等非極性基團包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂肪烴基且此類基團由一或多個芳族、環脂族或雜環基取代。兩親化合物之實例包括但不限於磷脂、胺基脂及神經鞘脂。

磷脂之代表性實例包括但不限於磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、磷脂酸、棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯乙醇胺、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼及二亞油醯基磷脂醯膽鹼。缺乏磷之其他化合物(諸如神經鞘脂、醣神經鞘脂家族、二醯基甘油及 β -醯氧基酸)亦在命名為兩親脂質之基團內。另外,上文所描述之兩親脂質可與包括三酸甘油酯及固醇之其他脂質混合。

術語「中性脂類」係指在所選pH值下以不帶電荷或中性之兩性離子形式存在之許多脂質物質中之任一者。在生理pH值下，此類脂質包括例如二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺、神經鞘磷脂、腦磷脂、膽固醇、腦苷脂及二醯基甘油。

術語「非陽離子脂質」係指任何兩親脂質以及任何其他中性脂類或陰離子脂質。

術語「陰離子脂質」係指在生理pH值下帶負電荷之任何脂質。此等脂質包括但不限於磷脂醯甘油、心磷脂、二醯基磷脂醯絲胺酸、二醯基磷脂酸、N-十二烷醯磷脂醯乙醇胺、N-丁二醯磷脂醯乙醇胺、N-戊二醯基磷脂醯乙醇胺、離胺醯基磷脂醯甘油、棕櫚醯基油醯基磷脂醯甘油(POPG)及連接至中性脂質之其他陰離子修飾基團。

術語「疏水脂質」係指具有包括但不限於長鏈飽和及不飽和脂肪烴基之非極性基團之化合物，且此類基團視情況由一或多個芳族、環脂族或雜環基取代。適合之實例包括但不限於二醯基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基胺基、1,2-二醯氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺基丙烷。

術語「陽離子脂質」及「胺基脂」在本文中可互換地用於包括具有一個、兩個、三個或更多個脂肪酸或脂肪烷基鏈及pH可滴定之胺基頭部基團(例如烷基胺基或二烷基胺基頭部基團)之彼等脂質及其鹽。陽離子脂質在低於陽離子脂質之 pK_a 的pH值下典型地為質子化的(亦即帶正電荷的)，且在高於 pK_a 之pH值下為實質上中性的。陽離子脂質亦可稱為可滴定陽離子脂質。在一些實施例中，陽離子脂質包含：可質子化三級胺(例如pH可滴定)頭部基團； C_{18} 烷基鏈，其中各

烷基鏈獨立地具有0至3 (例如0, 1, 2, 或3)個雙鍵；及醚、酯或頭部基團與烷基鏈之間的縮酮鍵聯。此類陽離子脂質包括但不限於DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (亦稱為DLin-C2K-DMA、XTC2及C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA (亦稱為MC2)及DLin-M-C3-DMA (亦稱為MC3)。

術語「鹽」包括任何陰離子及陽離子複合物，諸如陽離子脂質與一或多種陰離子之間形成的複合物。陰離子之非限制性實例包括無機及有機陰離子，例如氫離子、氟離子、氯離子、溴離子、碘離子、草酸根(例如半草酸根)、磷酸根、磷酸根、磷酸氫根、磷酸二氫根、氧離子、碳酸根、碳酸氫根、硝酸根、亞硝酸根、氮離子、亞硫酸氫根、硫離子、亞硫酸根、硫酸氫根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氫根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、檸檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、反丁烯二酸根、順丁烯二酸根、衣康酸根、羥乙酸根、葡糖酸根、蘋果酸根、苦杏仁酸根、惕各酸根、抗壞血酸根、水楊酸根、聚甲基丙烯酸根、過氯酸根、氯酸根、亞氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亞砷酸根、鉻酸根、重鉻酸根、氰離子、氰酸根、硫氰酸根、氫氧根、過氧離子、高錳酸根及其混合物。在特定實施例中，本文揭示之陽離子脂質的鹽為結晶鹽。

術語「烷基」包括含有1至24個碳原子之直鏈或分枝鏈、非環狀或環狀、飽和脂族烴。代表性飽和直鏈烷基包括但不限於甲基、乙

基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基及類似基團，而飽和分支鏈烷基包括但不限於異丙基、第二-丁基、異丁基、第三丁基、異戊基及類似基團。代表性飽和環狀烷基包括但不限於環丙基、環丁基、環戊基、環己基及類似基團，而不飽和環狀烷基包括但不限於環戊烯基、環己烯基及類似基團。

術語「烯基」包括如上文所定義之烷基，其在相鄰碳原子之間含有至少一個雙鍵。烯基包括順式與反式異構體兩者。代表性直鏈及分枝鏈烯基包括但不限於乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、異丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基及類似基團。

術語「炔基」包括如上文所定義之任何烷基或烯基，其在相鄰雙鍵之間另外含有至少一個三鍵。代表性直鏈及分枝鏈炔基包括但不限於乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基及類似基團。

術語「醯基」包括任何烷基、烯基或炔基，其中附接點處之碳經如下文所定義之側氧基取代。以下為醯基之非限制性實例： $-\text{C}(=\text{O})$ 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})$ 烯基及 $-\text{C}(=\text{O})$ 炔基。

術語「雜環」包括5員至7員單環、或7員至10員雙環、雜環，其為飽和、不飽和或芳族的，且其含有1或2個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子，且其中氮及硫雜原子可視情況經氧化，且氮雜原子可視情況經四級鉍化，包括其中以上雜環中之任一者融合至苯環的雙環。雜環可經由任何雜原子或碳原子附接。雜環包括但不限於如下文所定義之雜芳基，以及嗎啉基、吡咯啉酮基、吡咯啉基、哌啉基、哌嗪基

(piperizynyl)、乙內醯脲基(hydantoinyl)、戊內醯胺基(valerolactamyl)、氧雜環丙烷基、氧雜環丁烷基、四氫呋喃基、四氫吡喃基、四氫吡啶基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻喃基、四氫嘧啶基、四氫噻吩基、四氫噻喃基及類似基團。

術語「視情況經取代之烷基」、「視情況經取代之烯基」、「視情況經取代之炔基」、「視情況經取代之醯基」及「視情況經取代之雜環」意謂當經取代時，至少一個氫原子經取代基置換。在側氧基取代基(=O)之情況下，兩個氫原子經置換。在此方面，取代基包括但不限於側氧基、鹵素、雜環、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}^x$ 、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ ，其中 n 為0、1或2， R^x 及 R^y 為相同或不同的且獨立地為氫、烷基或雜環，且烷基及雜環取代基中之每一者可進一步經以下中之一或多者取代：側氧基、鹵素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、烷基、 $-\text{OR}^x$ 、雜環、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 及 $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ 。術語「視情況經取代」當在一系列取代基之前使用時，意謂系列中之取代基中的每一者可如本文所描述視情況經取代。

術語「鹵素」包括氟、氯、溴及碘。

術語「膜融合」係指脂質粒子與細胞之膜融合的能力。膜可為質膜或細胞器(例如內體、核等)周圍之膜。

如本文所用，術語「水溶液」係指完全或部分包含水之組合物。

如本文所用，術語「有機脂質溶液」係指完全或部分包含具有

脂質之有機溶劑的組合物。

術語「電子緻密核心」當用於描述脂質粒子時係指當使用低溫透射電子顯微術(「cryoTEM」)目視觀察時脂質粒子之內部部分的深色外觀。一些脂質粒子具有電子緻密核心且缺乏脂質雙層結構。一些脂質粒子具有電子緻密核心，缺乏脂質雙層結構，且具有反六角或立方體相結構。雖然不希望受理論限制，但認為非雙層脂質填充提供內部含有水及核酸之脂質圓筒之3維網狀結構，亦即基本上為與含有核酸之水性通道互相滲透的脂質微滴。

如本文所用之「遠端位點」係指實體上隔開之位點，其不限於鄰近毛細管床，但包括廣泛分佈於有機體中之位點。

與核酸-脂質粒子相關之「血清穩定」意謂粒子在暴露於血清或會顯著降解游離DNA或RNA之核酸酶分析之後未顯著降解。適合之分析包括例如標準血清分析、DNA酶分析或RNA酶分析。

如本文所用之「全身遞送」係指遞送脂質粒子，從而引起諸如siRNA之活性劑在有機體內之廣泛生物分佈。一些投與技術可引起某些藥劑之全身遞送，但其他則不。全身遞送意謂適用、較佳治療量之藥劑暴露於身體之大多數部分。為獲得廣泛生物分佈，通常需要使得藥劑在到達投與位點遠端之疾病位點之前不快速降解或清除(諸如藉由第一道器官(肝臟、肺臟等)或藉由快速、非特異性細胞結合)的血液壽命。脂質粒子之全身遞送可藉由此項技術中已知之包括例如靜脈內、皮下及腹膜內的任何手段來進行。在一較佳實施例中，脂質粒子之全身遞送係藉由靜脈內遞送進行。

如本文所用之「局部遞送」係指將諸如siRNA之活性劑直接遞送

至有機體內的目標位點。舉例來說，可藉由直接注射至疾病位點、其他目標位點或目標器官(諸如肝臟、心臟、胰腺、腎臟及類似器官)中來局部遞送藥劑。

如本文所用之術語「病毒粒子負荷」係指存在於人體流體(諸如血液)中之病毒粒子(例如HBV及/或HDV)的數目的度量。舉例來說，粒子負荷可以每毫升例如血液之病毒粒子數目來表示。可使用基於核酸擴增之測試以及不基於核酸之測試來進行粒子負荷測試(參見例如 Puren等人，The Journal of Infectious Diseases, 201:S27-36 (2010))。

術語「哺乳動物」係指任何哺乳動物物種，諸如人類、小鼠、大鼠、犬、貓、倉鼠、豚鼠、兔、牲畜及類似物種。

表A

名稱	雙鏈體序列	IC 50 (nM)
1m	5' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>U</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31
5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0.05

7m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0.06
8m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	0.24
9m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>u</u> C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	0.13
10m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)	0.34
11m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	0.31
12m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)	0.16
13m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	0.2
14m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)	0.16
15m	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29) 3' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	0.17
小寫= 2'O-甲基修飾 下劃線= UNA 部分		

寡核苷酸(諸如闡述於表B中之有義及反義RNA股)特異性雜交至目標聚核苷酸序列或與目標聚核苷酸序列互補。如本文所用之術語「可特異性雜交」及「互補」指示足以使得DNA或RNA目標與寡核苷酸之間發生穩定及特異性結合之互補程度。應瞭解，寡核苷酸不需要與其要可特異性雜交之目標核酸序列100%互補。在較佳實施例中，

當寡核苷酸結合至目標序列妨礙目標序列之正常功能從而引起由其產生之功效或表現損失，且存在在需要特異性結合之條件下，亦即在活體內分析或治療性治療之情況下的生理條件下或在活體外分析之情況下在進行分析之條件下足以避免寡核苷酸非特異性結合至非目標序列之互補程度時，寡核苷酸為可特異性雜交的。因此，寡核苷酸與其所靶向或與其特異性雜交之基因或mRNA序列之區域相比可包括1、2、3或更多個鹼基取代。

表B.

名稱	有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
1m	<u>Ag</u> GuAU <u>gu</u> UGCCCgUuUGUU <u>U</u> (SEQ ID NO:1)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACCU <u>U</u> U (SEQ ID NO:2)
2m	<u>GC</u> ucAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:3)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:4)
3m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGC <u>uu</u> CAU <u>U</u> (SEQ ID NO:5)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:6)
4m	<u>GC</u> ucAgUUUACUAGUGCcAU <u>U</u> (SEQ ID NO:7)	UGGCACUAGuAAACUGAgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:8)
5m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGC <u>u</u> UCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:9)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:10)
6m	<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUGU <u>U</u> (SEQ ID NO:11)	CACUAgUAAACUgAgCCAGU <u>U</u> (SEQ ID NO:12)
7m	<u>CCG</u> UguGCACUuCGC <u>u</u> UCAU <u>U</u> (SEQ ID NO:13)	UGAAGCGAAGUgCACACgGU <u>U</u> (SEQ ID NO:14)
8m	<u>GC</u> uCAGUUUACuAgUGCCA <u>U</u> U (SEQ ID NO:15)	UGGCACUAGUAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:16)
9m	<u>Ag</u> GuAU <u>Gu</u> UGCCCgUuUGUU <u>U</u> (SEQ ID NO:17)	ACAAACgGGCAAC <u>Au</u> ACCU <u>U</u> U (SEQ ID NO:18)
10m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>C</u> ugCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:19)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:20)
11m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>C</u> ugCggAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:21)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:22)
12m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:23)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:24)
13m	<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAAU <u>U</u> (SEQ ID NO:25)	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU <u>U</u> (SEQ ID NO:26)
14m	<u>GC</u> uCAGUUUACuAgUGCCA <u>U</u> U (SEQ ID NO:27)	UGGCACUAGUAAACuGAGCU <u>U</u> (SEQ ID NO:28)
15m	<u>C</u> ugGCuCAGUUuACUAGUG <u>U</u> U (SEQ ID NO:29)	CACUAGUAAACUGAgCCAGU <u>U</u> (SEQ ID NO:30)
小寫= 2'O-甲基修飾 下劃線= UNA 部分		

產生siRNA分子

可以若干形式提供 siRNA，包括例如以一或多種分離之小干擾 RNA (siRNA) 雙鏈體之形式、以較長雙股 RNA (dsRNA) 之形式或以在 DNA 質粒中自轉錄盒轉錄之 siRNA 或 dsRNA 之形式。在一些實施例中，可酶促或藉由部分/完全有機合成來產生 siRNA，且可藉由活體外酶促或有機合成來引入經修飾之核糖核苷酸。在某些情況下，各股為以化學方式製備的。合成 RNA 分子之方法為此項技術中已知的，例如如 Verma 及 Eckstein (1998) 中所描述或如本文所描述之化學合成方法。

分離 RNA、合成 RNA、雜交核酸、製備及篩選 cDNA 文庫及進行 PCR 之方法為此項技術中熟知的(參見例如 Gubler 及 Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook 等人，同上；Ausubel 等人，同上)，PCR 方法亦如此(參見美國專利第 4,683,195 號及第 4,683,202 號；*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis 等人編, 1990))。表現文庫亦為熟習此項技術者熟知的。揭示一般方法之其他基礎文本包括 Sambrook 等人，*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第 2 版 1989)；Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990)；及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等人編, 1994)。此等參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

典型地，siRNA 為化學合成的。包含 siRNA 分子之寡核苷酸可使用此項技術中已知之多種技術中之任一者來合成，諸如描述於 Usman 等人，*J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987)；Scaringe 等人，*Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990)；Wincott 等人，*Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684

(1995)；及 Wincott 等人，*Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)中之彼等。寡核苷酸之合成利用常用之核酸保護及偶合基團，諸如在5'-末端之二甲氧基三苯甲基及在3'-末端之亞磷醯胺。作為非限制性實例，可在應用生物系統合成器上使用0.2 μmol 規模方案進行小規模合成。或者，可在來自 Protogene (Palo Alto, CA)之96-孔板合成器上進行0.2 μmol 規模之合成。然而，更大或更小規模之合成亦在範疇內。適合用於寡核苷酸合成之試劑、用於RNA去保護之方法及用於RNA純化之方法為熟習此項技術者已知的。

siRNA分子可由兩個不同的寡核苷酸組裝，其中一個寡核苷酸包含有義股而另一個包含siRNA之反義股。舉例來說，各股可分開合成且在合成及/或去保護之後藉由雜交或連結而連接在一起。

含有治療性核酸之載體系統

脂質粒子

脂質粒子可包含一或多種siRNA（例如描述於表A中之siRNA分子）、陽離子脂質、非陽離子脂質及抑制粒子聚集之結合型脂質。在一些實施例中，siRNA分子完全囊封於脂質粒子之脂質部分內，使得脂質粒子中之siRNA分子在水溶液中對核酸酶降解具抗性。在其他實施例中，本文所描述之脂質粒子對諸如人類之哺乳動物為實質上無毒的。脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm或約70至約90 nm之平均直徑。在某些實施例中，脂質粒子具有約30 nm至約150 nm之中值直徑。脂質粒子亦典型地具有約1:1至約100:1、約1:1至約50:1、約2:1至約25:1、約3:1至約20:1、約5:1至約15:1或約5:1至

約10:1之脂質:核酸比率(例如脂質:siRNA比率)(質量/質量比)。在某些實施例中，核酸-脂質粒子具有約5:1至約15:1之脂質:siRNA質量比。

脂質粒子包括血清穩定之核酸-脂質粒子，其包含一或多種siRNA分子(例如如表A中所描述之siRNA分子)、陽離子脂質(例如如本文所闡述之一或多種式I-III之陽離子脂質或其鹽)、非陽離子脂質(例如一或多種磷脂與膽固醇之混合物)及抑制粒子聚集之結合型脂質(例如一或多種PEG-脂質結合物)。脂質粒子可包含靶向本文所描述之基因中之一或多者的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多種siRNA分子(例如描述於表A中之siRNA分子)。核酸-脂質粒子及其製備方法描述於例如美國專利第5,753,613號；第5,785,992號；第5,705,385號；第5,976,567號；第5,981,501號；第6,110,745號；及第6,320,017號；及PCT公開案第WO 96/40964號中，其揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在核酸-脂質粒子中，一或多種siRNA分子(例如如表A中所描述之siRNA分子)可完全囊封於粒子之脂質部分內，藉此防止siRNA發生核酸酶降解。在某些情況下，核酸-脂質粒子中之siRNA在粒子在37℃下暴露於核酸酶之後至少約20、30、45或60分鐘實質上不降解。在某些其他情況下，核酸-脂質粒子中之siRNA在將粒子在37℃下在血清中孵育至少約30、45或60分鐘或至少約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小時之後實質上不降解。在其他實施例中，siRNA與粒子之脂質部分複合。調配物之益處之一在於核酸-脂質粒子組合物對諸如人類之哺乳動物實質

上無毒的。

術語「完全囊封」表明核酸-脂質粒子中之siRNA (例如如表A中所描述之siRNA分子)在暴露於血清或將顯著降解游離DNA或RNA核酸酶分析之後未顯著降解。在完全囊封之系統中，在一般將降解100%之游離siRNA的治療中，較佳粒子中少於約25%之siRNA降解，更佳粒子中少於約10%，且最佳少於約5%之siRNA降解。「完全囊封」亦表明核酸-脂質粒子為血清穩定的，亦即其在活體內投與後不快速分解成其組成部分。

在核酸之情形中，可藉由進行膜不可滲透性螢光染料排除分析來確定完全囊封，其使用當與締合相關時具有增強之螢光的染料。特定染料(諸如OliGreen®及RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA))可用於質粒DNA、單股脫氧核糖核苷酸及/或單股或雙股核糖核苷酸之定量測定。藉由添加染料至脂質體調配物，量測所得螢光，且將其與添加少量非離子洗滌劑後所觀測到之螢光相比較來確定囊封。洗滌劑介導之脂質體雙層破壞釋放囊封之核酸，從而允許其與膜不可滲透性染料相互作用。核酸囊封率可以 $E = (I_o - I)/I_o$ 形式計算，其中 I 及 I_o 係指添加洗滌劑之前及之後的螢光強度(參見Wheeler等人，*Gene Ther.*, 6:271-281 (1999))。

在一些情況下，核酸-脂質粒子組合物包含完全囊封於粒子之脂質部分內的siRNA分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約

85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何部分或其中之範圍)之粒子具有囊封於其中之siRNA。

在其他情況下，核酸-脂質粒子組合物包含完全囊封於粒子之脂質部分內的siRNA分子，使得約30%至約100%、約40%至約100%、約50%至約100%、約60%至約100%、約70%至約100%、約80%至約100%、約90%至約100%、約30%至約95%、約40%至約95%、約50%至約95%、約60%至約95%、約70%至約95%、約80%至約95%、約85%至約95%、約90%至約95%、約30%至約90%、約40%至約90%、約50%至約90%、約60%至約90%、約70%至約90%、約80%至約90%或至少約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何部分或其中之範圍)之輸入siRNA囊封於粒子中。

視脂質粒子之預期用途而定，可改變組分之比例且可使用例如內體釋放參數(ERP)分析來量測特定調配物之遞送效率。

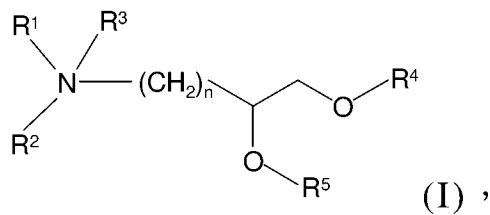
陽離子脂質

多種陽離子脂質或其鹽中之任一者可單獨或與一或多種其他陽離子脂質物質或非陽離子脂質物質組合用於脂質粒子中。陽離子脂質包括其(R)及/或(S)對映異構體。

在一個態樣中，陽離子脂質為二烷基脂質。舉例來說，二烷基脂質可包括包含兩個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中烷基鏈中之每一者可經取代或未經取代。在某些實施例中，兩個烷基鏈中之每一者包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在一個態樣中，陽離子脂質為三烷基脂質。舉例來說，三烷基脂質可包括包含三個飽和或不飽和烷基鏈之脂質，其中烷基鏈中之每一者可經取代或未經取代。在某些實施例中，三個烷基鏈中之每一者包含至少例如8個碳原子、10個碳原子、12個碳原子、14個碳原子、16個碳原子、18個碳原子、20個碳原子、22個碳原子或24個碳原子。

在一個態樣中，具有以下結構之式I之陽離子脂質：



或其鹽為適用的，其中：

R^1 及 R^2 為相同或不同的且獨立地為氫(H)或視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基，或 R^1 及 R^2 可連接以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自由氮(N)、氧(O)及其混合物組成之群的雜原子的視情況經取代之雜環；

R^3 不存在或為氫(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供四級胺；

R^4 及 R^5 為相同或不同的且獨立地為視情況經取代之 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中之至少一者包含至少兩個不飽和位點；且

n 為0、1、2、3或4。

在一些實施例中， R^1 及 R^2 獨立地為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一個較佳實施例中， R^1 及 R^2 均為甲基。在其他較佳實施例中， n 為1或2。在其他實施例中，當pH值高於陽離子脂質之 pK_a 時 R^3 不存在，且當pH值低於陽離子脂質之 pK_a 使得胺基頭部基團經質子化時 R^3 為氫。在一替代實施例中， R^3 為視情況經取代之 C_1 - C_4 烷基以提供四級胺。在其他實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基或 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 醯基，其中 R^4 及 R^5 中之至少一者包含至少兩個不飽和位點。

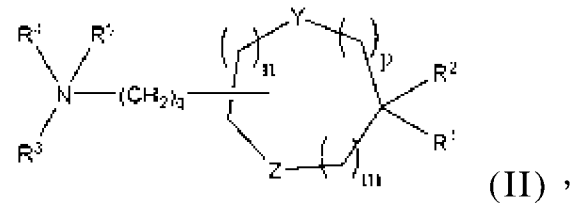
在某些實施例中， R^4 及 R^5 獨立地選自由以下組成之群：十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯醯基部分及二十二碳六烯醯基部分以及其醯基衍生物(例如亞油醯基、亞麻醯基， γ -亞麻醯基等)。在一些情況下， R^4 及 R^5 中之一者包含分支鏈烷基(例如植烷基部分)或其醯基衍生物(例如植烷醯基部分)。在某些情況下，十八碳二烯基部分為亞油烯基部分。在某些其他情況下，十八碳三烯基部分為亞麻烯基部分或 γ -亞麻烯基部分。在某些實施例中， R^4 及 R^5 均為亞油烯基部分、亞麻烯基部分或 γ -亞麻烯基部分。在特定實施例中，式I之陽離子脂質為1,2-二亞油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亞麻烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亞油烯基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亞油醯基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-

DLinDAP)或其混合物。

在一些實施例中，式I之陽離子脂質與一或多種陰離子形成鹽(較佳結晶鹽)。在一個特定實施例中，式I之陽離子脂質為其草酸鹽(例如半草酸鹽)，其較佳為結晶鹽。

諸如DLinDMA及DLenDMA之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060083780號中，該專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如C2-DLinDMA及C2-DLinDAP之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於國際專利申請案第WO2011/000106號中，該專利申請案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在另一態樣中，具有以下結構之式II之陽離子脂質(或其鹽)為適用的：



其中R¹及R²為相同或不同的且獨立地為視情況經取代之C₁₂-C₂₄烷基、C₁₂-C₂₄烯基、C₁₂-C₂₄炔基或C₁₂-C₂₄醯基；R³及R⁴為相同或不同的且獨立地為視情況經取代之C₁-C₆烷基、C₂-C₆烯基或C₂-C₆炔基或R³及R⁴可連接以形成具有4至6個碳原子及1或2個選自氮及氧之雜原子的視情況經取代之雜環；R⁵不存在或為氫(H)或C₁-C₆烷基以提供四級胺；m、n及p為相同或不同的且獨立地為0、1或2，前提條件為m、n及p不同時為0；q為0、1、2、3或4；及Y及Z為相同或不同的且獨立地為O、S或NH。在一較佳實施例中，q為2。

在一些實施例中，式II之陽離子脂質為2,2-二亞油烯基-4-(2-二甲基胺基乙基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-C2-DMA；「XTC2」或「C2K」)、2,2-二亞油烯基-4-(3-二甲基胺基丙基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-C3-DMA；「C3K」)、2,2-二亞油烯基-4-(4-二甲基胺基丁基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-C4-DMA；「C4K」)、2,2-二亞油烯基-5-二甲基胺基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-N-甲基哌嗪并-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-MPZ)、2,2-二亞油烯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二油醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DO-K-DMA)、2,2-二硬脂醯基-4-二甲基胺基甲基-[1,3]-二氧雜環戊烷(DS-K-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-N-(N-嗎啉基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K-MA)、2,2-二亞油烯基-4-三甲基胺基-[1,3]-二氧雜環戊烷氯化物(DLin-K-TMA.Cl)、2,2-二亞油烯基-4,5-雙(二甲基胺基甲基)-[1,3]-二氧雜環戊烷(DLin-K²-DMA)、2,2-二亞油烯基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧雜環戊烷(D-Lin-K-N-甲基哌嗪)或其混合物。在一個實施例中，式II之陽離子脂質為DLin-K-C2-DMA。

在一些實施例中，式II之陽離子脂質與一或多種陰離子形成鹽(較佳結晶鹽)。在一個特定實施例中，式II之陽離子脂質為其草酸鹽(例如半草酸鹽)，其較佳為結晶鹽。

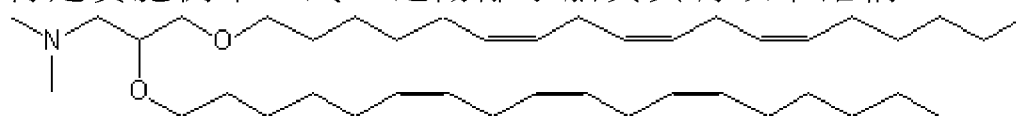
諸如DLin-K-DMA之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該公開案之揭示內容出於所有的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-

實施例中， R^4 及 R^5 獨立地為視情況經取代之 C_2-C_6 或 C_2-C_4 烷基或 C_2-C_6 或 C_2-C_4 烯基。

在一替代實施例中，式III之陽離子脂質在胺基頭部基團與烷基鏈中之一者或兩者之間包含酯鍵聯。在一些實施例中，式III之陽離子脂質與一或多種陰離子形成鹽(較佳結晶鹽)。在一個特定實施例中，式III之陽離子脂質為其草酸鹽(例如半草酸鹽)，其較佳為結晶鹽。

雖然式III中之烷基鏈中之每一者在位置6、9及12處含有順式雙鍵(亦即順,順,順- $\Delta^6, \Delta^9, \Delta^{12}$)，但在一替代實施例中，在一個或兩個烷基鏈中此等雙鍵中之一者、兩者或三者可呈反式構型。

在一特定實施例中，式III之陽離子脂質具有以下結構：



γ -DLenDMA (15)。

諸如 γ -DLenDMA (15)之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於2009年7月1日申請之標題為「Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/222,462號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如Dlin-M-C3-DMA (「MC3」)之陽離子脂質以及其他陽離子脂質(例如MC3之某些類似物)之合成描述於2009年6月10日申請之標題為「Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics」之美國臨時申請案第61/185,800號及2009年12月18日申請之標題為「Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids」之美國臨時申請案第61/287,995號中，該等臨時申請案之揭示

內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

可包括於脂質粒子中之其他陽離子脂質或其鹽之實例包括但不限於諸如描述於WO2011/000106中之彼等陽離子脂質，該專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中，以及諸如以下之陽離子脂質：氯化N,N-二油烯基-N,N-二甲基銨(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DSDMA)、氯化N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨(DOTMA)、溴化N,N-二硬脂基-N,N-二甲基銨(DDAB)、氯化N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)-胺甲醯基)膽固醇(DC-Chol)、溴化N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基銨(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙銨三氟乙酸鹽(DOSPA)、雙十八烷基醯胺基甘胺醯基精胺(DOGS)、3-二甲基胺基-2-(膽固-5-烯-3- β -氧基丁-4-氧基)-1-(順,順-9,12-十八二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(膽固-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧雜戊氧基)-3-二甲基-1-(順,順-9',1-2'-十八二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亞油烯基胺甲醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亞油烯基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亞油烯基氧基-3-(二甲基胺基)乙醯氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亞油烯基氧基-3-(N-嗎啉基)丙烷(DLin-MA)、1,2-二亞油醯基-3-二甲基胺基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亞油烯基硫-3-二甲基胺基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亞油醯基-2-亞油烯基氧基-3-二甲

基胺基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亞油烯基氧基-3-三甲基胺基丙烷氯鹽(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亞油醯基-3-三甲基胺基丙烷氯鹽(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亞油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亞油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基胺基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亞油烯基側氧基-3-(2-N,N-二甲基胺基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基胺甲醯基氧基-3-二甲基胺基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻油醯基-3-二甲基胺基丙烷(DMDAP)、1,2-二油醯基-3-三甲基胺基丙烷氯化物(DOTAP.Cl)、二亞油烯基甲基-3-二甲基胺基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA；亦稱為DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA)及其混合物。可包括於脂質粒子中之其他陽離子脂質或其鹽描述於美國專利公開案第20090023673號中，該專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

諸如CLinDMA之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於美國專利公開案第20060240554號中，該專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP及DLin-EG-DMA之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中，該公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。諸如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP.Cl、DLin-M-C2-DMA之陽離子脂質以及其他陽離子脂質之合成描述於2009年10月9日申請之標題為「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」之PCT申請案第PCT/US2009/060251號

中，該申請案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。許多其他陽離子脂質及相關類似物之合成已描述於美國專利第 5,208,036 號；第 5,264,618 號；第 5,279,833 號；第 5,283,185 號；第 5,753,613 號；及第 5,785,992 號；及 PCT 公開案第 WO 96/10390 號中，該等專利之揭示內容各自出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。另外，可使用陽離子脂質之許多商業製劑，諸如 LIPOFECTIN® (包括可購自 Invitrogen 之 DOTMA 及 DOPE)；LIPOFECTAMINE® (包括可購自 Invitrogen 之 DOSPA 及 DOPE)；及 TRANSFECTAM® (包括可購自 Promega Corp. 之 DOGS)。

在一些實施例中，陽離子脂質佔存在於粒子中之總脂質的約 50 mol% 至約 90 mol%、約 50 mol% 至約 85 mol%、約 50 mol% 至約 80 mol%、約 50 mol% 至約 75 mol%、約 50 mol% 至約 70 mol%、約 50 mol% 至約 65 mol%、約 50 mol% 至約 60 mol%、約 55 mol% 至約 65 mol% 或約 55 mol% 至約 70 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。在特定實施例中，陽離子脂質佔存在於粒子中之總脂質的約 50 mol%、51 mol%、52 mol%、53 mol%、54 mol%、55 mol%、56 mol%、57 mol%、58 mol%、59 mol%、60 mol%、61 mol%、62 mol%、63 mol%、64 mol% 或 65 mol% (或其任何部分)。

在其他實施例中，陽離子脂質佔存在於粒子中之總脂質的約 2 mol% 至約 60 mol%、約 5 mol% 至約 50 mol%、約 10 mol% 至約 50 mol%、約 20 mol% 至約 50 mol%、約 20 mol% 至約 40 mol%、約 30 mol% 至約 40 mol% 或約 40 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

適合用於脂質粒子中之其他陽離子脂質百分比及範圍描述於 PCT

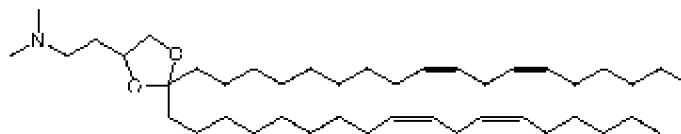
公開案第WO 09/127060號、美國公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國公開申請案第US 2011/0076335號中，該等公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應瞭解，存在於脂質粒子中之陽離子脂質之百分比為目標量，且存在於調配物中之陽離子脂質之實際量可例如在 ± 5 mol%內變化。舉例來說，在一種示例性脂質粒子調配物中，陽離子脂質之目標量為57.1 mol%，但陽離子脂質之實際量可為該目標量 ± 5 mol%、 ± 4 mol%、 ± 3 mol%、 ± 2 mol%、 ± 1 mol%、 ± 0.75 mol%、 ± 0.5 mol%、 ± 0.25 mol%或 ± 0.1 mol%，並且餘量之調配物由其他脂質組分組成(累加至存在於粒子中之總脂肪物質之100 mol%；然而，熟習此項技術者將瞭解總mol%可因四捨五入而略微偏離100%，例如為99.9 mol%或100.1 mol%)。

以下顯示適合包括於脂質粒子中之陽離子脂質之其他實例：



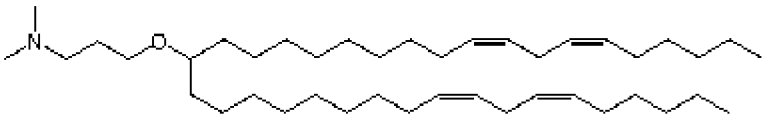
N,N-二甲基-2,3-雙((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基氧基)丙-1-胺(5)



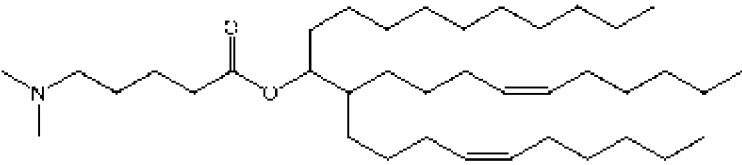
2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧雜環戊-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)



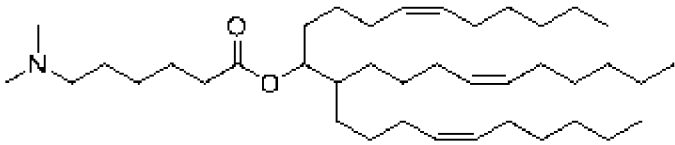
4-(二甲基胺基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基酯(7)



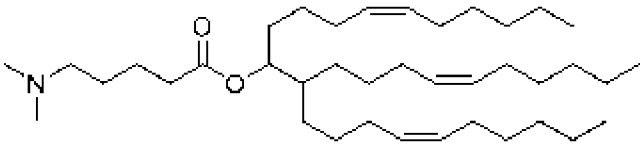
3-(((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)



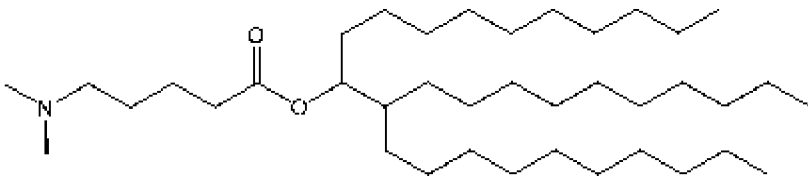
5-(二甲基胺基)戊酸(Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-16-烯-11-基酯(53)



6-(二甲基胺基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-6,16-二烯-11-基酯(11)



5-(二甲基胺基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-6,16-二烯-11-基酯(13)



5-(二甲基胺基)戊酸12-癸基二十二-11-基酯(14)。

非陽離子脂質

用於脂質粒子中之非陽離子脂質可為能夠產生穩定複合物之多種中性不帶電荷、兩性離子或陰離子脂質中之任一者。

非陽離子脂質之非限制性實例包括磷脂，諸如卵磷脂、磷脂醯乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯肌醇、神經鞘磷脂、蛋神經鞘磷脂(ESM)、腦磷脂、心磷脂、磷脂酸、腦苷脂、二鯨蠟基磷酸酯、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯基油醯基-磷脂醯甘油(POPG)、磷脂醯乙醇胺 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基-磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE)、單甲基-磷脂醯乙醇胺、二甲基-磷脂醯乙醇胺、二反油烯醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE)、硬脂醯基油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂醯膽鹼、磷脂醯膽鹼及其混合物。亦可使用其他二醯基磷脂醯膽鹼及二醯基磷脂醯乙醇胺磷脂。此等脂質中之醯基較佳為衍生自具有C₁₀-C₂₄碳鏈之脂肪酸的醯基，例如月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基或油醯基。

非陽離子脂質之其他實例包括固醇，諸如膽固醇及其衍生物。膽固醇衍生物之非限制性實例包括極性類似物，諸如5 α -膽固醇、5 β -膽固醇、膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚、膽甾烯基-(4'-羥基)-丁醚及6-酮膽固醇；非極性類似物，諸如5 α -膽固醇、膽固醇酮、5 α -膽固醇酮、5 β -膽固醇酮及癸酸膽固醇酯；及其混合物。在較佳實施例中，膽固醇衍生物為極性類似物，諸如膽固醇基-(4'-羥基)-丁醚。膽固醇基-(2'-羥基)-乙醚之合成描述於PCT公開案第WO 09/127060號中，該

公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在一些實施例中，存在於脂質粒子中之非陽離子脂質包含一或多種磷脂及膽固醇或其衍生物之混合物或由其組成。在其他實施例中，存在於脂質粒子中之非陽離子脂質包含一或多種磷脂或由其組成，例如不含膽固醇之脂質粒子調配物。在其他實施例中，存在於脂質粒子中之非陽離子脂質包含膽固醇或其衍生物或由其組成，例如不含磷脂之脂質粒子調配物。

適合使用之非陽離子脂質之其他實例包括不含磷之脂質諸如，例如硬脂胺、十二胺、十六胺、棕櫚酸乙醯酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六基酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性丙烯酸聚合物、硫酸三乙醇胺-月桂酯、硫酸烷基-芳酯聚乙氧基化脂肪酸醯胺、溴化雙十八基二甲基銨、神經醯胺、神經鞘磷脂及類似物。

在一些實施例中，非陽離子脂質佔存在於粒子中之總脂質的約10 mol%至約60 mol%、約20 mol%至約55 mol%、約20 mol%至約45 mol%、約20 mol%至約40 mol%、約25 mol%至約50 mol%、約25 mol%至約45 mol%、約30 mol%至約50 mol%、約30 mol%至約45 mol%、約30 mol%至約40 mol%、約35 mol%至約45 mol%、約37 mol%至約45 mol%或約35 mol%、36 mol%、37 mol%、38 mol%、39 mol%、40 mol%、41 mol%、42 mol%、43 mol%、44 mol%或45 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

在脂質粒子含有磷脂與膽固醇或膽固醇衍生物之混合物的實施例中，混合物可佔存在於粒子中之總脂質的多至約40 mol%、45 mol%、50 mol%、55 mol%或60 mol%。

在一些實施例中，混合物中之磷脂組分可佔存在於粒子中之總脂質的約2 mol%至約20 mol%、約2 mol%至約15 mol%、約2 mol%至約12 mol%、約4 mol%至約15 mol%或約4 mol%至約10 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。在某一實施例中，混合物中之磷脂組分佔存在於粒子中之總脂質的約5 mol%至約17 mol%、約7 mol%至約17 mol%、約7 mol%至約15 mol%、約8 mol%至約15 mol%或約8 mol%、9 mol%、10 mol%、11 mol%、12 mol%、13 mol%、14 mol%或15 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。作為非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含約7 mol% (或其任何部分)之磷脂(諸如DPPC或DSPC)，例如在與佔存在於粒子中之總脂質的約34 mol% (或其任何部分)之膽固醇或膽固醇衍生物之混合物中。作為另一非限制性實例，包含磷脂與膽固醇之混合物的脂質粒子調配物可包含約7 mol% (或其任何部分)之磷脂(諸如DPPC或DSPC)，例如在與佔存在於粒子中之總脂質的約32 mol% (或其任何部分)之膽固醇或膽固醇衍生物之混合物中。

再舉一例，適用之脂質調配物具有約10:1之脂質與藥物(例如siRNA)比率(例如9.5:1至11:1或9.9:1至11:1或10:1至10.9:1之脂質:藥物比率)。在某些其他實施例中，適用之脂質調配物具有約9:1之脂質與藥物(例如siRNA)比率(例如8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1，包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1及9.8:1之脂質:藥物比率)。

在其他實施例中，混合物中之膽固醇組分可佔存在於粒子中之總脂質的約25 mol%至約45 mol%、約25 mol%至約40 mol%、約30

mol%至約45 mol%、約30 mol%至約40 mol%、約27 mol%至約37 mol%、約25 mol%至約30 mol%或約35 mol%至約40 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。在某些較佳實施例中，混合物中之膽固醇組分佔存在於粒子中之總脂質的約25 mol%至約35 mol%、約27 mol%至約35 mol%、約29 mol%至約35 mol%、約30 mol%至約35 mol%、約30 mol%至約34 mol%、約31 mol%至約33 mol%或約30 mol%、31 mol%、32 mol%、33 mol%、34 mol%或35 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

在脂質粒子不含磷脂之實施例中，膽固醇或其衍生物可佔存在於粒子中之總脂質的多至約25 mol%、30 mol%、35 mol%、40 mol%、45 mol%、50 mol%、55 mol%或60 mol%。

在一些實施例中，不含磷脂之脂質粒子調配物中之膽固醇或其衍生物可佔存在於粒子中之總脂質的約25 mol%至約45 mol%、約25 mol%至約40 mol%、約30 mol%至約45 mol%、約30 mol%至約40 mol%、約31 mol%至約39 mol%、約32 mol%至約38 mol%、約33 mol%至約37 mol%、約35 mol%至約45 mol%、約30 mol%至約35 mol%、約35 mol%至約40 mol%或約30 mol%、31 mol%、32 mol%、33 mol%、34 mol%、35 mol%、36 mol%、37 mol%、38 mol%、39 mol%或40 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。作為非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔存在於粒子中之總脂質的約37 mol% (或其任何部分)的膽固醇。作為另一非限制性實例，脂質粒子調配物可包含佔存在於粒子中之總脂質的約35 mol% (或其任何部分)的膽固醇。

在其他實施例中，非陽離子脂質佔存在於粒子中之總脂質的約5

mol%至約90 mol%、約10 mol%至約85 mol%、約20 mol%至約80 mol%、約10 mol% (例如僅磷脂)或約60 mol% (例如磷脂及膽固醇或其衍生物)(或其任何部分或其中之範圍)。

適合用於脂質粒子中之其他非陽離子脂質百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國公開申請案第US 2011/0076335號中，該等公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

應瞭解，存在於脂質粒子中之非陽離子脂質的百分比為目標量，且存在於調配物中之非陽離子脂質之實際量可例如在 ± 5 mol%、 ± 4 mol%、 ± 3 mol%、 ± 2 mol%、 ± 1 mol%、 ± 0.75 mol%、 ± 0.5 mol%、 ± 0.25 mol%或 ± 0.1 mol%內變化。

脂質結合物

除陽離子及非陽離子脂質之外，脂質粒子可進一步包含脂質結合物。結合型脂質為適用的，因為其阻止粒子聚集。適合之結合型脂質包括但不限於PEG-脂質結合物、POZ-脂質結合物、ATTA-脂質結合物、陽離子-聚合物-脂質結合物(CPL)及其混合物。在某些實施例中，粒子包含PEG-脂質結合物或ATTA-脂質結合物以及CPL。

在一較佳實施例中，脂質結合物為PEG-脂質。PEG-脂質之實例包括但不限於如例如PCT公開案第WO 05/026372號中所描述之偶合至二烷氧基丙基之PEG (PEG-DAA)、如例如美國專利公開案第20030077829號及第2005008689號中所描述之偶合至二醯基甘油之PEG (PEG-DAG)、偶合至磷脂諸如磷脂醯乙醇胺之PEG (PEG-聚乙

烯)、如例如美國專利第5,885,613號中所描述之結合至神經醯胺之PEG、結合至膽固醇或其衍生物之PEG及其混合物。此等專利文件之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適合使用之其他PEG-脂質包括但不限於mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-胺甲醯基甘油酯(PEG-C-DOMG)。PEG-C-DOMG之合成描述於PCT公開案第WO 09/086558號中,該公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。其他適合之PEG-脂質結合物包括但不限於1-[8'-(1,2-二肉豆蔻醯基-3-丙氧基)-甲醯胺基-3',6'-二氧雜辛基]胺甲醯基- ω -甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG之合成描述於美國專利第7,404,969號中,該專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

PEG為具有兩端羥基之伸乙基PEG重複單元之線性水溶性聚合物。藉由分子量對PEG進行歸類;例如PEG 2000具有約2,000道爾頓(dalton)之平均分子量及PEG 5000具有約5,000道爾頓之平均分子量。PEG可自Sigma Chemical Co.及其他公司商購獲得且包括但不限於以下物質:單甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、單甲氧基聚乙二醇-丁二酸鹽(MePEG-S)、單甲氧基聚乙二醇-丁二酸丁二醯亞胺酯(MePEG-S-NHS)、單甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、單甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(MePEG-TRES)、單甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及含有末端羥基而非末端甲氧基之此類化合物(例如HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其他PEG(諸如描述於美國專利第6,774,180號及第7,053,150號中之彼等,例如mPEG(20 KDa)胺)亦適合用於製備PEG-脂質結合物。此等專利之揭示內容出於

所有目的以全文引用之方式併入本文中。此外，單甲氧基聚乙二醇-乙酸(MePEG-CH₂COOH)特定而言適合用於製備PEG-脂質結合物，包括例如PEG-DAA結合物。

本文所描述之PEG-脂質結合物的PEG部分可包含在約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG部分具有約750道爾頓至約5,000道爾頓(例如約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等)之平均分子量。在較佳實施例中，PEG部分具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。

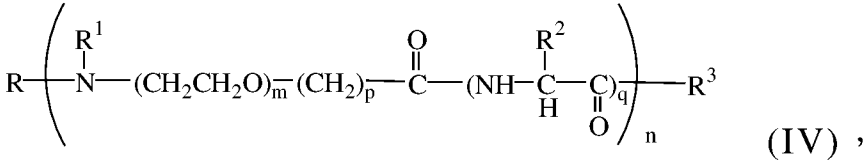
在某些情況下，PEG可視情況經烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。PEG可直接結合至脂質或可經由連接子部分鍵聯至脂質。可使用適合用於將PEG偶合至脂質之任何連接子部分，包括例如不含酯連接子部分及含酯連接子部分。在一較佳實施例中，連接子部分為不含酯連接子部分。如本文所用，術語「不含酯連接子部分」係指不含羧酸酯鍵(-OC(O)-)之連接子部分。適合之不含酯連接子部分包括但不限於醯胺基(-C(O)NH-)、胺基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、胺基甲酸酯(-NHC(O)O-)、脲(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、丁二醯(-(O)CCH₂CH₂C(O)-)、丁二醯胺基(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-)、醚、二硫化物以及其組合(諸如含有胺基甲酸酯連接子部分與醯胺基連接子部分之連接子)。在一較佳實施例中，使用胺基甲酸酯連接子來將PEG偶合至脂質。

在其他實施例中，使用含酯連接子部分來將PEG偶合至脂質。適合之含酯連接子部分包括例如碳酸鹽(-OC(O)O-)、丁二醯基、磷酸酯

(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其組合。

具有不同鏈長度及飽和度之多個醯基鏈基團的磷脂醯乙醇胺可結合至PEG以形成脂質結合物。此類磷脂醯乙醇胺可商購獲得，或可使用熟習此項技術者已知之習知技術分離或合成。含有具有在C₁₀至C₂₀範圍內之碳鏈長度的飽和或不飽和脂肪酸之磷脂醯基-乙醇胺為較佳的。亦可使用具有單不飽和或雙不飽和脂肪酸及飽和與不飽和脂肪酸之混合物的磷脂醯乙醇胺。適合之磷脂醯乙醇胺包括但不限於二肉豆蔻醯基-磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)及二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

術語「ATTA」或「聚醯胺」包括但不限於描述於美國專利第6,320,017號及第6,586,559號中之化合物，該等專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。此等化合物包括具有以下化學式之化合物：



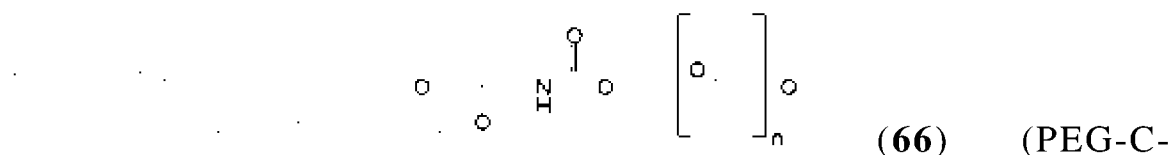
其中R為選自由氫、烷基及醯基組成之群的成員；R¹為選自由氫及烷基組成之群的成員；或視情況，R及R¹及與其結合之氮形成疊氮基部分；R²為選自以下之基團的成員氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳基及胺基酸之側鏈；R³選自由以下組成之群之成員：氫、鹵素、羥基、烷氧基、巰基、胼基、胺基及NR⁴R⁵，其中R⁴及R⁵獨立地為氫或烷基；n為4至80；m為2至6；p為1至4；且q為0或1。其他聚醯胺對熟習此項技術者將可為顯而易見的。

基；PEG為聚乙二醇；及L為如上文所描述之不含酯連接子部分或含酯連接子部分。長鏈烷基可為飽和或不飽和的。適合之烷基包括但不限於癸基(C₁₀)、月桂基(C₁₂)、肉豆蔻基(C₁₄)、棕櫚基(C₁₆)、硬脂基(C₁₈)及二十碳基(C₂₀)。在較佳實施例中，R¹及R²為相同的，亦即R¹與R²均為肉豆蔻基(亦即二肉豆蔻基)，R¹與R²均為硬脂基(亦即二硬脂基)等。

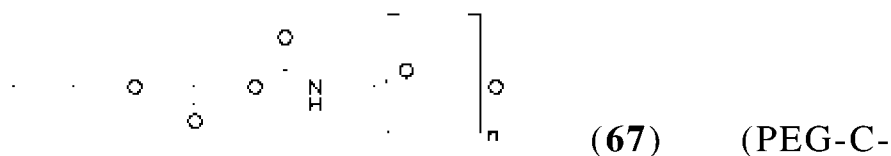
在以上式VII中，PEG具有在約550道爾頓至約10,000道爾頓範圍內之平均分子量。在某些情況下，PEG具有約750道爾頓至約5,000道爾頓(例如約1,000道爾頓至約5,000道爾頓、約1,500道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約3,000道爾頓、約750道爾頓至約2,000道爾頓等)之平均分子量。在較佳實施例中，PEG具有約2,000道爾頓或約750道爾頓之平均分子量。PEG可視情況經烷基、烷氧基、醯基或芳基取代。在某些實施例中，末端羥基經甲氧基或甲基取代。

在一較佳實施例中，「L」為不含酯連接子部分。適合之不含酯連接子包括但不限於醯胺基連接子部分、胺基連接子部分、羰基連接子部分、胺基甲酸酯連接子部分、脲連接子部分、醚連接子部分、二硫化物連接子部分、丁二醯胺基連接子部分及其組合。在一較佳實施例中，不含酯連接子部分為胺基甲酸酯連接子部分(亦即PEG-C-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，不含酯連接子部分為醯胺基連接子部分(亦即PEG-A-DAA結合物)。在另一較佳實施例中，不含酯連接子部分為丁二醯胺基連接子部分(亦即PEG-S-DAA結合物)。

在特定實施例中，PEG-脂質結合物選自：



DMA)；及



DOMG)。

PEG-DAA結合物係使用標準技術及熟習此項技術者已知之試劑來合成。應認識到，PEG-DAA結合物將含有各種醯胺、胺、醚、硫代、胺基甲酸酯及脲鍵聯。熟習此項技術者將認識到，用於形成此等鍵之方法及試劑為熟知且輕易可獲得的。參見例如 March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992)；Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989)；及 Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第5版(Longman 1989)。亦應瞭解，存在之任何官能基可能需要在合成PEG-DAA結合物之不同點進行保護及去保護。熟習此項技術者將認識到，此類技術為熟知的。參見例如 Green及Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

較佳地，PEG-DAA結合物為PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚基氧基丙基(C₁₆)結合物或PEG-氧基丙基(C₁₈)結合物。在此等實施例中，PEG較佳具有約750或約2,000道爾頓之平均分子量。在一個尤其較佳實施例中，PEG-脂質結合物包含PEG2000-C-DMA，其中「2000」表示PEG之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在另一尤其

第 55 頁(發明說明書)

較佳實施例中，PEG-脂質結合物包含PEG750-C-DMA，其中「750」表示PEG之平均分子量，「C」表示胺基甲酸酯連接子部分，且「DMA」表示二肉豆蔻基氧基丙基。在特定實施例中，PEG之末端羥基經甲基取代。熟習此項技術者將輕易地瞭解，其他二烷氧基丙基可用於PEG-DAA結合物中。

除前述內容之外，熟習此項技術者將輕易顯而易知可使用其他親水聚合物替代PEG。可用於代替PEG之適合之聚合物的實例包括但不限於聚乙烯吡咯啉酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥基丙基甲基丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺及聚二甲基丙烯醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸及衍生纖維素，諸如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素。

除前述組分之外，脂質粒子可進一步包含陽離子聚(乙二醇)(PEG)脂質或CPL (參見例如Chen等人，*Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000)；美國專利第6,852,334號；PCT公開案第WO 00/62813號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。

適合之CPL包括式VIII之化合物：



其中A、W及Y如下文所描述。

參考式VIII，「A」為脂質部分，諸如兩親脂質、中性脂質或疏水脂質，其充當脂質錨。適合之脂質實例包括但不限於二醯基甘油基、二烷基甘油基、N-N-二烷基胺基、1,2-二醯氧基-3-胺基丙烷及1,2-二烷基-3-胺基丙烷。

「W」為聚合物或寡聚物，諸如親水聚合物或寡聚物。較佳地，親水聚合物為生物相容性聚合物，其為非免疫原性的或具有低固有免

疫原性。或者，親水聚合物若與適當之佐劑一起使用，則可具弱抗原性。適合之非免疫原性聚合物包括但不限於PEG、聚醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物及其組合。在一較佳實施例中，聚合物具有約250至約7,000道爾頓之分子量。

「Y」為聚陽離子部分。術語聚陽離子部分係指在所選pH值、較佳生理pH值下具有正電荷、較佳至少2個正電荷之化合物、衍生物或官能基。適合之聚陽離子部分包括鹼性胺基酸及其衍生物，諸如精胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、離胺酸及組胺酸；精胺；亞精胺；陽離子樹狀聚體；聚胺；聚胺糖；及胺基多醣。聚陽離子部分之結構可為線性的(諸如線性四離胺酸)、分枝的或樹狀聚合的。聚陽離子部分在所選pH值下具有約2至約15個正電荷，較佳約2至約12個正電荷，且更佳約2至約8個正電荷。選擇哪一聚陽離子部分來採用可由所要粒子應用之類型決定。

聚陽離子部分上之電荷可分佈在整個粒子部分周圍，或者其可在粒子部分之一個特定區域為各別濃度之電荷密度，例如電荷尖峰。若電荷密度分佈於粒子上，則電荷密度可均等分佈或不均等分佈。涵蓋聚陽離子部分之電荷分佈之所有變化型式。

脂質「A」及非免疫原性聚合物「W」可藉由各種方法及較佳藉由共價附接來附接。熟習此項技術者已知之方法可用於「A」與「W」之共價附接。適合之鍵聯包括但不限於醯胺、胺、羧基、碳酸酯、胺基甲酸酯、酯及脰鍵聯。熟習此項技術者將顯而易知，「A」與「W」必須具有互補官能基以實現鍵聯。此兩個基團(一個在脂質上而另一個在聚合物上)之反應將提供所要鍵聯。舉例來說，當脂質

為二醯基甘油，且末端羥基經例如NHS及DCC活化以形成活性酯，且然後與含有胺基之聚合物(諸如與聚醯胺，參見例如美國專利第6,320,017號及第6,586,559號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)反應時，兩個基團之間將形成醯胺鍵。

在某些情況下，聚陽離子部分可具有附接之配位體，諸如目標配位體或用於絡合鈣之螯合部分。較佳地，在附接配位體之後，陽離子部分維持正電荷。在某些情況下，附接之配位體具有正電荷。適合之配位體包括但不限於具有反應性官能基之化合物或裝置且包括脂質、兩親脂質、載體化合物、生物親和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物醫學裝置、分析可偵測之化合物、治療活性化合物、酶、肽、蛋白質、抗體、免疫刺激劑、放射性標記物、螢光團、生物素、藥物、半抗原、DNA、RNA、多醣、脂質體、病毒體、膠束、免疫球蛋白、官能基、其他靶向部分或毒素。

在一些實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔存在於粒子中之總脂質的約0.1 mol%至約3 mol%、約0.5 mol%至約3 mol%或約0.6 mol%、0.7 mol%、0.8 mol%、0.9 mol%、1.0 mol%、1.1 mol%、1.2 mol%、1.3 mol%、1.4 mol%、1.5 mol%、1.6 mol%、1.7 mol%、1.8 mol%、1.9 mol%、2.0 mol%、2.1 mol%、2.2 mol%、2.3 mol%、2.4 mol%、2.5 mol%、2.6 mol%、2.7 mol%、2.8 mol%、2.9 mol%或3 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔存在於粒子中之總脂質的約0 mol%至約20 mol%、約0.5 mol%至約20 mol%、約2 mol%至約20 mol%、約1.5 mol%至約18 mol%、約2 mol%至約15

mol%、約4 mol%至約15 mol%、約2 mol%至約12 mol%、約5 mol%至約12 mol%或約2 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

在其他實施例中，脂質結合物(例如PEG-脂質)佔存在於粒子中之總脂質的約4 mol%至約10 mol%、約5 mol%至約10 mol%、約5 mol%至約9 mol%、約5 mol%至約8 mol%、約6 mol%至約9 mol%、約6 mol%至約8 mol%或約5 mol%、6 mol%、7 mol%、8 mol%、9 mol%或10 mol% (或其任何部分或其中之範圍)。

應瞭解，存在於脂質粒子中之脂質結合物的百分比為目標量，且存在於調配物中之脂質結合物之實際量可例如在 ± 5 mol%、 ± 4 mol%、 ± 3 mol%、 ± 2 mol%、 ± 1 mol%、 ± 0.75 mol%、 ± 0.5 mol%、 ± 0.25 mol%或 ± 0.1 mol%內變化。

適合用於脂質粒子中之其他脂質結合物百分比及範圍描述於PCT公開案第WO 09/127060號、美國公開申請案第US 2011/0071208號、PCT公開案第WO2011/000106號及美國公開申請案第US 2011/0076335號中，該等公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

一般熟習此項技術者將瞭解，脂質結合物之濃度可視所採用之脂質結合物及使脂質粒子變得膜融合之速率而變化。

藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制使脂質結合物自脂質粒子中交換出來之速率及進而使脂質粒子變得膜融合之速率。舉例來說，當PEG-DAA結合物用作脂質結合物時，可例如藉由改變脂質結合物之濃度、藉由改變PEG之分子量或藉由改變PEG-DAA結合上之烷基的鏈長度及飽和度來改變使脂質粒子變得膜融合之速率。此外，

可使用包括例如pH值、溫度、離子強度等之其他變量來改變及/或控制使脂質粒子變得膜融合之速率。在閱讀本發明後對熟習此項技術者來說可用於控制使脂質粒子變得膜融合之速率的其他方法將變得顯而易見。另外，藉由控制脂質結合物之組成及濃度，可控制脂質粒度。

其他載體系統

適合使用之其他基於脂質之載體系統之非限制性實例包括脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030203865號；及Zhang等人，*J. Control Release*, 100:165-180 (2004))、pH值敏感型脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20020192275號)、可逆遮蔽型脂質複合物(參見例如美國專利公開案第20030180950號)、基於陽離子脂質之組合物(參見例如美國專利第6,756,054號；及美國專利公開案第20050234232號)、陽離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030229040號、第20020160038號及第20020012998號；美國專利第5,908,635號；及PCT公開案第WO 01/72283號)、陰離子脂質體(參見例如美國專利公開案第20030026831號)、pH值敏感型脂質體(參見例如美國專利公開案第20020192274號；及AU 2003210303)、抗體包被型脂質體(參見例如美國專利公開案第20030108597號；及PCT公開案第WO 00/50008號)、細胞類型特異性脂質體(參見例如美國專利公開案第20030198664號)、含有核酸及肽之脂質體(參見例如美國專利第6,207,456號)、含有用可釋放親水聚合物衍生之脂質的脂質體(參見例如美國專利公開案第20030031704號)、脂質俘獲型核酸(參見例如PCT公佈第WO 03/057190號及第WO 03/059322號)、脂質囊封型核酸(參見例如美國專利公開案第20030129221號；及美國專利第5,756,122號)、

其他脂質體組合物(參見例如美國專利公開案第20030035829號及第20030072794號；及美國專利第6,200,599號)、脂質體與乳液之穩定混合物(參見例如EP1304160)、乳液組合物(參見例如美國專利第6,747,014號)及核酸微乳液(參見例如美國專利公開案第20050037086號)。

適合使用之基於聚合物之載體系統的實例包括但不限於陽離子聚合物-核酸複合物(亦即聚複合物(polyplex))。為形成聚複合物，核酸(例如siRNA分子，諸如描述於表A中之siRNA分子)典型地與具有線性、分枝、星形或樹狀聚合結構之陽離子聚合物複合，從而使核酸凝聚成能夠與細胞表面之陰離子蛋白聚糖相互作用且藉由胞吞作用進入細胞的帶正電荷之粒子。在一些實施例中，聚複合物包含與諸如以下之陽離子聚合物複合的核酸(例如siRNA分子，諸如描述於表A中之siRNA分子)：聚乙炔亞胺(PEI) (參見例如美國專利第6,013,240號；可自Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA)以活體內jetPEI™ (PEI之線性形式)形式商購獲得)、聚丙炔亞胺(PPI)、聚乙炔吡咯啉酮(PVP)、聚L-離胺酸(PLL)、二乙胺基乙基(DEAE)-右旋糖酐、聚(β-胺基酯) (PAE)聚合物(參見例如Lynn等人，*J. Am. Chem. Soc.*, 123:8155-8156 (2001))、殼聚糖、聚醯胺基胺(PAMAM)樹狀聚體(參見例如Kukowska-Latallo等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4897-4902 (1996))、吡啶(參見例如美國專利第6,620,805號)、聚乙炔醚(參見例如美國專利公開案第20040156909號)、多環脒鎘(參見例如美國專利公開案第20030220289號)、包含一級胺、亞胺、胍及/或咪唑基之其他聚合物(參見例如美國專利第6,013,240號；PCT公開案第WO/9602655號；PCT公開案第

WO95/21931 號；Zhang 等人，*J. Control Release*, 100:165-180 (2004)；及Tiera等人，*Curr. Gene Ther.*, 6:59-71 (2006))及其混合物。在其他實施例中，聚複合物包含如美國專利公開案第20060211643號、第20050222064號、第20030125281號及第20030185890號及PCT公開案第WO 03/066069號中所描述之陽離子聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040071654號中所描述之生物可降解之聚(β -胺基酯)聚合物-核酸複合物；如美國專利公開案第20040142475號中所描述之含有聚合物基質之微粒；如美國專利公開案第20030157030號中所描述之其他微粒組合物；如美國專利公開案第20050123600號中所描述之凝聚核酸複合物；及如AU 2002358514及PCT公開案第WO 02/096551號中所描述之奈米膠囊及微膠囊組合物。

在某些情況下，siRNA可與環糊精或其聚合物複合。基於環糊精之載體系統之非限制性實例包括描述於美國專利公開案第20040087024號中之環糊精修飾型聚合物-核酸複合物；描述於美國專利第6,509,323號、第6,884,789號及第7,091,192號中之線性環糊精共聚物-核酸複合物；及描述於美國專利第7,018,609號中之環糊精聚合物-複合劑-核酸複合物。在某些其他情況下，siRNA可與肽或多肽複合。基於蛋白質之載體系統的實例包括但不限於描述於PCT公開案第WO95/21931號中之陽離子寡肽-核酸複合物。

脂質粒子之製備

其中核酸(例如如表A中所描述之siRNA)俘獲於粒子之脂質部分內且防止降解之核酸-脂質粒子可藉由此項技術中已知之任何方法來形成，包括但不限於連續混合法、直接稀釋法及在線稀釋法。

在特定實施例中，陽離子脂質可包含單獨或與其他陽離子脂質組合之式I-III之脂質或其鹽。在其他實施例中，非陽離子脂質為蛋神經鞘磷脂(ESM)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、1-棕櫚醯基-2-油醯基-磷脂醯膽鹼(POPC)、二棕櫚醯基-磷脂醯膽鹼(DPPC)、單甲基-磷脂醯乙醇胺、二甲基-磷脂醯乙醇胺、14:0 PE (1,2-二肉豆蔻醯基-磷脂醯乙醇胺(DMPE))、16:0 PE (1,2-二棕櫚醯基-磷脂醯乙醇胺(DPPE))、18:0 PE (1,2-二硬脂醯基-磷脂醯乙醇胺(DSPE))、18:1 PE (1,2-二油醯基-磷脂醯乙醇胺(DOPE))、18:1反式PE (1,2-二反油烯醯基-磷脂醯乙醇胺(DEPE))、18:0-18:1 PE (1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(SOPE))、16:0-18:1 PE (1-棕櫚醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺(POPE))、基於聚乙二醇之聚合物(例如PEG 2000、PEG 5000、PEG修飾之二醯基甘油或PEG修飾之二烷氧基丙基)、膽固醇、其衍生物或其組合。

在某些實施例中，經由連續混合法產生核酸-脂質粒子，例如包括以下之方法：提供包含siRNA之水溶液於第一儲集器中，提供有機脂質溶液於第二儲集器中(其中存在於有機脂質溶液中之脂質溶解於有機溶劑中，例如低碳烷醇，諸如乙醇)，及混合水溶液與有機脂質溶液，使得有機脂質溶液與水溶液混合，以便實質上即刻產生脂質囊泡(例如脂質體)，從而將siRNA囊封於脂質囊泡內。此方法及用於執行此方法之設備詳細描述於美國專利公開案第20040142025號中，該專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

將脂質及緩衝溶液連續引入混合環境中(諸如混合室中)之動作使得脂質溶液用緩衝溶液連續稀釋，藉此在混合後實質上即刻產生脂質

囊泡。如本文所用，片語「用緩衝溶液連續稀釋脂質溶液」(及變化型式)通常意調在水化過程中用足以實現囊泡產生之力足夠快速地稀釋脂質溶液。藉由將包含核酸之水溶液與有機脂質溶液混合，有機脂質溶液在緩衝溶液(亦即水溶液)存在下經歷連續逐步稀釋以產生核酸-脂質粒子。

使用連續混合法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何部分或其中之範圍)之尺寸。因此形成之粒子不聚集且視情況經尺寸調節以達成均勻粒度。

在另一實施例中，經由包括以下之直接稀釋法產生核酸-脂質粒子：形成脂質囊泡(例如脂質體)溶液及即刻且直接將脂質囊泡溶液引入含有控制量之稀釋緩衝液的收集容器中。在較佳態樣中，收集容器包括經組態以攪拌收集容器之內容物以促進稀釋之一或多個元件。在一個態樣中，存在於收集容器中之稀釋緩衝液之量實質上等於向其中引入之脂質囊泡溶液之體積。作為非限制性實例，於45%乙醇中之脂質囊泡溶液在引入含有相等體積之稀釋緩衝液之收集容器時將有利地產生更小粒子。

在其他實施例中，經由在線稀釋法產生核酸-脂質粒子，其中含有稀釋緩衝液之第三儲集器流體聯接至第二混合區。在此實施例中，在第一混合區中形成之脂質囊泡(例如脂質體)溶液即刻且直接與第二混合區中之稀釋緩衝液混合。在較佳態樣中，第二混合區包括經佈置使得呈相反180°流形式之脂質囊泡溶液與稀釋緩衝液流相遇之T形連接器；然而，可使用提供更淺角度之連接器，例如約27°至約180°(例如約90°)。泵機構遞送可控制之緩衝液流至第二混合區。在一個態樣中，提供至第二混合區之稀釋緩衝液之流速經控制以實質上等於自第一混合區引入其中之脂質囊泡溶液之流速。此實施例有利地允許更多地控制與第二混合區中之脂質囊泡溶液混合的稀釋緩衝液之流動，且因此亦更多地控制在第二混合製程中緩衝液中之脂質囊泡溶液的濃度。稀釋緩衝液流速之此類控制有利地允許降低之濃度下的小粒度形成。

此等方法及用於執行此等直接稀釋及在線稀釋法之設備詳細描述於美國專利公開案第20070042031號中，該專利公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

使用直接稀釋及在線稀釋法形成之核酸-脂質粒子典型地具有約30 nm至約150 nm、約40 nm至約150 nm、約50 nm至約150 nm、約60 nm至約130 nm、約70 nm至約110 nm、約70 nm至約100 nm、約80 nm至約100 nm、約90 nm至約100 nm、約70至約90 nm、約80 nm至約90 nm、約70 nm至約80 nm、小於約120 nm、110 nm、100 nm、90 nm或80 nm或約30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、

105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nm或150 nm (或其任何部分或其中之範圍)之尺寸。因此形成之粒子不聚集且視情況經尺寸調節以達成均勻粒度。

可藉由可用於對脂質體進行尺寸調節之方法中之任一者對脂質粒子進行尺寸調節。可進行尺寸調節以達成所要尺寸範圍及相對窄之粒度分佈。

可使用若干技術來將粒子尺寸調節至所要尺寸。用於脂質體且同樣適用於本發明之粒子的尺寸調節方法描述於美國專利第4,737,323號中，該專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。藉由浴槽或探針超音處理對粒子懸浮液進行超音處理產生低至尺寸小於約50 nm之粒子的漸進尺寸減小。均質化為另一方法，其依賴於剪切能來將較大粒子片段化成較小粒子。在典型均質化程序中，使粒子再循環穿過標準乳液均質器直至觀測到典型地在約60與約80 nm之間的所選粒度。在兩種方法中，可藉由習知雷射束粒度辨別或QELS來監測粒度分佈。

粒子通過小孔隙聚碳酸酯膜或不對稱陶瓷膜擠出亦為減小粒度達到相對明確界定之尺寸分佈的有效方法。典型地，一或多次使懸浮液循環穿過膜直至達成所要粒度分佈。可使粒子依次通過更小孔隙膜擠出，以達成尺寸之逐步減小。

在一些實施例中，如例如美國專利申請案第09/744,103號中所描述存在於粒子中之核酸(例如siRNA分子)經預凝聚，該專利申請案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在其他實施例中，該等方法可進一步包括添加適用於使用本發

明組合物實現細胞之脂質體轉染的非脂質聚陽離子。適合之非脂質聚陽離子的實例包括海地美溴鉍(hexadimethrine bromide) (以商標名POLYBRENE[®]出售, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA)或海地美鉍(hexadimethrine)之其他鹽。其他適合之聚陽離子包括例如聚L-鳥胺酸、聚L-精胺酸、聚L-離胺酸、聚D-離胺酸、聚烯丙基胺及聚乙烯亞胺之鹽。此等鹽之添加較佳在已形成粒子之後進行。

在一些實施例中, 所形成之核酸-脂質粒子中之核酸(例如siRNA)與脂質比率(質量/質量比)將在約0.01至約0.2、約0.05至約0.2、約0.02至約0.1、約0.03至約0.1或約0.01至約0.08範圍內。起始物質(輸入)之比率亦屬於此範圍。在其他實施例中, 粒子製備使用10 mg總脂質約400 µg核酸或約0.01至約0.08且更佳約0.04之核酸與脂質質量比, 其對應於每50 µg之核酸1.25 mg之總脂質。在其他較佳實施例中, 粒子具有約0.08之核酸:脂質質量比。

在其他實施例中, 所形成之核酸-脂質粒子中的脂質與核酸(例如siRNA)比率(質量/質量比)將在約1 (1:1)至約100 (100:1)、約5 (5:1)至約100 (100:1)、約1 (1:1)至約50 (50:1)、約2 (2:1)至約50 (50:1)、約3 (3:1)至約50 (50:1)、約4 (4:1)至約50 (50:1)、約5 (5:1)至約50 (50:1)、約1 (1:1)至約25 (25:1)、約2 (2:1)至約25 (25:1)、約3 (3:1)至約25 (25:1)、約4 (4:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約25 (25:1)、約5 (5:1)至約20 (20:1)、約5 (5:1)至約15 (15:1)、約5 (5:1)至約10 (10:1)範圍內, 或為約5 (5:1)、6 (6:1)、7 (7:1)、8 (8:1)、9 (9:1)、10 (10:1)、11 (11:1)、12 (12:1)、13 (13:1)、14 (14:1)、15 (15:1)、16 (16:1)、17 (17:1)、18 (18:1)、19 (19:1)、20 (20:1)、21 (21:1)、22 (22:1)、23

(23:1)、24 (24:1)或25 (25:1)，或其任何部分或其中之範圍。起始物質(輸入)之比率亦屬於此範圍。

如先前所論述，結合型脂質可進一步包括CPL。本文論述了多種用於製備脂質粒子-CPL (含CPL脂質粒子)之一般方法。兩種一般技術包括「後-插入」技術，亦即將CPL插入例如預形成之脂質粒子中；及「標準」技術，其中CPL在例如脂質粒子形成步驟期間包括於脂質混合物中。後-插入技術產生主要在脂質粒子雙層膜之外部面具有CPL之脂質粒子，而標準技術提供在內部與外部面均具有CPL之脂質粒子。該方法尤其適合用於由磷脂(其可含有膽固醇)製成之囊泡以及含有PEG-脂質(諸如PEG-DAA及PEG-DAG)之囊泡。製備脂質粒子-CPL之方法教示於例如美國專利第5,705,385號；第6,586,410號；第5,981,501號；第6,534,484號；及第6,852,334號；美國專利公開案第20020072121號；及PCT公開案第WO 00/62813號中，該等專利之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

脂質粒子之投與

脂質粒子(例如核酸脂質粒子)可吸附至與其混合或接觸之幾乎任何細胞類型。一旦吸附，粒子即可由細胞之一部分胞吞，與細胞膜交換脂質，或與細胞融合。轉移或併入粒子之siRNA部分可經由此等途徑中之任一者來進行。特定而言，當進行融合時，粒子膜整合至細胞膜中且粒子之內容物與細胞內流體組合。

脂質粒子(例如核酸-脂質粒子)可單獨或以與根據投藥途徑及標準醫藥慣例所選擇之醫藥學上可接受之載劑(例如生理鹽水或磷酸鹽緩衝液)之混合物的形式投與。一般而言，將採用普通緩衝鹽水(例如

135-150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑。其他適合之載劑包括例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及類似物，包括用於獲得增強之穩定性的醣蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。其他適合之載劑描述於例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。如本文所用，「載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、包衣、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝液、載劑溶液、懸浮液、膠體及類似物。片語「醫藥學上可接受」係指當向人類投與時不產生過敏或類似不良反應之分子實體及組合物。

醫藥學上可接受之載劑通常在脂質粒子形成之後添加。因此，在形成脂質粒子之後，粒子可稀釋至醫藥學上可接受之載劑(諸如普通緩衝鹽水)中。

醫藥調配物中之粒子的濃度可廣泛地變化，亦即自小於約0.05重量%，通常等於或至少約2至5重量%，至多達約10至90重量%，且將根據特定所選之投與模式主要藉由流體體積、黏度等來加以選擇。舉例來說，可增加濃度以降低與治療相關之流體負荷。在具有動脈粥樣硬化-相關充血性心臟衰竭或嚴重高血壓之患者中此可為尤其需要的。或者，可將由刺激性脂質組成之粒子稀釋至低濃度以減輕投與位點處之炎症。

醫藥組合物可藉由習知、熟知殺菌技術來滅菌。水溶液可經包裝供使用或在無菌條件下過濾且凍乾，在投與之前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。組合物可按需要含有諸如以下之醫藥學上可接受之輔助物質以接近生理條件：pH調節及緩衝劑、張力調節劑及類似物，例

如乙酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及氯化鈣。另外，粒子懸浮液可包括脂質-保護劑，其防止脂質在儲存時發生自由基及脂質-過氧化損傷。關脂自由基淬滅劑(諸如 α 生育酚)及水溶性鐵-特異性螯合劑(諸如鐵草胺)為適合的。

活體內投與

已使用核酸-脂質粒子(諸如描述於PCT公開案第WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152及WO 04/002453號中之彼等，該等公開案之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)達成用於活體內治療之全身遞送，例如本文所描述之siRNA分子(諸如描述於表A中之siRNA)經由身體系統(諸如循環)至遠端目標細胞之遞送。

對於活體內投與，投與可以此項技術中已知之任何方式來進行，例如藉由注射、經口投與、吸入(例如鼻內或氣管內)、經真皮施加或經直腸投與。投與可經由單次或分次劑量來實現。醫藥組合物可非經腸投與，亦即關節內、靜脈內、腹膜內、皮下或肌肉內。在一些實施例中，醫藥組合物係藉由快速注射靜脈內或腹膜內投與(參見例如美國專利第5,286,634號)。細胞內核酸遞送亦已論述於Straubinger等人，*Methods Enzymol.*, 101:512 (1983)；Mannino等人，*Biotechniques*, 6:682 (1988)；Nicolau等人，*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989)；及Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993)中。投與基於脂質之治療劑的其他方法描述於例如美國專利第3,993,754號；第4,145,410號；第4,235,871號；第4,224,179號；第4,522,803號；及第4,588,578號中。脂質粒子可藉由在疾病位點直接注射或藉由在疾病位點遠端之位點注射來投與(參見例如Culver,

HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. 第70-71頁(1994))。以上所描述之參考文獻之揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

在脂質粒子係靜脈內投與之實施例中，在注射之後約8、12、24、36或48小時時粒子總注射劑量中之至少約5%、10%、15%、20%或25%存在於血漿中。在其他實施例中，在注射之後約8、12、24、36或48小時時脂質粒子總注射劑量中之超過約20%、30%、40%及多達約60%、70%或80%存在於血漿中。在某些情況下，在投與之後約1小時時複數個粒子中之超過約10%存在於哺乳動物之血漿中。在某些其他情況下，在投與粒子之後至少約1小時時可偵測到脂質粒子之存在。在一些實施例中，在投與之後約8、12、24、36、48、60、72或96小時時在細胞中可偵測到siRNA分子之存在。在其他實施例中，在投與之後約8、12、24、36、48、60、72或96小時時可偵測到由siRNA分子引起之諸如病毒或宿主序列之目標序列的表現之下調。在其他實施例中，由siRNA分子引起之諸如病毒或宿主序列之目標序列的表現之下調優先在受感染細胞及/或能夠受感染之細胞中發生。在其他實施例中，在投與之後約12、24、48、72或96小時或在約6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天時在投與位點之近端或遠端位點處可偵測到細胞中siRNA分子之存在或影響。在其他實施例中，脂質粒子係非經腸或腹膜內投與。

可將單獨或與其他適合之組分組合的組合物製成要經由吸入(例如鼻內或氣管內)投與之氣溶膠調配物(亦即其可經「霧化」)(參見Brigham等人，*Am. J. Sci.*, 298:278 (1989))。可將氣溶膠調配物放入加

壓之可接受之推進劑(諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮及類似物)中。

在某些實施例中，醫藥組合物可藉由鼻內噴霧、吸入及/或其他氣溶膠遞送媒劑來遞送。經由經鼻氣溶膠噴霧將核酸組合物直接遞送至肺臟的方法已描述於例如美國專利第5,756,353號及第5,804,212號中。同樣地，使用鼻內微粒樹脂及溶血磷脂醯基-甘油化合物遞送藥物(美國專利5,725,871)亦為醫藥技術中熟知的。類似地，以聚四氟乙烯支撐基質形式進行之經黏膜藥物遞送描述於美國專利第5,780,045號中。以上所描述之專利的揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

適合用於諸如藉由關節內(在關節中)、靜脈內、肌肉內、真皮內、腹膜內及皮下途徑非經腸投與之調配物包括水性及非水性等張無菌注射溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑及溶質，其使得調配物與預期接受者之血液等張；及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。

一般而言，當靜脈內投與時，脂質粒子調配物係用適合之醫藥載劑調配。適合之調配物可見於例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。可使用多種水性載劑，例如水、緩衝水、0.4%生理鹽水、0.3%甘胺酸及類似物，且可包括用於獲得增強之穩定性的醣蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般而言，將採用普通緩衝鹽水(135 -150 mM NaCl)作為醫藥學上可接受之載劑，但其他適合之載劑將滿足要求。此等組合物可藉由諸如過濾之習知脂質體滅菌技術來滅菌。組合物可按需要含有包括以下之醫藥學

上可接受之輔助物質以接近生理條件：pH調節及緩衝劑、張力調節劑、潤濕劑及類似物，諸如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、脫水山梨醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。此等組合物可使用上文所提及之技術來滅菌，或者其可在無菌條件下產生。所得水溶液可經包裝供使用或在無菌條件下過濾且凍乾，在投與之前將凍乾製劑與無菌水溶液組合。

在某些應用中，本文所揭示之脂質粒子可經由向個體經口投與來遞送。粒子可與賦形劑合併且以可攝取之錠劑、口含片、片劑、膠囊、丸劑、糖錠、酏劑、洗口水、懸浮液、口腔噴霧、糖漿、薄片及類似物之形式使用(參見例如美國專利第5,641,515號、第5,580,579號及第5,792,451號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。此等口服劑型亦可含有以下物質：黏合劑、明膠；賦形劑、潤滑劑及/或調味劑。當單位劑型為膠囊時，其除上文所描述之材料之外亦可含有液體載劑。各種其他材料可以包衣形式存在或以其他方式改變劑量單位之物理形式。當然，製備任何單位劑型時所用之任何材料均應為藥學純的且以所採用之量為實質上無毒的。

典型地，此等經口調配物可含有至少約0.1%之脂質粒子或更多，而粒子之百分比當然可變化且可適宜地在總調配物之重量或體積的約1%或2%與約60%或70%之間或更多。天然地，可製備之各治療適用之組合物中之粒子的量使得將以任何給定單位劑量之化合物獲得適合之給藥。熟習製備此類醫藥調配物之技術者將考慮諸如溶解度、生物可用性、生物半衰期、投藥途徑、產品保質期以及其他藥理學考慮因素之因素，且因此多種劑量及治療方案可為所需的。

適合用於經口投與之調配物可由以下各項組成：(a)液體溶液，諸如懸浮於諸如水、生理鹽水或PEG 400之稀釋劑中的有效量之經包裝之siRNA分子(例如描述於表A中之siRNA分子)；(b)膠囊、香囊或錠劑，其各自含有預定量之siRNA分子，呈液體、固體、顆粒或明膠形式；(c)於適當之液體中之懸浮液；及(d)適合之乳液。錠劑形式可包括以下中之一或多者：乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、磷酸鈣、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、微晶纖維素、明膠、膠體二氧化矽、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸及其他賦形劑、染色劑、填料、黏合劑、稀釋劑、緩衝劑、濕潤劑、防腐劑、調味劑、染料、崩解劑及醫藥學上相容之載劑。糖錠形式可包含於調味劑(例如蔗糖)中之siRNA分子；以及包含於除siRNA分子之外亦含有此項技術中已知之載劑的惰性基質(諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠乳液(acacia emulsion)、凝膠及類似物)中之治療性核酸的軟錠劑。

在其用途之另一實例中，脂質粒子可併入廣泛範圍之局部劑型中。舉例來說，含有核酸-脂質粒子之懸浮液可調配成凝膠、油、乳液、局部乳霜、糊狀物、軟膏、洗劑、泡沫劑、慕斯及類似物且以此類形式進行投與。

投與之粒子的量將取決於siRNA分子與脂質之比率；所用之特定siRNA；所處理之HBV菌株；患者之年齡、重量及病狀；及臨床醫師之判斷，但通常將在每公斤體重約0.01與約50 mg之間，較佳在每公斤體重約0.1與約5 mg之間，或每次投與(例如注射)約 10^8 - 10^{10} 個粒子。

以下描述選自稱為1m至15m之一組siRNA (參見表A)之兩種不同

siRNA的所有可能的「二者」組合。術語「組合」意謂組合之siRNA分子一起存在於同一物質組合物中(例如一起溶解在同一溶液內；或一起存在於同一脂質粒子內；或一起存在於同一脂質粒子之醫藥調配物中，不過各醫藥調配物內之脂質粒子可能包括或可能不包括siRNA組合之各種不同的siRNA)。組合之siRNA分子通常不共價鍵聯在一起。

如表A中所示，個別siRNA各自係用名稱1m至15m識別。組合內之各siRNA編號用短劃線(-)隔開；例如符號「1m-2m」表示siRNA編號1m與siRNA編號2m之組合。短劃線不意謂組合內之不同siRNA分子彼此共價鍵聯。不同之siRNA組合藉由分號隔開。組合中siRNA編號之順序為不重要的。舉例來說，組合1m-2m等效於組合2m-1m，因為此等符號兩者描述siRNA編號1m與siRNA編號2m之同一組合。

siRNA二者及三者組合適合用於例如治療人類之HBV及/或HDV感染，及改善與HBV感染及/或HDV感染相關之至少一種症狀。

在某些實施例中，siRNA係經由核酸脂質粒子投與。

在某些實施例中，相對於包括使用囊封於脂質粒子內之siRNA混合物之方法，不同siRNA分子共-囊封於同一脂質粒子中。

在某些實施例中，相對於包括使用囊封於脂質粒子內之siRNA混合物之方法，存在於混合物中之各類型之siRNA物質囊封於其自己之粒子中。

在某些實施例中，相對於包括使用囊封於脂質粒子內之siRNA混合物之方法，一些siRNA物質共囊封於同一粒子中而其他siRNA物質囊封於不同粒子中。

兩種或更多種藥劑之調配及投與

應瞭解，藥劑可一起調配成單一製劑或其可分開調配，且因此同時或依序分開投與。在一個實施例中，當藥劑為依序(例如在不同時間)投與時，藥劑可經投與使得其生物效應重疊(亦即各藥劑在單一給定時間產生生物效應)。

藥劑可視所選藥劑而定經調配用於任何可接受之投藥途徑且使用任何可接受之投藥途徑投與。舉例來說，適合之途徑包括但不限於經口、舌下、經頰、局部、經真皮、非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，及若為局部治療所需要則為病損內投與。在一個實施例中，本文識別之小分子藥劑可經口投與。在另一實施例中，寡聚核苷酸可藉由注射(例如注入血管，諸如靜脈中)或皮下投與。在一些實施例中，為有需要之個體經口投與一或多種藥劑(例如以丸劑形式)，並且藉由注射或皮下投與一或多種寡聚核苷酸。

典型地，靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸係例如以脂質奈米粒子調配物形式靜脈內投與，然而，本發明不限於包含寡聚核苷酸之靜脈內調配物或靜脈內投與寡聚核苷酸之治療方法。

可藉由在周圍溫度下在適當pH值下且在所要純度下與生理學上可接受之載劑(亦即在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒之載劑)混合來單個地調配藥劑。調配物之pH值主要取決於特定用途及化合物濃度，但可在約3至約8內之任何地方變化。藥劑通常將以固體組合物形式儲存，不過凍乾調配物或水溶液為可接受的。

包含藥劑之組合物可以與良好醫療實踐一致之方式調配、給予及投與。此背景下考慮之因素包括正在治療之特定病症、正在治療之

特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之病因、投藥位點、投藥方法、投藥時程及執業醫師已知之其他因素。

可以任何合宜之投與形式投與藥劑，例如錠劑、粉末、膠囊、溶液、分散體、懸浮液、糖漿、噴霧、栓劑、凝膠、乳液、貼片等。此類組合物可含有藥物製劑中之習知組分，例如稀釋劑、載劑、pH調節劑、甜味劑、增容劑及其他活性劑。若需要非經腸投與，則組合物將為無菌的且呈適合用於注射或輸注之溶液或懸浮液形式。

適合之載劑及賦形劑為熟習此項技術者熟知的且詳細描述於例如Ansel, Howard C.等人，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004；Gennaro, Alfonso R.等人 Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000；及Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005中。調配物亦可包括一或多種緩衝液、穩定劑、表面活性劑、潤濕劑、潤滑劑、乳化劑、懸浮劑、防腐劑、抗氧化劑、避光劑、助流劑、加工助劑、染色劑、甜味劑、芳香劑、調味劑、稀釋劑及其他已知提供藥物之精美外觀或幫助製造醫藥產品(亦即藥劑)之添加劑。

典型地以至少等於達到所要生物效應之水準給予藥劑。因此，有效給藥方案將給予達到所要生物效應之至少最低量，或生物學有效劑量，然而，劑量不應高到不可接受之副作用超過了生物效應之益處。因此，有效給藥方案將給予不超過最大耐受劑量(「MTD」)。最大耐受劑量定義為產生可接受之劑量限制性毒性(「DLT」)發生率的

最高劑量。引起不可接受之DLT率的劑量被視為不耐受的。典型地，特定時程之MTD係在1期臨床試驗中確定。通常如下在患者中進行此等給藥：以在嚙齒動物中(以 mg/m^2 計)之嚴重毒性劑量的1/10(「STD10」)之安全起始劑量起始且以三個一組群自然增加患者，根據改良之斐波那契序列(Fibonacci sequence)逐步增加劑量，其中不斷更高之逐步增加步驟具有不斷降低之相對增量(例如劑量增加為100%、65%、50%、40%且其後為30%至35%)。以三個患者一組群持續劑量逐步增加直至達到不耐受劑量。接下來產生可接受之DLT率的較低劑量水準被視為MTD。

投與藥劑之量將取決於所用之特定藥劑；所處理之HBV菌株；患者之年齡、重量及病狀；及臨床醫師之判斷，但通常將在每天約0.2至2.0克之間。

套組

一個實施例提供一種套組。套組可包括包含組合之容器。適合之容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡鼓包裝等。容器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。容器可容納有效治療病狀之組合且可具有無菌進入孔(例如容器可為靜脈內溶液袋或具有皮下注射針頭可刺穿之塞子的小瓶)。

套組可進一步包括位於容器上或與容器相關聯之標籤或包裝插頁。術語「包裝插頁」用於指照例包括於治療劑之商業包裝中之指導書，其含有關於涉及此類治療劑之使用的適應症、用法、劑量、投藥、禁忌及/或警告的資訊。在一個實施例中，標籤或包裝插頁表明治療劑可用於治療病毒感染，諸如B型肝炎。

在某些實施例中，套組適合用於遞送固體口服形式之治療劑，諸如錠劑或膠囊。此類套組較佳包括許多單位劑量。此類套組可包括具有按其預期用途之順序調整之劑量的卡片。此類套組之實例為「泡鼓包裝」。泡鼓包裝為包裝工業中熟知的且廣泛用於包裝醫藥單位劑型。若需要，則可提供記憶輔助物，例如以數字、字母或其他記號之形式或使用日曆插頁，從而指明治療時程中可投與劑量之日期。

根據另一實施例，套組可包括(a)其中含有一種藥劑之第一容器；及(b)其中含有第二藥劑之第二容器。或者或另外，套組可進一步包括包含醫藥學上可接受之緩衝液(諸如抑細菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液)之第三容器。由商業及用戶觀點來看其可進一步包括其他所需材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭及注射器。

套組可進一步包括關於治療劑之投與的指導。舉例來說，套組可進一步包括關於向有需要之患者同時、連續或分開投與治療劑的指導。

在某些其他實施例中，套組可包括用於容納分開之組合物的容器，諸如分裝瓶或分裝箔袋，然而，分開之組合物亦可含於單一分裝容器內。在某些實施例中，套組包括關於分開之治療劑之投與的指導。該套組形式在分開之治療劑較佳以不同劑型投與(例如經口及非經腸)、以不同劑量時間間隔投與時或在處方醫師需要滴定組合中之個別治療劑時為特別有利的。

在一個實施例中，本發明提供一種治療動物之B型肝炎的方法，其包括向動物投與至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：化合物**3**、

化合物**4**、恩替卡韋、拉米夫定及**SIRNA-NP**。

在一個實施例中，本發明之方法排除包括以下之治療動物之**B**型肝炎的方法：向動物投與協同有效量之i)共價閉環**DAN**之形成抑制劑及ii)核苷或核苷酸類似物。

在一個實施例中，本發明之醫藥組合物排除包含以下之組合物：i)共價閉環**DAN**之形成抑制劑及ii)作為僅有的活性**B**型肝炎治療劑之核苷或核苷酸類似物。

在一個實施例中，本發明之套組排除包含以下之套組：i)共價閉環**DAN**之形成抑制劑及ii)作為僅有的**B**型肝炎藥劑之核苷或核苷酸類似物。

在一個實施例中，本發明之方法排除包括以下之治療動物之**B**型肝炎的方法：向動物投與i)靶向**B**型肝炎病毒之一或多種**siRNA**及ii)逆轉錄酶抑制劑。

在一個實施例中，本發明之醫藥組合物排除包含以下之組合物：i)靶向**B**型肝炎病毒之一或多種**siRNA**及ii)作為僅有的活性**B**型肝炎治療劑之逆轉錄酶抑制劑。

在一個實施例中，本發明之套組排除包含以下之套組：i)靶向**B**型肝炎病毒之一或多種**siRNA**及ii)作為僅有的活性**B**型肝炎藥劑之逆轉錄酶抑制劑。

在一個實施例中，本發明提供一種治療動物之**B**型肝炎的方法，其包括向動物投與至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；

- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；及
- e) 免疫刺激劑。

在一個實施例中，本發明提供一種套組，其包含至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；及
- e) 免疫刺激劑。

在一個實施例中，本發明提供一種治療動物之B型肝炎的方法，其包括向動物投與靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及至少一種選自由以下組成之群的其他藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；及
- e) 免疫刺激劑。

在一個實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及至少一種選自由以下組成之群的其他藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；

- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；及
- e) 免疫刺激劑。

在一個實施例中，本發明提供一種套組，其包含靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及至少一種選自由以下組成之群的其他藥劑：

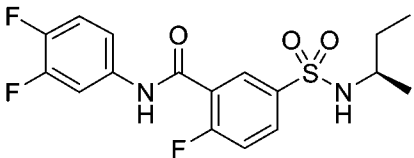
- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；及
- e) 免疫刺激劑。

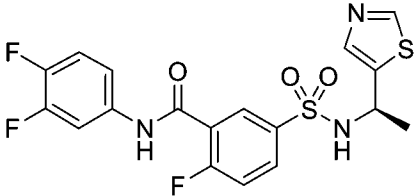
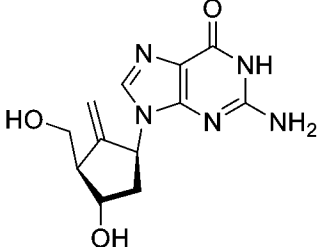
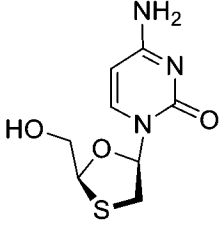
治療劑之組合治療B型肝炎之能力可使用此項技術熟知之藥理學模型來確定。

現將藉由以下非限制性實例來說明本發明。

實例

實例中提及以下化合物。化合物**3-4**可使用已知程序製備。國際專利申請公開案第WO2014/106019號及第WO2013/006394號亦描述了可用於製備化合物**3-4**之合成方法。

化合物編號或名稱	結構
3	

4	
恩替卡韋	
拉米夫定	

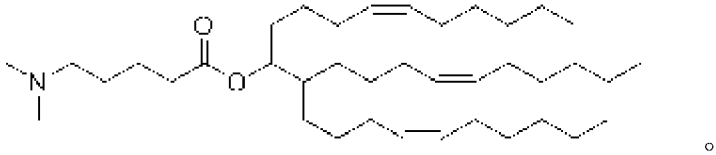
實例1

使用B型肝炎病毒(HBV)小鼠模型來評估免疫刺激劑及HBV靶向型siRNA作為獨立處理及彼此組合之抗HBV效果。

使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫DSPC意謂二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG(2000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.1	55.0	33.0	11.0

陽離子脂質具有以下結構(13)：



使用靶向HBV基因組之三種siRNA的混合物。以下顯示三種siRNA之序列。

有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
<u>CCGU</u> guGCACUuCGCuuCA <u>UU</u>	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU
<u>C</u> uggCUCAGUUUACuAgUG <u>UU</u>	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
<u>GCC</u> gAuCCAUA <u>C</u> ugCGgAA <u>UU</u>	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU
小寫= 2'-O-甲基修飾 下劃線=解鎖核鹼基類似物(UNA)部分	

在第27天，經由水動力注射(HDI；快速1.3 mL注入尾部靜脈)向C3H/HeN小鼠投與10微克質粒pAAV/HBV1.2 (獲自Pei-Jer Chen博士，最初描述於Huang, LR等人，*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(47): 17862-17867)中)。此質粒帶有HBV基因組之1.2倍過長拷貝且除其他HBV產物外表現HBV表面抗原(HBsAg)。小鼠中之血清HBsAg表現係使用酶免疫分析來監測。基於血清HBsAg水準將動物分類(隨機化)至多個組中，使得a)所有動物經證實表現HBsAg，且b) HBsAg組平均值在處理開始之前彼此類似。

如下將動物用免疫刺激劑處理：在第0天，經由HDI投與20微克高分子量聚肌苷酸:聚胞苷酸(poly(I:C))。如下將動物用脂質奈米粒子(LNP)囊封之HBV靶向型siRNA處理：在第0天、第7天及第14天中之每一天，靜脈內投與等效於1 mg/kg siRNA之量的測試物品。包括陰性對照組，因為在此HBV小鼠模型中HBsAg表現水準不完全穩定；在個別動物中血清HBsAg之絕對濃度通常隨時間推移而下降。為證實處理特定效果，將處理組與陰性對照動物相比較。

處理效果係藉由在第0天(處理前)、第3天、第7天、第14天及第21天收集少量血液且分析其血清HBsAg含量來確定。適當時稀釋樣品以在可能之情況下產生定量分析範圍內之值。將降到定量下限

(LLOQ)以下之個別值設定為LLOQ之一半。表1顯示以佔第0天個別動物處理前基線值之百分比表示的處理組平均(n = 4或5；±標準平均誤差)血清HBsAg濃度。

資料證實響應於HBV siRNA與 poly(I:C)之組合的HBsAg降低程度，以及降低效果之持續時間。兩種處理之組合產生比任一單獨處理大之效果。

表 1. 在 HBV 感染小鼠模型中三種 HBV siRNA 及免疫刺激劑 Poly(I:C)之單一及組合處理對血清HBsAg之影響

	第0天	第3天	第7天	第14天	第21天
陰性對照	100 ± 0	82 ± 4	65 ± 9	50 ± 10	36 ±11
HBV siRNA	100 ± 0	0.2 ± 0.1	4.1 ± 1.3	1.6 ± 0.6	1.7 ± 0.6
HBV siRNA + Poly(I:C)	100 ± 0	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2
Poly(I:C)	100 ± 0	6.1 ± 1.1	3.5 ± 1.1	3.9 ± 1.4	4.7 ± 2.3

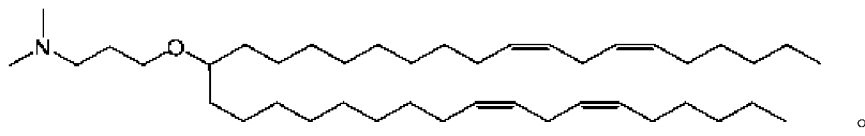
實例2

使用B型肝炎病毒(HBV)小鼠模型來評估HBV衣殼化小分子抑制劑(化合物**3**)及HBV靶向型siRNA作為獨立處理及彼此組合之抗HBV效果。

使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫DSPC意謂二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG(2000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構**(7)**：



使用靶向 HBV 基因組之三種 siRNA 的混合物。以下顯示三種 siRNA 之序列。

有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
<u>CCGU</u> guGCACUuCGCuuCA <u>UU</u>	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU
<u>Cugg</u> CUCAGUUUACuAgUG <u>UU</u>	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
<u>GCCg</u> AuCCAUA <u>Cug</u> CGgAA <u>UU</u>	UUCCGCAgUAUGgAUCGgCUU
小寫= 2'-O-甲基修飾 下劃線=解鎖核鹼基類似物(UNA)部分	

在第7天，經由水動力注射(HDI；快速1.6 mL注入尾部靜脈)向 NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J小鼠投與10微克質粒pHBV1.3（按照Guidotti, L., 等人，*Journal of Virology*, 1995, 69(10): 6158-6169）。此質粒帶有HBV 基因組之1.3倍過長拷貝，其當表現時，除其他HBV產物之外產生包括HBV DNA之B型肝炎病毒粒子。作為各種處理之抗HBV效果之讀出，小鼠中之血清HBV DNA濃度係使用定量PCR分析由總萃取DNA量測(引物/探針序列來自Tanaka, Y.,等人，*Journal of Medical Virology*, 2004, 72: 223-229)。

如下將動物用化合物**3**處理：在第0天起始，在第0天與第7天之間以每天兩次之頻率向動物經口投與50 mg/kg或100 mg/kg劑量之化合物**3**持續總共十四個劑量。將化合物**3**溶解於共溶劑調配物中以便投與。為陰性對照動物投與單獨的共溶劑調配物或生理鹽水。如下將動物用脂質奈米粒子(LNP)囊封之HBV靶向型siRNA處理：在第0天，靜

脈內投與等效於0.1 mg/kg siRNA之量的測試物品。在此HBV小鼠模型中HBV表現水準不完全穩定；為證實處理特定效果，在此將處理組與陰性對照動物相比較。

此等處理之效果係藉由在第0天(處理前)、第4天及第7天收集血液且分析其血清HBV DNA含量來確定。表2顯示以佔第0天個別動物處理前基線值之百分比表示的處理組平均(n = 7或8；±標準平均誤差)血清HBV DNA濃度。

資料證實響應於化合物3與HBV siRNA之組合的血清HBV DNA降低程度，以及降低效果之持續時間。兩種處理之組合產生比任一單獨處理大之效果。

表2. 在HBV感染小鼠模型中化合物3與三種HBV siRNA之單一及組合處理對血清HBV DNA之影響

處理1 (經口)	處理2 (靜脈內)	第0天	第4天	第7天
生理鹽水	(無)	100 ± 0	69 ± 16	70 ± 14
媒劑調配物	(無)	100 ± 0	56 ± 15	47 ± 9
化合物3， 50 mg/kg	(無)	100 ± 0	13 ± 4	33 ± 9
化合物3， 100 mg/kg	(無)	100 ± 0	8.6 ± 1.5	12 ± 5
(無)	HBV siRNA，0.1 mg/kg	100 ± 0	9.4 ± 5.3	5.6 ± 1.2
化合物3， 50 mg/kg	HBV siRNA，0.1 mg/kg	100 ± 0	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.4
化合物3， 100 mg/kg	HBV siRNA，0.1 mg/kg	100 ± 0	0.77 ± 0.15	0.88 ± 0.28

實例3

使用B型肝炎病毒(HBV)小鼠模型來評估HBV衣殼化小分子抑制劑(化合物**3**)作為獨立處理及與經批准化合物恩替卡韋(ETV)組合之抗HBV效果。

在第7天，經由水動力注射(HDI；快速1.6 mL注入尾部靜脈)向NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J小鼠投與10微克質粒pHBV1.3 (按照Guidotti, L., 等人, *Journal of Virology*, 1995, 69(10): 6158-6169)。此質粒帶有HBV基因組之1.3倍過長拷貝，其當表現時，除其他HBV產物之外產生包括HBV DNA之B型肝炎病毒粒子。作為各種處理之抗HBV效果之讀出，小鼠中之血清HBV DNA濃度係使用定量PCR分析由總萃取DNA量測(引物/探針序列來自Tanaka, Y., 等人, *Journal of Medical Virology*, 2004, 72: 223-229)。

如下將動物用化合物**3**處理：在第0天起始，在第0天與第7天之間以每天兩次之頻率向動物經口投與100 mg/kg劑量之化合物**3**持續總共十四個劑量。將化合物**3**溶解於共溶劑調配物中以便投與。為陰性對照動物投與單獨的共溶劑調配物或生理鹽水。如下將動物用ETV處理：在第0天起始，在第0天與第6天之間以每天一次之頻率向動物經口投與100 ng/kg或300 ng/kg劑量之ETV持續總共七個劑量。將ETV在DMSO中溶解至2 mg/mL且然後在生理鹽水中稀釋以便投與。在此HBV小鼠模型中HBV表現水準不完全穩定；為證實處理特定效果，在此將處理組與陰性對照動物相比較。

此等處理之效果係藉由在第0天(處理前)、第4天及第7天收集血液且分析其血清HBV DNA含量來確定。將Ct值低於定量下限(LLOQ)

之樣品設定為LLOQ之一半以便計算組平均值。表3顯示以佔第0天個別動物處理前基線值之百分比表示的處理組平均(n = 5-8；±標準平均誤差)血清HBV DNA濃度。

資料證實響應於化合物3與ETV之組合的血清HBV DNA降低程度，以及降低效果之持續時間。兩種處理之組合產生比任一單獨處理大之效果。

表3. 在HBV感染小鼠模型中化合物3及ETV之單一及組合處理對血清HBV DNA之影響

處理1	處理2	第0天	第4天	第7天
生理鹽水	(無)	100 ± 0	67 ± 18	22 ± 8
媒劑調配物	(無)	100 ± 0	41 ± 7	14 ± 3
化合物3， 100 mg/kg	(無)	100 ± 0	9.3 ± 2.5	1.2 ± 0.3
(無)	ETV，100 ng/kg	100 ± 0	21 ± 5	3.5 ± 0.7
(無)	ETV，300 ng/kg	100 ± 0	1.6 ± 0.3	0.88 ± 0.31
化合物3， 100 mg/kg	ETV，100 ng/kg	100 ± 0	1.4 ± 0.4	0.48 ± 0.18
化合物3， 100 mg/kg	ETV，300 ng/kg	100 ± 0	0.70 ± 0.16	0.32 ± 0.07

實例4-6

活體外組合研究目標：

在活體外使用HBV細胞培養模型系統來確定HBV衣殼化之小分子抑制劑(化合物3)、恩替卡韋(ETV)、HBV聚合酶之逆轉錄酶抑制劑

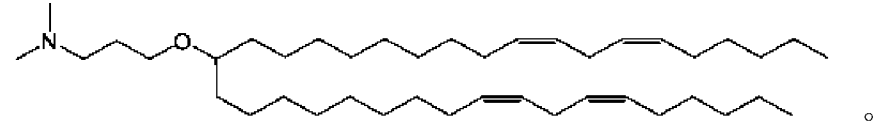
及**SIRNA-NP** (旨在促進有效敲低所有病毒mRNA轉錄物及病毒抗原之siRNA)中之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性的。

SIRNA-NP之組合物：

SIRNA-NP為靶向HBV基因組之三種siRNA之混合物的脂質奈米粒子調配物。在本文報導之實驗中使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫DSPC意謂二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG(20000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構(7)：



以下顯示三種siRNA之序列。

有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = 鹼基N之RNA	
mN = 鹼基N之2'O-甲基修飾	

活體外組合實驗方案：

使用Prichard及Shipman之方法進行活體外組合研究(Prichard MN

及 Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14(4-5), 181-205 ; 及 Prichard MN等人, *MacSynergy II*)。如 Campagna等人中所描述研發 AML12-HBV10細胞株(Campagna et. al., *J. Virology*, 2013, 87(12), 6931-6942)。其為經HBV基因組穩定轉染之小鼠肝細胞株，且其可表現HBV前基因組RNA及以四環素調控之方式支持HBV rcDNA (松環DAN)合成。將AML12-HBV10細胞在不含四環素之補充有10%胎牛血清+ 1%青黴素-鏈黴素的DMEM/F12培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換新鮮培養基且用在相應EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育48 h之持續時間。將抑制劑在100% DMSO (ETV及化合物3)或生長培養基(SIRNA-NP)中稀釋，且分析中之最終DMSO濃度≤0.5%。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各濃度之抑制劑A與各濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制rcDNA產生的影響。在48小時孵育之後，使用bDNA分析(Affymetrix)用HBV特異性定製探針組及製造商之說明書量測存在於抑制劑處理之孔中的rcDNA含量。以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算由各孔產生之RLU資料且使用MacSynergy II程式分析以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積<25 μM²% (log體積<2) =可能不顯著；25-50 μM²% (log體積>2且<5) =微小但顯著，50-100 μM²% (log體積>5且<9) =中度，在活體內可為重要的；超過100 μM²% (log體積>9) =強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近1000 μM²% (log體積>90) =異

常地高，查驗資料。同時，使用用於使用細胞-效價glo試劑(Promega)按照製造商之說明書測定作為細胞活力之度量的ATP含量的重複板來評估抑制劑組合對細胞活力之影響。

實例4：化合物3與恩替卡韋之活體外組合：

將化合物3（濃度範圍為於2倍稀釋系列中2.5 μ M至0.01 μ M且進行9點滴定）與恩替卡韋（濃度範圍為於3倍稀釋系列中0.075 μ M至0.001 μ M且進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物3或恩替卡韋處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表1中。化合物3及恩替卡韋之EC₅₀值顯示於表4中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較（表1）時，按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性的(表4)。

實例5：化合物3與SIRNA-NP之活體外組合：

將化合物3（濃度範圍為於2倍稀釋系列中2.5 μ M至0.01 μ M且進行9點滴定）與SIRNA-NP（濃度範圍為於3倍稀釋系列中0.5 μ g/mL至0.006 μ g/mL且進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物3或SIRNA-NP處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表2中。化合物3及SIRNA-NP之EC₅₀值顯示於表4中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較(表2)時，按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性的(表4)。

實例6：恩替卡韋與SIRNA-NP之活體外組合：

將恩替卡韋（濃度範圍為於3倍稀釋系列中0.075 μ M至0.001 μ M且

進行5點滴定)與SIORNA-NIP (濃度範圍為於2倍稀釋系列中0.5 μg/mL至0.002 μg/mL,且進行9點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之恩替卡韋或SIORNA-NIP處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表3中。恩替卡韋及SIORNA-NIP之EC₅₀值顯示於表4中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較(表3)時,按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性的(表4)。

表1：恩替卡韋(ETV)與化合物3之活體外組合

[藥物] ETV (μM)											rcDNA 之平 均抑 制%	化合物3 (μM)
	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.500		
0.075	74.32	68.07	68.39	75.14	76.89	87.27	88.19	91.48	92.88	92.19		
0.025	63.25	64.7	58.68	63.39	64.91	75.73	86.18	89.9	91.41	93.94		
0.008	48.01	49.89	54.26	52.73	62.62	74.73	82.42	85.21	89.65	90.77		
0.003	18.71	11.06	25.23	22.45	46.04	57.94	77.01	85.49	86.6	90.86		
0.001	21.63	4.69	0.73	9.56	30.07	52.94	74.38	83.54	89.68	91.05		
0	0	3.19	0.62	7.38	1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47		
[藥物] ETV (μM)											標準 偏差 (%)	化合物3 (μM)
	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5		
0.075	8.58	8.77	16.02	8.3	7.66	7.17	4.93	3.16	1.57	3.14		
0.025	13.67	10.43	13.89	13.82	12.17	7.61	3.09	2.63	1.7	0.94		
0.008	18.71	22.38	19.17	15.26	9.56	8.73	4.65	1.94	3.91	0.91		
0.003	35.13	24.05	20.09	22.35	16.24	10.98	7.82	4.84	3.77	3.64		
0.001	26.12	20.67	22.56	24.1	15.68	8.42	2.57	4.25	1.74	2.61		
0	0	42.74	22.32	20.39	23.53	22.08	7.85	2.94	1.46	2.2		
[藥物]											相加 性抑 制	化合物3 (μM)
	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.312 5	0.625	1.25	2.5		

ETV (μ M)											
0.075	74.32	73.5	74.48	76.22	73.86	83.44	92.54	95.06	96.59	97.55	
0.025	63.25	62.08	63.48	65.96	62.58	76.31	89.33	92.93	95.12	96.5	
0.008	48.01	46.35	48.33	51.85	47.07	66.48	84.9	90	93.1	95.05	
0.003	18.71	16.12	19.21	24.71	17.24	47.59	76.39	84.36	89.21	92.25	
0.001	21.63	19.13	22.12	27.41	20.21	49.47	77.24	84.92	89.6	92.53	
0	0	-3.19	0.62	7.38	-1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47	
藥物1	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	協同 作用 曲線 (99.9 %) 邦弗 朗尼 調整 (Bonferroni Adj.) 96%
ETV (μ M)											協同 作用
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 累積
0.008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.28519	
0.003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗 作用
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 累積
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1.29 -0.19

表 2：化合物 3 與 SIORNA-NIP 之活體外組合

藥物1	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.5	relDNA 之平均 抑制%	化合物 3
SIORNA -NIP μ g/mL												μ M
0.5	96.25	95.01	95.45	96.35	95.83	96.38	96.15	97.02	96.88	96.9		
0.167	92.38	90.74	91.26	92.35	90.9	94.41	95.28	95.7	96.58	96.63		
0.056	68.59	66.89	75.99	72.21	81.66	83.57	90.29	92.61	94.84	95.99		
0.019	29.18	30.74	29.09	33.68	43.8	68.05	83.12	87.88	93.48	94.35		
0.006	14.92	0.31	-4.48	6.12	19.44	49.81	78.77	85.37	90.66	92.09		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	20.07	37.11	59.39	79.86	88.12	89.67		

【藥物】	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	標準偏差(%)	化合物 3 μM
SIURNA -NIP μg/mL												
0.5	1.42	1.64	1.15	0.66	0.89	1.23	1.26	1.22	1.07	0.87		
0.167	3.23	3.02	1.2	3.25	1.88	1.47	1.05	0.87	0.9	1.16		
0.056	9.74	8.53	3.59	6.15	5.55	3.84	2.37	2.44	1.82	1.48		
0.019	31.44	16.24	17.69	9.21	14.48	11.22	6.35	5.11	1.1	1.48		
0.006	25.79	18.47	16.92	29.8	15.19	13.5	4.32	0.73	3.01	3.58		
0	0	16.14	29.67	32.34	27.28	28.62	12.94	5.47	5.83	2.5		
【藥物】	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	相關性 抑制	化合物 3 μM
SIURNA -NIP μg/mL												
0.5	96.25	96.18	95.48	95.61	97	97.64	98.48	99.24	99.55	99.61		
0.167	92.38	92.23	90.81	91.09	93.91	95.21	96.91	98.47	99.09	99.21		
0.056	68.59	67.97	62.14	63.27	74.89	80.25	87.24	93.67	96.27	96.76		
0.019	29.18	27.78	14.63	17.18	43.39	55.46	71.24	85.74	91.59	92.68		
0.006	14.92	13.24	2.56	0.5	32	46.49	65.45	82.86	89.89	91.21		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	-20.07	-37.11	-59.39	-79.86	-88.12	-89.67		
【藥物】	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	協同作用 用曲線 (99.9%) 邦光助 調整	96%
SIURNA -NIP μg/mL												
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	協同作用 用	2.14
0.167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 殘 積	0.31
0.056	0	0	2.035 31	0	0	0	0	0	0	0		
0.019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 用	0
0.006	0	0	0	0	0	0	0	0.107 57	0	0	log 殘 積	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

表 3：恩替卡韋與 siRNA-NIP 之活體外組合

藥物	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.250	0.500	siRNA-NIP 之平均抑制% siRNA-NIP	μg/mL
ECV μM												
0.075	74.9	77.52	75.42	79.02	85.16	86.59	92.73	95.09	96.6	96.66		
0.025	64.1	64.59	65.95	68.92	75.31	80.87	90.12	93.84	95.54	96.72		
0.008	37.88	42.67	48.08	54.27	70.87	75.26	85.26	92.63	95.6	96.12		
0.003	37.81	25.05	31.15	33.55	48.32	68.45	81.86	91	94.63	96.08		
0.001	9.06	11.49	1.57	22.41	33.41	61.88	77.03	90.37	93.93	95.14		
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02		
藥物	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	標準偏差(%) siRNA-NIP	μg/mL
ECV μM												
0.075	5.4	2.5	2.4	3.43	3.56	4.59	1.42	0.92	1.29	1.35		
0.025	8.24	8.69	2.67	5.28	1.81	3.19	0.79	1.39	1.72	1.28		
0.008	5.43	9.21	4.64	3.19	7.48	2.52	0.29	2.33	0.59	0.95		
0.003	8.11	11.06	14.06	2.97	7.32	2.97	1.89	1.3	0.73	0.7		
0.001	9.35	11.3	8.13	9.32	7.82	3.96	3.32	1.43	0.81	1.16		
0	0	17.52	8.77	13.87	26.87	5.59	5.05	1.56	1.06	1.33		
藥物	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	相加性抑制 siRNA-NIP	μg/mL
ECV μM												
0.075	74.9	72.65	72.93	80.14	83.04	86.46	93.21	96.84	98.32	98.75		
0.025	64.1	60.89	61.28	71.6	75.74	80.63	90.29	95.48	97.6	98.21		
0.008	37.88	32.32	33	50.86	58.03	66.49	83.19	92.17	95.84	96.91		
0.003	37.81	32.24	32.92	50.8	57.98	66.45	83.17	92.16	95.84	96.9		
0.001	9.06	0.92	1.91	28.06	38.55	50.94	75.39	88.54	93.92	95.47		
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02		
藥物	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	協同作用 用曲線 (99.9%) 邦弗別 校正調整	96%
ECV μM												
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	協同作用 用	1.59
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 乘積	0.23
						0.476	1.1156					
0.008	0	0	0	0	0	68	1	0	0	0		
0.003	0	0	0	-7.47573	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	-7.48

0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	用 log 體積	-1.07
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

表 4：使用 bDNA 分析之 cccDNA 定量的情況下 AMOL12 JCBV10 細胞培養系統中之活體外組合研究之結果的概述：

抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A IC ₅₀ (μM)	抑制劑 B IC ₅₀ (μM 或 μg/mL)	協同作用 體積 (μM ² %)*	協同作用 log 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %)*	拮抗作用 log 體積	結論
化合物 3	恩替卡韋(ETV)	0.231	0.012	0	0	-1.29	-0.19	相加性
化合物 3	SIRNA-NIP**	0.250	0.032	2.14	0.31	0	0	相加性
恩替卡韋 (ETV)	SIRNA-NIP**	0.012	0.031	1.59	0.23	-7.48	-1.07	相加性

*在 99.9%置信區間

** μg/mL

實例 9

活體外組合研究目標：

為確定使用兩種化合物組合之組合處理對 JCBV DNA 複製之過程、cccDNA 形成及 cccDNA 表現及穩定性的影響。研究了化合物 3 及 4 (JCBV 衣殼化之兩種小分子抑制劑)；恩替卡韋(ETV)及拉米夫定(3TC) (兩種 FDA 批准之 JCBV 聚合酶之逆轉錄酶抑制劑)；及 SIRNA-NIP (脂質奈米粒子(LNP)調配之病毒 mRNA 之 siRNA 抑制劑)及病毒抗原表現。該等研究旨在在活體外使用 JCBV 細胞培養模型系統確定該等組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

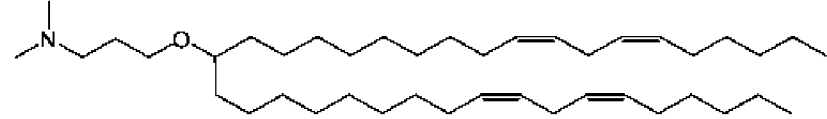
LNP 調配物：

SIRNA-NIP 為靶向 JCBV 基因組之三種 siRNA 之混合物的脂質奈米粒子調配物。在本文報導之實驗中使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送 JCBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫 DSPC 意謂

二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG(2000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構(7)：



SiRNA

以下顯示三種 siRNA 之序列。

有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUm UrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAm CrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrA mGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAm GrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUr CrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmG rAmGrGrUrUrU
rN =鹼基N之RNA	
mN =鹼基N之2'O-甲基修飾	

活體外組合實驗方案：

使用描述於 Cai 等人 (Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012. 第56卷(8):4277-88)中之分析系統之改良型式進行活體外組合研究。先前研發之 HepDE19細胞培養系統 (Guo 等人 J. Virology (2007) 81(22): 12472-12484)以四環素(Tet)調控之方式支持HBV DNA複製及cccDNA形成，且產生可偵測之報告分子，此取決於cccDNA之產生及維持。

在HepDE19細胞培養系統中，報告子為前核心RNA及其同源蛋白

質產物(所分泌之HBV「e抗原」(HBeAg))。在HepDE19細胞中，前核心RNA及HBeAg僅由cccDNA環狀模板產生，因為整合病毒基因組之相反末端之間的HBeAg之ORF及其5'RNA前導子為隔開的，且僅在形成cccDNA之情況下變得鄰接。雖然基於HepDE19細胞培養系統之分析對於測定活性來說為有效的，但高通量篩檢之結果可能為複雜的，因為HBeAg ELISA與病毒HBeAg同系物交叉反應，該病毒HBeAg同系物為在HepDE19細胞中主要以非cccDNA依賴性方式表現之核心抗原(HBcAg)。為克服此併發症，已研發替代細胞培養系統(本文中命名為DESHAe82細胞培養系統且描述於PCT/EP/2015/06838中)，其在DESHAe82細胞之轉基因中之HBeAg的N端編碼序列中包括框內HA抗原決定基標籤，而不會干擾對於HBV複製、cccDNA轉錄及HBeAg分泌來說關鍵之任何順式元件。

已研發用於使用HA抗體充當捕獲抗體且HBeAg充當偵測抗體來偵測經HA標記之HBeAg的化學發光ELISA分析(CLIA)，從而消除來自HBcAg之污染信號。與HA-HBeAg CLIA分析聯合之DESHAe82細胞株展現高水準之cccDNA合成及HA-HBeAg產生及分泌，以及高特異性讀出信號及低噪聲。此外，研發了專門用於偵測DE19或DESHAe82細胞中之前核心RNA的用於定量逆轉錄及聚合酶鏈反應(qRT-PCR)之方案且亦用其偵測經轉譯以產生HBeAg或HA-HBeAg之cccDNA依賴性mRNA (前核心RNA)。

為測試化合物組合，將DESHAe82或DE19細胞(如實例中所指示)在含Tet之補充有10%胎牛血清+ 1%青黴素-鏈黴素之DMEM/F12培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中，且在濕潤孵育器中在37

℃及5% CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換不含Tet之新鮮培養基且用在相應EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育48 h之持續時間。將抑制劑在100% DMSO (ETV、3TC、化合物**3**及化合物**4**)或生長培養基(**SIRNA-NP**)中稀釋且分析中之最終DMSO濃度為0.5%。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各測試濃度之抑制劑A與各測試濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制cccDNA形成及表現的影響。各板上在多個孔中包括未處理之陰性對照樣品(0.5% DMSO或僅培養基)。在9天孵育之後，移除培養基且對細胞進行RNA萃取以量測cccDNA依賴性前核心mRNA含量。總細胞RNA係使用96孔模式總RNA分離套組(MACHEREY-NAGEL，產品目錄740466.4)藉由遵循製造商之說明書來萃取(真空歧管加工，再進行兩次額外之緩衝液RA4洗滌)。在不含RNA酶之水中溶離RNA樣品。使用Roche LightCycler480及RNA Master水解探針(目錄號04991885001, Roche)使用用於cccDNA依賴性前核心RNA之特異性偵測之引物及條件進行定量實時RT-PCR。亦藉由標準方法偵測GAPDH mRNA含量且用於正規化前核心RNA含量。以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算前核心RNA水準之抑制且因此計算cccDNA表現，且使用Prichard-Shipman組合模型使用MacSynergy II程式分析(Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. 第14卷(4-5):181-205；Prichard MN, Aseltine KR及Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992)以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積<25 μM²% (log體積<2) =可能

不顯著；25-50 ($\log$ 體積 >2 且 <5) =微小但顯著，50-100 ($\log$ 體積 >5 且 <9) =中度，在活體內可為重要的；超過100 ($\log$ 體積 >9) =強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近1000 ($\log$ 體積 >90) =異常地高，查驗資料。

同時，以兩種方式評估抑制劑組合對細胞活力及增殖之影響中雙行線：1)直接顯微鏡觀察測試孔，及2)使用以10-20 %細胞密度接種之重複板，在4天之後使用細胞-效價Glo試劑(Promega)按照製造商之說明書分析其細胞內ATP含量。以佔未處理之陰性對照孔的百分比的形式計算細胞活力及密度。

實例7：化合物3與恩替卡韋之活體外組合：

將化合物3 (濃度範圍為於半對數稀釋系列中10 μM 至0.0316 μM 且進行6點滴定)與恩替卡韋(濃度範圍為於半對數3.16倍稀釋系列中0.010 μM 至0.00003 μM 且進行6點滴定)組合進行測試。此組合之抗病毒活性顯示於表7a中；協同作用及拮抗作用體積顯示於表7b中。由根據Prichard及Shipman進行之協同作用及拮抗作用體積量測之2次重複產生之組合結果及解釋顯示於表9d中。在此分析系統中，此組合產生前核心RNA表現之協同抑制。藉由顯微術未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表7a. 化合物3及恩替卡韋組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之平均抑制百分比(n = 2個樣品/數據點)

<i>ETV</i> ,	0.01	86.940	97.010	97.490	95.900	97.120	98.240	99.220
<i>μM</i>	0.0032	81.510	61.730	69.510	62.570	98.550	97.820	97.690
	0.001	73.320	77.600	86.990	66.700	94.490	89.590	91.710
	0.0003	69.090	78.290	58.730	55.160	92.360	91.290	93.110
	0.0001	-8.990	39.460	55.700	44.430	45.680	73.420	91.580
	3E-05	-133.220	-313.960	20.870	49.930	8.740	68.590	72.590
	0	0.000	-26.280	-86.920	36.240	67.120	90.600	84.340
化合物		0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10
		化合物3 , <i>μM</i>						

表7b. MacSynergy體積計算，化合物3及恩替卡韋組合：

在99.99%置信水準下「大於相加性」之抑制水準

<i>ETV</i> ,	0.01	0	3.75864	13.8041	1.86048	0	0	0.74344
<i>μM</i>	0.0032	0	0	0	0	0.87826	0	0
	0.001	0	9.05212	27.6452	0	0	0	0
	0.0003	0	0.40426	6.01171	0	0	0	0
	0.0001	0	75.9052	125.983	0	0	0	0
	3E-05	0	0	322.705	90.4025	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
化合物		0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10
		化合物3 , <i>μM</i>						

實例8：化合物4與恩替卡韋之活體外組合：

將化合物4（濃度範圍為於半對數稀釋系列中10 μ M至0.0316 μ M且進行6點滴定）與恩替卡韋（濃度範圍為於半對數3.16倍稀釋系列中0.010 μ M至0.00003 μ M且進行6點滴定）組合進行測試。此組合之抗病毒活性顯示於表8a中；協同作用及拮抗作用體積顯示於表8b中。由根據Prichard及Shipman進行之協同作用及拮抗作用體積量測之2次重複產生之組合結果及解釋顯示於表9d中。在此分析系統中，此組合產生

前核心RNA表現之協同抑制。藉由顯微術未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表8a. 抗病毒活性，化合物4及恩替卡韋組合：

相較於陰性對照之平均抑制百分比(n = 2個樣品/數據點)

<i>ETV</i> , <i>μM</i>	0.01	96	92.03	89.04	98.02	97.16	97.18	96.46
	0.0032	95.31	93.96	93.11	89.34	91.81	97.7	97.74
	0.001	80.83	94.74	94.25	95.49	98.64	98.14	98.7
	0.0003	39.01	95.61	92.25	97.73	97.85	97.68	95.26
	0.0001	64.23	78.08	98.62	96.63	89.34	98.87	95.3
	3E-05	-32.56	-53.69	58.53	97.04	97.7	96.9	95.1
	0	0	-49.48	66.78	94.67	93.92	97.88	97.53
		0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10
化合物		化合物4 , <i>μM</i>						

表8b. MacSynergy體積計算，化合物4及恩替卡韋組合：

在99.99%置信區間下「大於相加性」之抑制水準

<i>ETV</i> , <i>μM</i>	0.01	0	-1.99	-9.63	-1.77	-2.6	-2.74	-3.44
	0.0032	0	0.97	-5.33	-10.41	-7.9	-2.2	-2.14
	0.001	0	23.4	0.62	-3.49	-0.19	-1.45	-0.83
	0.0003	0	86.78	12.51	0.98	1.56	-1.03	-3.23
	0.0001	0	31.55	10.5	-1.46	-8.49	-0.37	-3.82
	3E-05	0	44.46	2.57	4.11	5.76	-0.29	-1.63
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10
化合物		化合物4 , <i>μM</i>						

實例9：化合物3與SIRNA-NP之活體外組合：

將化合物3（濃度範圍為於半對數稀釋系列中10 μ M至0.0316 μ M且進行6點滴定)與SIRNA-NP（濃度範圍為於半對數3.16倍稀釋系列中0.10 μ M至0.000 μ g/mL且進行6點滴定)組合進行測試。此組合之抗病毒活性顯示於表9a中；協同作用及拮抗作用體積顯示於表9b中。由根

據Prichard及Shipman進行之協同作用及拮抗作用體積量測之4次重複產生之組合結果及解釋顯示於表9d中。在此分析系統中，此組合產生前核心RNA表現之協同抑制。藉由顯微術或細胞-效價Glo分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制(表9c)。

表9a. 化合物3及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之平均抑制百分比(n = 4個樣品/數據點)								
化合物3， μM	10.00	76.180	76.580	93.330	97.170	94.670	97.120	98.640
	0							
	3.165	73.120	93.950	95.500	97.730	98.120	99.160	98.620
	1.001	88.510	95.740	97.340	97.880	98.620	99.410	98.150
	0.317	77.070	96.440	93.720	98.340	98.390	99.260	97.820
	0.100	71.330	87.960	91.490	87.110	97.700	97.790	95.920
	0.032	35.570	-56.280	64.870	86.080	90.920	86.330	89.560
	0	0.000	3.930	-46.460	35.730	87.370	72.720	99.230
		0	0.0003	0.001	0.003	0.010	0.032	0.100
化合物		SIRNA-NP (μg/mL)						

表9b. MacSynergy體積計算，化合物3及SIRNA-NP組合：

在99.99 %置信水準下「大於相加性」之抑制水準								
化合物3， <i>μM</i>	<i>10.000</i>	0.000	0.000	13.805	4.977	0.000	0.000	-0.061
	<i>3.165</i>	0.000	2.558	28.321	9.580	0.000	4.779	0.000
	<i>1.001</i>	0.000	1.416	10.254	1.969	0.000	0.697	0.000
	<i>0.317</i>	0.000	11.954	12.984	9.921	0.000	3.677	0.000
	<i>0.100</i>	0.000	0.000	1.985	0.000	0.000	3.438	0.000
	<i>0.032</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>0</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		<i>0</i>	<i>0.0003</i>	<i>0.001</i>	<i>0.003</i>	<i>0.010</i>	<i>0.032</i>	<i>0.100</i>
化合物	<i>SIRNA-NP (μg/mL)</i>							

表9c. 化合物3及SIRNA-NP組合之細胞毒性：相較於對照之平均細胞活力百分比

化合物3， μM	10.000	110.5	112.6	120.6	124.0	115.0	89.1
	3.165	105.9	116.1	119.5	120.6	117.3	95.1
	1.001	109.0	118.6	115.9	114.9	116.3	91.5
	0.317	110.0	111.8	119.7	117.2	109.7	90.3
	0.100	99.3	107.2	115.1	119.5	119.9	93.5
	0.032	99.3	107.7	122.6	127.1	123.0	85.9
化合物	0.0003	0.001	0.003	0.010	0.032	0.100	

表9d. 藉由qRT-PCR進行之cccDNA衍生之前核心RNA定量的情況下 DESHAe82細胞培養系統中之活體外組合研究之結果的概述

抑制劑 A (化合物編號)	抑制劑 B	協同作用 體積 ($\mu M^2\%$)	協同作用 Log 體積	拮抗作用 ($\mu M^2\%$)	拮抗作用 Log 體積	解釋
3	恩替卡韋 (ETV)	679.15	169.58	0	0	協同作用
4	恩替卡韋 (ETV)	225.77	56.44	-76.43	-19.11	協同作用
3	SIRNA-NP	122.31	30.54	-0.06	-0.01	協同作用

實例10

此實例之目的為比較以下物質之抗HBV活性：包括化合物3 (HBV衣殼化之小分子抑制劑)及SIRNA-NP (囊封HBV靶向型siRNA之脂質奈米粒子調配物)的不同組合處理；以及已確立之HBV照護標準處理：恩替卡韋(ETV) (抑制HBV DNA聚合酶活性之核苷(酸)類似物) (de Man RA等人，*Hepatology*, 34(3), 578-82 (2001))及聚乙二醇化干擾素 α -2a (pegINF α -2a)，其經由1型干擾素受體活化限制病毒散播 (Marcellin等人，*N Engl J Med.*, 51(12), 1206-17 (2004))。將此等組合

之效能與使用單獨的化合物3、SIRNA-NP及ETV之單一治療處理相比較，並且與使用化合物3之媒劑的陰性對照處理條件相比較。

在充分確立之慢性B型肝炎病毒(HBV)感染之人類化肝臟嵌合小鼠模型中進行此工作(Tsuge等人, *Hepatology*, 42(5), 1046-54 (2005))。在於第0天起始之處理期之前確定動物中之HBV感染持久水準。測試物品劑量如下：化合物3，口服，100 mg/kg，每天兩次；SIRNA-NP，靜脈內，3 mg/kg，每2週一次；ETV，口服，1.2 µg/kg，每天一次；pegIFN α-2a，皮下，30 µg/kg，每週兩次。

基於以下各項來評估抗HBV效果：血清HBsAg含量，使用來自Bio-Rad Laboratories之GS HBsAg EIA 3.0酶聯免疫吸附分析套組按照製造商之說明書；及使用定量PCR分析(引物/探針序列來自Tanaka等人, *Journal of Medical Virology*, 72, 223-229 (2004))由總萃取DNA量測之血清HBV DNA含量。

如由相對於所研究之單一治療處理更強之血清HBV DNA含量降低所例示，雙重及三重組合處理產生更大之抗病毒活性。特定而言，在第28天，與使用ETV或化合物3或SIRNA-LNP之單一治療處理觀測到之1.0至1.5 log₁₀降低相比，在用化合物3與SIRNA-LNP或化合物3與pegIFN α-2a之組合處理後血清HBV DNA含量降低超過2.5 log₁₀，而在用化合物3與ETV之組合處理後降低2 log₁₀。使用化合物3及SIRNA-NP及ETV或化合物3及SIRNA-NP及pegINF α-2a之三重組合處理對HBV DNA含量展現相對於二重組合成處理到第28天時略微提高之影響。如由血清HBsAg含量所例示之SIRNA-NP抑制B型肝炎蛋白質(抗原)產生之能力得以維持(當與其他抗病毒劑處理組合共投與

時)。

表 10a：組合及單一治療處理對血清HBV DNA含量之影響

組 編 號	處理	血清 HBV DNA (拷貝數/mL± SEM)				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
1	化合物 3 之媒 劑對照	1.50E+08	1.65E+08	1.45E+08	2.13E+08	2.13E+08
		± 1.82E+07	± 2.78E+07	± 1.50E+07	± 3.01E+07	± 2.63E+07
2	化合物 3	1.70E+08	1.33E+07	1.28E+07	1.02E+07	1.17E+07
		± 2.16E+07	± 1.85E+06	± 1.78E+06	± 4.24E+06	± 5.20E+06
3	SIRNA-NP	1.88E+08	5.18E+06	6.40E+06	2.24E+06	6.86E+06
		± 4.52E+07	± 1.50E+06	± 9.67E+05	± 5.51E+05	± 2.26E+06
4	化合物 3 + SIRNA-NP	1.56E+08	8.64E+06	2.02E+06	4.36E+05	3.64E+05
		± 2.25E+07	± 2.48E+06	± 5.08E+05	± 1.18E+05	± 1.00E+05
5	化合物 3 + SIRNA-NP + ETV	1.66E+08	6.82E+06	1.57E+06	3.70E+05	1.68E+05
		± 1.33E+07	± 1.64E+06	± 2.19E+05	± 8.96E+04	± 4.00E+04
6	化合物 3 + SIRNA-NP + pegIFN α-2a	2.42E+08	7.75E+06	1.79E+06	5.48E+05	2.90E+05
		± 5.70E+07	± 2.03E+06	± 4.53E+05	± 1.12E+05	± 2.52E+04
7	化合物 3 + ETV	1.96E+08	1.70E+07	5.22E+06	2.34E+06	1.80E+06
		± 2.46E+07	± 4.13E+06	± 1.06E+06	± 4.06E+05	± 3.67E+05
8	化合物 3 + pegIFN α-2a	1.67E+08	8.50E+06	1.39E+06	4.98E+05	3.01E+05
		± 2.54E+07	± 1.64E+06	± 3.71E+05	± 1.25E+05	± 8.11E+04
9	ETV	1.48E+08	2.35E+07	1.38E+07	1.35E+07	9.33E+06
		± 1.18E+07	± 2.47E+06	± 1.65E+06	± 6.45E+05	± 3.20E+05

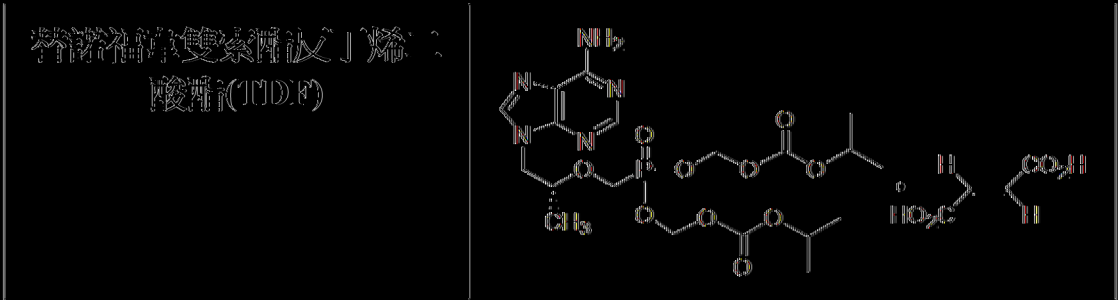
表10b：組合及單一治療處理對血清HCBsAg含量之影響

組編號	處理	血清HCBsAg (IU/mL, ± SEM)			
		第0天		第21天	
1	化合物3之媒劑對照	2761	± 388	4065	± 338
2	化合物3	2965	± 616	4158	± 355
3	SICRNA-NP	3352	± 812	44	± 11
4	化合物3 + SICRNA-NP	3436	± 498	58	± 8
5	化合物3 + SICRNA-NP + BTV	2795	± 309	96	± 24
6	化合物3 + SICRNA-NP + pgsH7Nα2a	3965	± 734	37	± 4
7	化合物3 + BTV	3965	± 779	5822	± 1490
8	化合物3 + pgsH7Nα2a	3154	± 521	3621	± 683
9	BTV	2649	± 282	2975	± 629

實例11

活體外組合研究目標：

在活體外使用HCBV細胞培養模型系統來確定HCBV衣殼化之小分子抑制劑(化合物3)與替諾福韋(TDF) (HCBV聚合酶之核苷類似物抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。



活體外組合實驗方案：

使用Prichard及Shipman之方法進行活體外組合研究(Prichard MN及Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14(4-5), 181-205；及Prichard MN等人, *MacSynergy II*)。HepDE19細胞培養系統為HepG2(人類肝癌)衍生之細胞株，其以四環素(Tet)調控之方式支持HBV DNA複製及cccDNA形成且產生HBV rcDNA及可偵測報告分子，此取決於cccDNA之產生及維持(Guo等人2007. *J. Virol* 81:12472-12484)。將HepDE19 (50,000個細胞/孔)塗鋪於96孔膠原蛋白塗佈組織培養處理微量滴定板中在補充有10%胎牛血清、1%青黴素-鏈黴素及1 $\mu\text{g/mL}$ 四環素之DMEM/F12培養基中且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換不含四環素之新鮮培養基且在37℃及5%CO₂下孵育4 h。然後為細胞更換不含四環素之新鮮培養基且用在相應EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育7天之持續時間。將抑制劑替諾福韋(TDF)及化合物3在100% DMSO中稀釋且分析中之最終DMSO濃度 $\leq 0.5\%$ 。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各濃度之抑制劑A與各濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制rcDNA產生的影響。在用化合物組合將細胞7天孵育之後，使用Quantigene 2.0 bDNA分析套組(Affymetrix, Santa Clara, CA)使用HBV特異性定製探針組及製造商之說明書量測存在於抑制劑處理孔中之rcDNA的含量。使用Victor發光讀板儀(PerkinElmer型號1420多標記物計數器)讀取板，且以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算由各孔產生之相對發光單位(RLU)資料，且使用MacSynergy II程式分析以使用由

Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積 $<25 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 <2) =可能不顯著； $25\text{-}50 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >2 且 <5) =微小但顯著， $50\text{-}100 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >5 且 <9) =中度，在活體內可為重要的；超過 $100 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >9) =強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近 $1000 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >90) =異常地高，查驗資料。在微軟Excel中使用XL-Fit模組分析單一化合物處理之細胞的RLU資料以使用4參數曲線擬合算法來確定 EC_{50} 值。同時，使用重複板評估化合物對細胞活力之影響，以5,000個細胞/孔之密度塗鋪且孵育4天，以使用細胞-效價glo試劑(CTG；Promega Corporation, Madison, WI)按照製造商之說明書測定作為細胞活力之度量的ATP含量。

化合物3與替諾福韋(TDF)之活體外組合：

將化合物3 (濃度範圍為於3倍稀釋系列中 $3 \mu\text{M}$ 至 $0.037 \mu\text{M}$ 且進行5點滴定)與替諾福韋(濃度範圍為於2倍稀釋系列中 $1 \mu\text{M}$ 至 $0.004 \mu\text{M}$ 且進行9點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物3或TDF處理觀測到的rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表11a中。此實驗中測定之化合物3及TDF之 EC_{50} 值顯示於表11b中。當在以上濃度範圍內基於各化合物之個別貢獻將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加相互作用所預測之值相比較(表11b)時，如上文所描述按照MacSynergy II分析且使用Prichard及Shipman (1992)之解釋準則發現組合為相加性的(表11a及b)。

表11a. 在使用bDNA分析之rcDNA定量之情況下在HepDE19細胞培養模型中化合物3及TDF組合之抗病毒活性：相較於陰性對照之平均抑

制百分比 (n = 4個樣品/數據點)

											rcDNA 之平 均抑 制%	TDF										
[藥物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000		MM										
化合 物 3																						
MM																						
3													92.69	93.87	96.01	94.57	94.17	94.9	91.84	94.52	97.28	97.37
1													83.1	87.98	90.45	91.88	89.45	89.19	94.59	98.01	95.27	97.85
0.333													34.59	47.53	50.34	45.48	64.69	70.4	83.95	92.17	94.85	96.43
0.111													-50.41	-47.53	-31.05	-44.75	13.61	50.62	62.26	82.59	92.55	97.17
0.037	-63.72	-41.93	-56.49	-41.81	-0.16	29.03	56.86	82.15	90.11	95.65												
0	0	-47.04	-39.77	-25.59	36.74	37.05	65.03	84.2	91.21	95.51												

											標準 偏差 (%)	TDF										
[藥物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000		MM										
化合物 3																						
MM																						
3													4.43	3.98	1.83	2.37	3.8	1.33	5.51	4.26	1.13	1.29
1													8.73	5.43	2.73	1.92	4.32	5.01	2.65	0.84	4.58	1.21
0.333													40.25	28.76	24.89	31.4	20.3	18.56	11.45	4.78	1.74	3.48
0.111													96.02	90.94	47.03	93.37	79.11	18.14	25.2	8.38	5.39	1.34
0.037													93	74.31	74.12	109.98	55.89	47.04	33.37	11.7	8.7	2.09
0	0	100.83	88.61	115.48	19.81	57.3	23.34	11.86	7	3.21												

											相加 性抑 制	TDF
[藥物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000		MM
化合物 3												
MM												
3	92.69	89.25	89.78	90.82	95.38	95.4	97.44	98.85	99.36	99.67		
1	83.1	75.15	76.38	78.78	89.31	89.36	94.09	97.33	98.51	99.24		
0.333	34.59	3.82	8.58	17.85	58.62	58.82	77.13	89.67	94.25	97.06		
0.111	-50.41	-121.16	-110.23	-88.9	4.85	5.32	47.4	76.24	86.78	93.25		
0.037	-63.72	-140.73	-128.83	-105.62	-3.57	-3.06	42.75	74.13	85.61	92.65		
0	0	-47.04	-39.77	-25.59	36.74	37.05	65.03	84.2	91.21	95.51		

[藥物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	協同作用曲線(99.9%)	TDF
化合物 3											邦弗朗尼調整	MM
3	0	0	0.207 47	0	0	0	0	0	0	0	協同作用	12.07
1	0	0	5.085 57	6.781 28	0	0	0	0	0	0	LOG 體積	1.73
0.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LOG 體積	0
0.037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

表 11b：使用bDNA分析之rcDNA定量的情況下HepDE19細胞培養系統中之活體外組合研究之結果的概述：

抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (MM)	抑制劑 B EC ₅₀ (MM)	協同作用 體積 (μM ² %)*	協同作用 LOG 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %)*	拮抗作用 LOG 體積	結論
化合物 3	替諾福韋 (TDF)	0.454	0.088	12.07	1.73	0	0	相加性

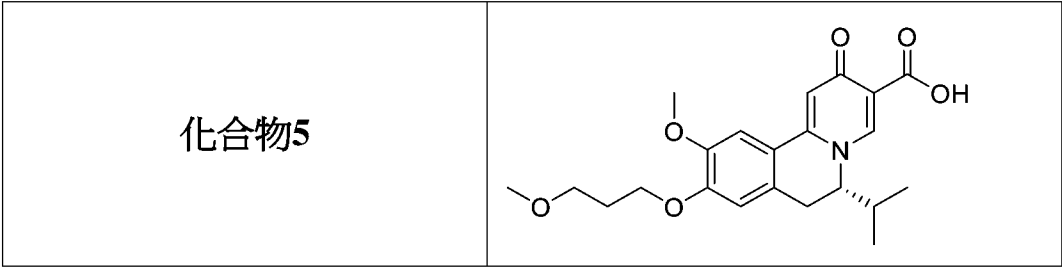
*在 99.9%置信區間

實例12

活體外組合研究目標：

為確定組合處理中之兩種化合物在B型肝炎病毒(HBV)轉染細胞培養物中將產生協同性、拮抗性抑或相加性作用。化合物5為乙型肝炎表面抗原(HBsAg)分泌之小分子抑制劑，而SIRNA-NP為脂質奈米粒子(LNP)囊封之RNAi抑制劑，其靶向病毒mRNA及病毒抗原表現。在此體外研究中使用HBV細胞培養系統來測定組合處理之影響。

小分子化學結構：

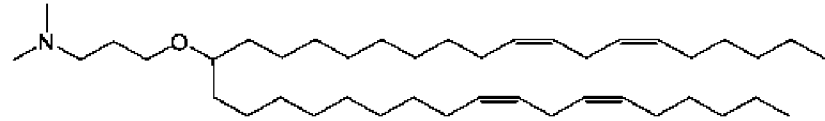


LNP調配物：

SIRNA-NP為靶向HBV基因組之三種siRNA之混合物的脂質奈米粒子調配物。在本文報導之實驗中使用以下脂質奈米粒子(LNP)產物來遞送HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。二硬脂醯基磷脂醯膽鹼縮寫為DSPC。

PEG(2000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構：



siRNA

以下顯示三種siRNA之序列。

	有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN =鹼基N之RNA		
mN =鹼基N之2'O-甲基修飾		

活體外組合實驗方案：

使用Prichard及Shipman之方法進行活體外組合研究(Prichard MN
第 113 頁(發明說明書)

及 Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14(4-5), 181-205 ; 及 Prichard MN等人, *MacSynergy II*)。HepG2.2.15細胞培養系統為衍生自人類肝母細胞瘤HepG2細胞之細胞株, 如Sells等人先前解釋其已經adw2-亞型HBV基因組穩定轉染(*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1987. 第84卷:1005-1009)。HepG2.2.15細胞分泌Dane樣病毒粒子, 產生HBV DNA, 且亦產生病毒蛋白乙型肝炎抗原(HBeAg)及乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。

為測試化合物組合, 將HepG2.2.15 (30,000個細胞/孔)在補充有1%青黴素-鏈黴素, 20 $\mu\text{g/mL}$ 遺傳黴素(G418)、10%胎牛血清的RPMI + L-麩醯胺培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中, 且在濕潤孵育器中在37°C及5% CO_2 下孵育隔夜。次日, 為細胞補充新鮮培養基隨後添加溶解於100% DMSO中之0.1 μM 至0.000015 μM 之濃度範圍的化合物5。將SIRNA-NP溶解於100% RPMI培養基中且以2.5 nM至0.025 nM之濃度範圍添加至細胞。將微量滴定細胞板在濕潤孵育器中在37°C及5% CO_2 下孵育6天之持續時間。連續稀釋跨越各化合物之 EC_{50} 值各自的濃度範圍, 並且分析之最終DMSO濃度為0.5%。除以棋盤方式對化合物之組合測試之外, 亦單獨測試化合物5與SIRNA-NP。

各板上在多個孔中包括未處理之陽性對照樣品(於培養基中之0.5% DMSO)。在6天孵育之後, 自經處理之細胞移除培養基用於HBsAg化學發光免疫分析(CLIA) (Autobio Diagnostics, 目錄號CL0310-2)。產生HBsAg標準曲線以證實HBsAg定量之水準在分析之偵測限值以內。藉由使用細胞-效價Glo試劑(Promega)按照製造商之說明書測定細胞內三磷酸腺苷(ATP)且在抑制劑處理之持續時間內藉由

對細胞之顯微鏡分析來評估其餘抑制劑處理之細胞的細胞毒性。以佔未處理之陽性對照孔之百分比的形式來計算細胞活力。

使用EnVision多模式讀板儀(PerkinElmer模號2104)來讀取板。使用各孔之相對發光單位(RLU)資料以佔未處理之陽性對照孔的抑制百分比的形式計算HBsAg水準，且使用Prichard-Shipman組合模型使用MacSynergy II程式分析(Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. 第14卷(4-5):181-205；Prichard MN, Aseltine KR及Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992)以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積 $<25 \mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 <2) =可能不顯著；25-50 ($\log$ 體積 >2 且 <5) =微小但顯著，50-100 ($\log$ 體積 >5 且 <9) =中度，在活體內可為重要的；超過100 ($\log$ 體積 >9) =強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近1000 ($\log$ 體積 >90) =異常地高，查驗資料。在微軟Excel中使用XL-Fit模組分析單一化合物處理之細胞的RLU資料以使用4參數曲線擬合算法來確定 EC_{50} 值。

將化合物5（濃度範圍為於半對數3.16倍稀釋系列中0.1 μM 至0.000015 μM 且進行8-點滴定）與 SIRNA-NP（濃度範圍為於半對數3.16倍稀釋系列中2.5 nM至0.025 nM且進行6-點滴定）組合進行測試。組合結果係一式三份地完成，並且各分析由4次技術重複組成。根據Prichard及Shipman進行之協同作用及拮抗作用體積之量測及解釋顯示於表12e中。此組合之抗病毒活性顯示於表12a1、12a2及12a3中；協同作用及拮抗作用體積顯示於表12b1、12b2及12b3中。此組合之相加性抑制活性顯示於表12d1、12d2及12d3中。在此分析系統中，組合產

生HBsAg分泌之相加性抑制。藉由顯微術或細胞-效價Glo分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制(表12c1、12c2及12c3)。

試驗1

表12a1. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之平均抑制百分比(n = 4個樣品/數據點)

SIRNA-NP， μM 平均抑制%	0.0025	86.52	85.69	87.32	88.31	89.63	90.42	90.86	89.67	91.42	86.52
	0.00079	77.54	77.93	78.77	80.65	85.38	87.61	88.97	89.29	90.33	77.54
	0.00025	58.33	51.65	58.01	66.99	71.54	78.68	82.99	85.31	85.23	58.33
	7.9E-05	32.28	31.08	41.8	56.24	67.66	74.98	81.22	85.88	85	32.28
	2.5E-05	23.11	23.81	29.3	46.54	60.92	70.18	78.45	80.94	82.53	23.11
	0	10.26	15.09	25.37	37.06	55.53	66.43	75.94	80.86	79.69	10.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5，μM										

表12b1. 化合物5及SIRNA-NP組合之MacSynergy體積計算：99.99%
置信區間(邦弗朗尼調整96%)

SIRNA-NP， μM 協同作用 0 Log 體積 0 拮抗作用 -3.69 Log 體積- 0.92	0.0025	0	0	0	0	0	0	-0.47	-0.92	0	0
	0.00079	0	0	0	0	0	0	-1.51	0	0	-0.79
	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5，μM										

表12c1. 化合物5及SIRNA-NP組合之細胞毒性：

相較於對照之平均細胞活力百分比

SIRNA-NP ， μM 平均細胞活力 %	0.0025	103	97	102	102	100	101	105	109	107	123
	0.00079	103	92	99	96	105	106	101	109	101	98
	0.00025	101	47	122	107	59	109	100	115	104	104
	7.9E-05	104	128	120	109	152	107	109	106	95	101
	2.5E-05	95	100	111	107	95	96	100	102	98	115
	0	100	113	109	99	100	92	111	112	110	136
	0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1	
化合物	化合物5，μM										

表12d1. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之相加性抑制百分比 (n = 4 個樣品/數據點)

SIRNA-NP ， μM 相加性抑制%	0.0025	83.86	85.52	86.3	87.95	89.84	92.82	94.58	96.12	96.91	96.72
	0.00079	73.95	76.62	77.88	80.56	83.6	88.42	91.26	93.73	95.01	94.71
	0.00025	49.38	54.57	57.02	62.22	68.14	77.49	83.01	87.82	90.31	89.72
	7.9E-05	23.95	31.75	35.43	43.24	52.13	66.18	74.47	81.7	85.44	84.55
	2.5E-05	12.12	21.14	25.38	34.42	44.69	60.92	70.5	78.86	83.18	82.15
	0	0	10.26	15.09	25.37	37.06	55.53	66.43	75.94	80.86	79.69
	0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1	
化合物	化合物5，μM										

試驗2

表12a2. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之平均抑制百分比 (n = 4 個樣品/數據點)

SIRNA-NP ， μM 平均抑制%	0.0025	77.7	81.95	80.51	81.58	84.83	83.97	84.26	87.08	86.03	84.01
	0.00079	69.06	70.21	58.33	75.38	79.52	83.66	85.31	87.4	86.12	86.83
	0.00025	43.84	47.41	58.38	58.03	67.92	76.4	79.69	82.57	84.39	86.46
	7.9E-05	25.14	44.78	40.61	46.87	58.4	70.57	73.31	84.9	88.29	87.05
	2.5E-05	14.38	27.11	38.49	45.73	55.88	65.5	77.37	78.71	83.62	86.14
	0	0	6.2	22.15	31.5	43.61	50.19	69.21	79.59	83.32	82.36
	0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1	
化合物	化合物5，μM										

表12b2. 化合物5及SIRNA-NP組合之MacSynergy體積計算：99.9%置信區間(邦
弗朗尼調整96%)

SIRNA-NP, μ M 協同作用 0 Log 體積 0 拮抗作用 -3.62 Log 體積-0.9	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	-3.6	0
	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5， μ M										

表12c2. 化合物5及SIRNA-NP組合之細胞毒性：

相較於對照之平均細胞活力百分比

SIRNA-NP， μ M 平均細胞活力 %	0.0025	88	90	74	76	82	77	74	75	90	108
	0.00079	77	72	67	68	65	67	68	65	71	110
	0.00025	79	75	66	73	71	67	64	63	74	114
	7.9E-05	88	75	73	76	55	68	68	64	79	116
	2.5E-05	90	84	68	74	69	71	66	66	80	110
	0	100	94	92	113	90	98	109	108	112	133
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5， μ M										

表12d2. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之相加性抑制百分比(n = 4 個樣品/數據點)

SIRNA-NP， μ M 相加性抑制%	0.0025	77.7	79.08	82.64	84.72	87.43	88.89	93.13	95.45	96.28	96.07
	0.00079	69.06	70.98	75.91	78.81	82.55	84.59	90.47	93.69	94.84	94.54
	0.00025	43.84	47.32	56.28	61.53	68.33	72.03	82.71	88.54	90.63	90.09
	7.9E-05	9.82	15.41	29.79	38.23	49.15	55.08	72.23	81.59	84.96	84.09
	2.5E-05	23.02	27.79	40.07	47.27	56.59	61.66	76.3	84.29	87.16	86.42
	0	0	6.2	22.15	31.5	43.61	50.19	69.21	79.59	83.32	82.36
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5， μ M										

試驗3

表12a3. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之平均抑制百分比(n = 4 個樣品/數據點)

SIRNA-NP , μM 平均抑制%	0.0025	89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	0.00079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
	0.00025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47
	7.9E-05	33.52	48.6	56.24	64.34	70.97	80.05	88.29	92.69	93.52	90.87
	2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
	0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5 , μM										

表12b3. 化合物5及SIRNA-NP組合之MacSynergy體積計算：99.99%置信區間

(邦弗朗尼調整96%)

SIRNA-NP, μM 協同作用 0 Log 體積 0 拮抗作用 0 Log 體積 0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5 , μM										

表12c3. 化合物5及SIRNA-NP組合之細胞毒性：

相較於對照之平均細胞活力百分比

SIRNA-NP , μM 平均細胞活力 %	0.0025	97	116	112	124	112	126	124	122	122	95
	0.00079	103	115	112	123	109	118	125	127	126	124
	0.00025	115	135	129	140	119	135	129	148	136	122
	7.9E-05	113	129	131	133	130	139	131	138	146	130
	2.5E-05	113	153	140	140	131	134	137	147	143	124
	0	100	131	127	140	131	128	131	141	127	99
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5 , μM										

表12d3. 化合物5及SIRNA-NP組合之抗病毒活性：

相較於陰性對照之相加性抑制百分比(n = 4 個樣品/數據點)

SIRNA-NP , μM 相加性 抑制%	0.0025	89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	0.00079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
	0.00025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47
	7.9E-05	33.52	48.6	56.24	64.34	70.97	80.05	88.29	92.69	93.52	90.87
	2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
	0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物5 , μM										

表12e. 藉由CLIA進行之HBsAg定量的情況下HepG2.2.15細胞培養系統中之活體外組合研究之結果的概述

試驗 1	化合物 5 EC ₅₀ (μM)	SIRNA-NP EC ₅₀ (nM)	協同作用 體積 (μM ² %)	協同作用 Log 體積	拮抗作用 (μM ² %)	拮抗作用 Log 體積	解釋
1	0.002	0.00026	0	0	-3.69	-0.92	相加性
2	0.005	0.00035	0	0	-3.62	-0.9	相加性
3	0.002	0.00020	0	0	0	0	相加性

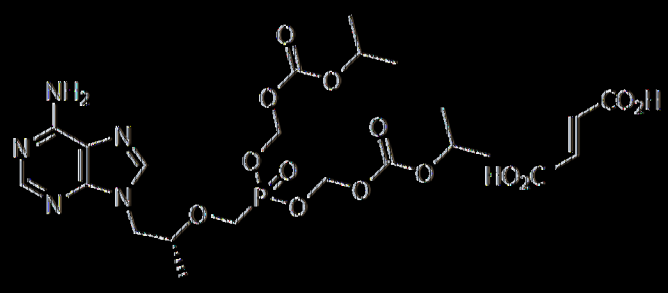
*在 99.9%置信區間

實例 13

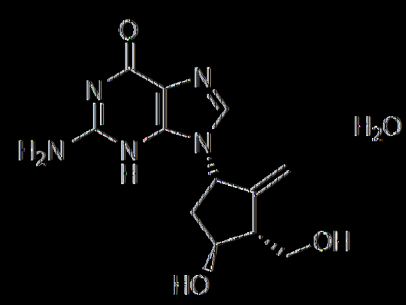
活體外組合研究目標：

此研究之目標為在活體外使用HBV細胞培養模型系統來確定替諾福韋(呈前藥替諾福韋雙索酯反丁烯二酸酯或TDF (HBV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之形式)或恩替卡韋(呈水合恩替卡韋或ETV (HBV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之形式)與SIRNA-NP (旨在促進所有病毒mRNA轉錄物及病毒抗原之有效敲低的siRNA)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

替諾福韋及恩替卡韋之化學結構：



替諾福韋雙索酯反丁烯二酸酯(UDF)



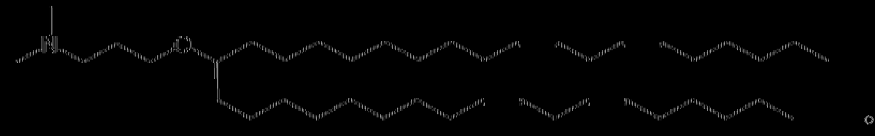
水合恩替卡韋(ETV)

siRNA-NP之組合物：

siRNA-NP為靶向EBV基因組之三種siRNA之混合物的脂質奈米粒子調配物。使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送EBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫DSPC意謂二硬脂醯基磷醯膽鹼，而PEG為PEG 2000。

PEG(2000)-CDMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構：



以下顯示三種siRNA之序列。

有義序列(5'..3')	反義序列(5'..3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUm UrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmU mGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrU mUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCr UmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrA mArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrG mCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN：鹼基N之RNA	
mN：鹼基N之2'O-甲基修飾	

活體外組合實驗方案：

使用Prichard及Shipman之方法進行活體外組合研究(Prichard MN, Shipman C, Jr., *Antiviral Res*, 14, 181-205 (1990))。如Guo等人所描述研發HepDE19細胞株(Guo等人, *J Virol*, 81, 12472-12484 (2007))。其為經HBV基因組穩定轉染之人類肝癌細胞株，且其可表現HBV前基因組RNA且以四環素調控之方式支持進行的HBV rcDNA (松環DNA)合成。將HepDE19細胞在不含四環素之補充有10%胎牛血清+ 1%青黴素-鏈黴素的DMEM/F12培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換新鮮培養基且用在相應 EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育7天之持續時間。將抑制劑在100% DMSO (ETV及TDF)或生長培養基(SIRNA-NP)中稀釋，且分析中之最終DMSO濃度≤0.5%。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各濃度之抑制劑A與各濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制rcDNA產生的影響。在48小時孵育之後，使用bDNA分析(Affymetrix)用HBV特異性定製探針組及製造商之說明書量測存在於抑制劑處理之孔中的rcDNA含量。以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算由各孔產生之RLU資料且使用MacSynergy II程式分析以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積 <25 $\mu\text{M}^2\%$ (log體積 <2) =可能不顯著；25-50 $\mu\text{M}^2\%$ (log體積 >2且 <5) =微小但顯著，50-100 $\mu\text{M}^2\%$ (log體積 >5且 <9) =中度，在活體內可為重要的；超過100 $\mu\text{M}^2\%$ (log體積 >9) =強協同作用，在活體內可能為

重要的；體積接近1000 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積>90) =異常地高，查驗資料。
同時，使用用於使用細胞-效價Glo試劑(Promega)按照製造商之說明書測定作為細胞活力之度量的ATP含量的重複板來評估抑制劑組合對細胞活力之影響。

結果及結論：

TDF與SIRNA-NP之活體外組合：

將TDF (濃度範圍為於2倍稀釋系列中1.0 μM 至0.004 μM 且進行10點滴定)與SIRNA-NP (濃度範圍為於3倍稀釋系列中25 ng/mL至0.309 ng/mL且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之TDF或SIRNA-NP處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表13a中。TDF及SIRNA-NP之 EC_{50} 值顯示於表13c中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較(表13a)時，按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan)所描述之解釋準則發現組合為相加性的(表13c)。

恩替卡韋與SIRNA-NP之活體外組合：

恩替卡韋(濃度範圍為於2倍稀釋系列中4.0 nM至0.004 μM 且進行10點滴定)與SIRNA-NP (濃度範圍為於3倍稀釋系列中25 ng/mL至0.309 $\mu\text{g/mL}$ 且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之ETV或SIRNA-NP處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表13b中。ETV及SIRNA-NP之 EC_{50} 值顯示於表13c中。當兩種抑制劑以以上濃度範圍組合時，按照MacSynergy II分析且使用由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現濃度組合為相加性

的。

表 13a：替諾福韋雙吡啶酯反丁烯二酸酯與 siRNA-NP 之活體外組合

藥物	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	平均抑制% TID ₅₀ (μM)
siRNA-NP ng/mL											
25	93.58	90.97	91.18	93.37	93.59	95.77	92.36	95.99	94.11	94.97	
8.333	88.63	88.87	88.05	92.79	92.07	92.97	95.69	95.77	94.62	97.07	
2.778	80.6	72.27	73.62	74.95	84.77	86.4	97.27	93.53	95.62	97.56	
0.926	74.78	36.07	41.83	74.94	60.37	76.87	82.62	97.36	95	97.09	
0.309	26.53	13.83	9.78	26.5	32.67	53.59	73.58	82.75	90.84	96.66	
0	0	5.27	0.67	2.82	6.57	47.67	66.08	87.55	90.85	94.55	
藥物	0	0.0039	0.007	0.015	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1	抑制百分(%) TID ₅₀ (μM)
siRNA-NP ng/mL											
25	8.23	5.78	2.1	5.36	4.77	2.77	5.57	2.37	3.88	1.7	
8.333	5.38	4.15	6.07	5.32	3.97	1.82	2.89	3.67	3.13	2.02	
2.778	13.12	72	6.27	14.72	12.72	5.29	3.1	1.92	1.72	1.37	
0.926	16.97	9.73	29.33	16.75	27.74	5.83	6.39	2.16	2.29	1.2	
0.309	12.07	73.02	33.58	19.89	52.79	25.65	77.77	6.67	5.58	1.79	
0	0	23.5	74.96	26.95	57.77	27.72	15.9	12.86	1.67	0.99	
藥物	0	0.0039	0.007	0.015	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1	抑制百分抑制 TID ₅₀ (μM)
siRNA-NP ng/mL											
25	93.58	93.27	93.62	93.76	94	96.26	97.82	98.82	99.77	99.65	
8.333	88.63	88.03	88.77	88.95	89.38	93.37	96.77	97.9	98.96	99.38	
2.778	80.6	79.58	80.73	81.75	87.87	88.68	93.72	96.72	98.22	98.97	
0.926	74.78	47.55	74.85	76.05	78.73	67.62	87.77	89.76	94.92	96.97	
0.309	26.53	22.66	27.02	28.6	37.36	57.74	75.08	86.77	93.28	96	
0	0	5.27	0.67	2.82	6.57	47.67	66.08	87.55	90.85	94.55	
藥物	0	0.00	0.07	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	估計抑制曲線 (99.9%) 邦非期望 調整 96%
siRNA-NP ng/mL											
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	估計抑制 0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 累積 0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	估計抑制 0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 累積 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

表 13b：恩替卡韋與 siRNA-NP 之活體外組合

藥物 siRNA-NP ng/ml	0	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	平均抑制 % ETV (nM)
25	94.31	92.38	93.86	94.7	93.85	95.21	92.88	95.49	94.28	95.63	
8.333	90.41	91.44	91.71	89.9	90.91	92.34	94.03	94.33	95.37	95.21	
2.778	76.74	74.61	62.81	75.26	79.3	82.04	86.38	90.76	92.08	91.18	
0.926	46.84	39.16	41.37	58.29	48.88	49.94	62.39	72.82	82.81	86.42	
0.309	28.68	27.78	12.18	5.93	8.2	19.18	27.55	56.01	73.11	79.23	
0	0	43.72	50.07	30.26	23.47	21.25	10.24	41.71	58.35	69.99	
藥物 siRNA-NP ng/ml	0	0.015	0.0312	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	平均抑制 (%) ETV (nM)
25	1.67	6.18	2.63	3.7	2.4	3.83	4.89	3.65	3.15	1.22	
8.333	2.86	5.03	5.65	8.63	2.5	1.68	2.18	3.07	1.44	2.47	
2.778	12.28	9.55	32.22	11.86	9.31	4.95	4.87	2.25	2.64	6.79	
0.926	17.81	22.17	35.16	8.83	25.87	17.46	17.5	7.78	4.36	5.46	
0.309	12.26	11.58	26.87	28.27	30.31	21.45	38.93	12.99	12.27	6.89	
0	0	47.73	38.3	41.27	25.17	56.81	65.13	33.53	17.75	11.48	
藥物 siRNA-NP ng/ml	0	0.015	0.0312	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	相對性抑制 ETV (nM)
25	94.31	91.82	91.46	92.59	92.97	93.1	93.73	96.68	97.63	98.29	
8.333	90.41	86.22	85.61	87.51	88.16	88.37	89.43	94.41	96.01	97.12	
2.778	76.74	66.57	65.09	69.7	71.28	71.8	74.36	86.44	90.31	93.02	
0.926	46.84	23.6	20.22	30.75	34.36	35.54	41.4	69.01	77.86	84.05	
0.309	28.68	2.5	7.03	7.1	11.94	13.52	21.38	58.43	70.3	78.6	
0	0	43.72	50.07	30.26	23.47	21.25	10.24	41.71	58.35	69.99	
藥物 siRNA-NP ng/ml	0	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.50	1	2	4	協同作用曲線 (99.9%) 邦非以外 調整 96%
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	協同作用 0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 體積 0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 體積 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

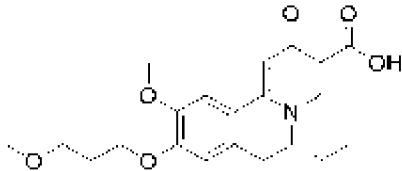
表 13c：使用 bDNA 分析之 rcDNA 定量的情況下 AML12-HBV10 細胞培養系統中之活體外組合研究之結果的概述：

抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (ng/mL)	抑制劑 B EC ₅₀	協同作用 體積 (μM ² %)*	協同作用 Log 體積	拮抗作用體積 (μM ² %)*	拮抗作用 Log 體積	結論
SIRNA-NP	替諾福韋 (TDF, μM)	0.947	0.089	0	0	0	0	相加性
SIRNA-NP	恩替卡韋 (ETV, nM)	0.906	1.780	5.37	0.77	0	0	相加性

*在 99.9%置信區間

實例14

實例中提及以下化合物。化合物**20**可使用已知程序製備。舉例來說，化合物**20**可如國際專利申請公開案第 WO2015113990 號中所描述來製備。

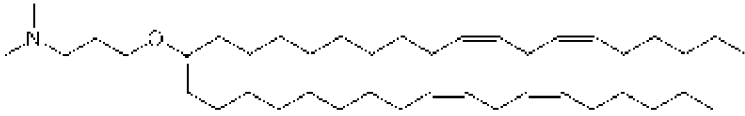
化合物編號或名稱	結構
20	

使用 B 型肝炎病毒 (HBV) 小鼠模型來評估 sAg 產生之小分子抑制劑及 HBV 靶向型 siRNA (**SIRNA-NP**) 作為獨立處理及彼此組合之抗 HBV 效果。

使用以下脂質奈米粒子 (LNP) 調配物來遞送 HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫 DSPC 意謂二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG(2000)-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	9

陽離子脂質具有以下結構：



經由尾部靜脈注射向C57/B16小鼠投與AAV1.2之1E11病毒基因組(描述於Huang, LR等人中*Gastroenterology*, 2012, 142(7):1447-50)。此病毒載體含有HBV基因組之1.2倍過長拷貝且除其他HBV產物外表現HBV表面抗原(HBsAg)。小鼠中之血清HBsAg表現係使用酶免疫分析來監測。基於血清HBsAg水準將動物分類(隨機化)至多個組中，使得a)所有動物經證實表現HBsAg，且b) HBsAg組平均值在處理開始之前彼此類似。

如下將動物用化合物**20**處理：在第0天起始，在第0天與第28天之間以每天兩次之頻率向動物經口投與3.0 mg/kg劑量之化合物**20**持續總共56個劑量。將化合物**20**溶解於共溶劑形成物中供投與。為陰性對照動物投與單獨的共溶劑調配物，或不用任何測試物品處理。如下將動物用脂質奈米粒子(LNP)囊封之HBV靶向型siRNA處理：在第0天，靜脈內投與等效於0.3 mg/kg siRNA之量的測試物品。將各處理之HBsAg表現水準與彼組第0天(劑量前)之值相比較。

處理之效果係藉由在第0天(處理前)、第7天、第14天及第28天收集血液且分析其血清HBsAg含量來確定。表14顯示以佔第0天個別動物處理前基線值之百分比表示的處理組平均(n = 5(對於siHBV和媒劑組合處理n = 4)；±標準平均誤差)血清HBsAg濃度。

資料證實響應於單獨及呈組合形式之化合物**20**與HBV siRNA之組合的血清HBsAg降低之程度。在所測試的每個時間點，化合物**20**與HBV siRNA之組合的處理產生與個別單一治療處理一樣好或更好的血清HBsAg降低。

表14. 在HBV感染小鼠模型中化合物20與三種HBV siRNA之單一及組合處理對血清HBV sAg之影響

處理1 (經口)	處理2 (靜脈內)	第0天	第7天	第14天	第21天	第28天
無	無	100 ± 0	80 ± 12	100 ± 18	72 ± 15	72 ± 16
媒劑	無	100 ± 0	37 ± 8	62 ± 9	112 ± 66	127 ± 67
化合物20	無	100 ± 0	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
媒劑	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	19 ± 9	45 ± 25
化合物20	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	5 ± 2	8 ± 2

實例15-24

在原代人類肝細胞中進行的研究的材料及方法
動物

FRG小鼠購自 Yecuris (Tualatin, OR, USA)。小鼠之詳細資訊顯示於下表中。研究由 WuXi IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC協定R20160314-小鼠)批准。允許小鼠適應新環境7天。每天監測小鼠之總體健康及生理及行為異常之任何跡象。

FRG小鼠技術資料

籠ID	小鼠ID	供體ID	出生日期	移植日期	運輸前白蛋白(μg/ml)	性別	運輸前BW(g)
1	37094	HHM30017	12/15/2015	01/28/2016	4887	雄性	24.9
2	37211	HHM27018	01/03/2016	02/24/2016	4284	雄性	23.5
3	37258	HHM27018	01/06/2016	02/24/2016	4282	雄性	29.4
4	37611	HHM30017	02/22/2016	04/06/2016	6627	雄性	25.3
5	37955	HHM27018	03/31/2016	05/19/2016	5990	雄性	25.5
6	37900	HHM27018	03/23/2016	05/04/2016	4802	雄性	27.1
7	37976	HHM27018	03/20/2016	05/04/2016	4520	雄性	24.7

測試物品

化合物**3**、**22**、**23**、**24**及**25**由Arbutus Biopharma提供。Peg-干擾素α-2a (Roche，180 μg/0.5ml)由WuXi提供。TAF、恩替卡韋、替諾福韋、拉米夫定及TDF由WuXi提供於DMSO溶液中。關於化合物之資訊顯示於下表中。

測試物品之資訊

化合物名稱	小瓶ID	分子量	尺寸	供應商
25	031NH	401.19	3.1 mg	Arbutus
3	031NR	386.4	3.8 mg	Arbutus
22	031NP	398.4	2.9 mg	Arbutus
23	031NT	379.3	2.9 mg	Arbutus
24	031NV	396.8	2.6 mg	Arbutus
化合物名稱	供應商	目錄編號	儲備液濃度	
聚乙二醇干擾素α-2a	Roche		180 μg/0.5ml (5040000 IU/ml)	由WuXi提供
TAF	SelleckChem	S7856	10 mM	由WuXi提供
TDF	Shanghai Sphchem Co., Ltd.		20 mM	由WuXi提供

病毒

D型HBV係濃縮自HepG2.2.15培養物上清液。病毒之資訊顯示於下表中。

HBV之資訊

病毒ID	批號	血清中之HBV效價(GE*/ml)	基因型	來源
HBV_2.2.15	HBV20160407	2.00E+09 GE/ml	D (Genebank ID：U95551)	HepG2.2.15上清液
HBV_2.2.15	B161011	1.9E+09 GE/ml	D (Genebank ID：U95551)	HepG2.2.15上清液
HBV_2.2.15	B161129	1.5E+09 GE/ml	D (Genebank ID：U95551)	HepG2.2.15上清液

*GE，HBV基因組等效物。

試劑

研究中所用之主要試劑為QIAamp 96 DNA血液套組(QIAGEN # 51161)、FastStart通用探針預混液(Roche # 04914058001)、細胞計數套組-8 (CCK-8) (Biolite # 35004)、HBeAg ELISA套組(Antu # CL 0312)及HBsAg ELISA套組(Antu # CL 0310)。

儀器

研究中所用之主要儀器為BioTek Synergy 2, SpectraMax (Molecular Devices)、7900HT快速實時PCR系統(ABI)及Quantistudio 6 實時PCR系統(ABI)。

收穫原代人類肝細胞(PHH)

應用小鼠肝臟灌注來分離PHH。藉由Percoll進一步純化分離之肝

細胞。用培養基將細胞再懸浮且接種至96孔板(6×10^4 個細胞/孔)或48孔板(1.2×10^5 個細胞/孔)中。接種後一天(第1天)用D型HBV感染PHH。

PHH之培養及處理。

在第2天，稀釋測試化合物且添加至細胞培養板中。每隔一天更新含有化合物的培養基。在第8天收集細胞培養物上清液用於HBV DNA和抗原測定。

EC₅₀值之測定。

以7種濃度3倍稀釋一式三份地測試化合物。

雙重組合研究。

在三個相同的板中以5×5矩陣測試兩種化合物。

在第8天藉由細胞計數套組-8分析細胞毒性

從細胞培養板移除培養基，且然後添加CCK8 (Biolite # 35004)工作溶液至細胞中。將板在37℃下孵育，且藉由SpectraMax在450nm波長下量測吸收率且在650nm波長下量測參考吸收率。

藉由qPCR定量培養物上清液中之HBV DNA

用QIAamp 96 DNA血液套組(Qiagen-51161)分離在第8天收穫的培養物上清液中的DNA。對於各樣品，使用100 μl之培養物上清液來萃取DNA。用100μl、150μl或 180 μl AE溶離DNA。藉由qPCR定量培養物上清液中之HBV DNA。藉由MacSynergy軟體分析組合影響。下文描述引物。

引物資訊

引物R	GACAAACGGGCAACATACCTT
引物F	GTGTCTGCGGCGTTTTATCA
探針	5’FAM CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC 3’TAMRA

藉由ELISA量測培養物上清液中之HBsAg及HBeAg

藉由HBsAg/HBeAg ELISA套組(Autobio)根據手冊量測在第8天收穫之培養物上清液中之HBsAg/HBeAg。將樣品用PBS稀釋以得到在標準曲線範圍內之信號。用下式計算抑制率。藉由MacSynergy軟體分析組合影響。

$$\text{HBsAg抑制\%} = [\text{樣品之1-HBsAg量} / \text{DMSO對照之HBV量}] \times 100。$$

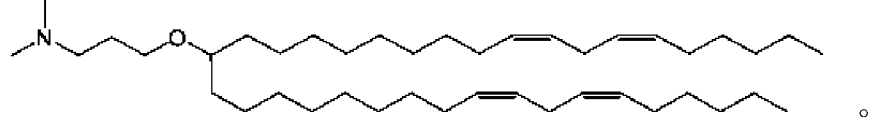
$$\text{HBeAg抑制\%} = [\text{樣品之1-HBeAg量} / \text{DMSO對照之HBV量}] \times 100。$$

SIRNA-NP

SIRNA-NP為靶向HBV基因組之三種siRNA之混合物的脂質奈米粒子調配物。使用以下脂質奈米粒子(LNP)調配物來遞送HBV siRNA。表中所示之值為莫耳百分比。縮寫DSPC意謂二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。

PEG-C-DMA	陽離子脂質	膽固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

陽離子脂質具有以下結構：



以下顯示三種siRNA之序列。

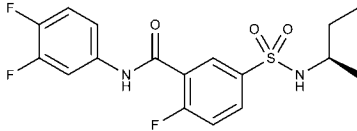
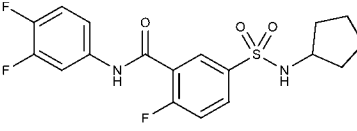
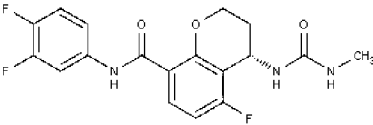
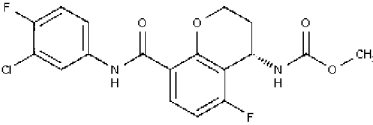
	有義序列(5'-3')	反義序列(5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmU rCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUm GrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrU mUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrU mGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAm ArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGm CrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 鹼基N之RNA	
	mN = 鹼基N之2'O-甲基修飾	

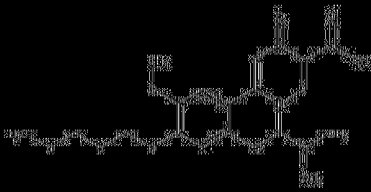
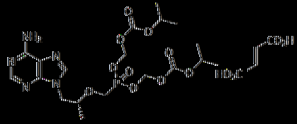
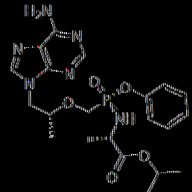
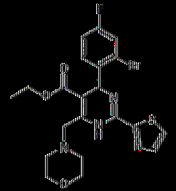
聚乙二醇化干擾素 $\alpha 2a$ (IFN $\alpha 2a$)之組合物：

此藥劑購自商業來源：

樣品ID	供應商	尺寸	批號	儲備液濃度
聚乙二醇干擾素 α -2a	Roche	180 μ g/0.5ml	B1370	5040000 IU/mL

亦使用以下化合物。

化合物名稱或ID號	結構
3	
22	
23	
24	

25	
替諾福韋雙索酯反丁烯二酸酯 (TDF)	
替諾福韋艾拉酚胺(TAF)	
GILS4 (TAF)	

實例15

化合物24與TDF之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HCV感染之人類原代肝細胞來確定化合物24（屬於胺基色滿化學類別之HCV衣殼化小分子抑制劑）及替諾福韋（呈前藥替諾福韋雙索酯反丁烯二酸酯或TDF形式，HCV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑）之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將TDF（濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM）進行5點滴定）與24（濃度範圍為於3倍稀釋系列中1000 nM至12.36 nM）進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之24或TDF處理觀測到的HCV RNA、HBSAg及HBCAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯

示於如下所示之表15a、15b及15c中。TDF及24之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表15d中；由不同批次之PTEC細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性或相加性，沒有拮抗作用(表15d)。藉由顯微術或CCK8分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表15a：在化合物24與TDF之活體外組合中對HCBV DNA之影響

藥物 TDF (nM)	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00				平均抑制% 化合物 24 (nM)
10.00	15.4	16.23	29.76	33.41	71.99	82.62				
3.33	3.15	24.17	30.1	39.55	71.87	87.48				
1.11	2.49	24.8	24.74	33.45	73.25	86.58				
0.37	6.24	17.61	35.35	37.05	68.52	87.29				
0.12	1.16	25.72	25.72	33.54	75.06	86.83				
0.00	0	37.82	31.86	4.54	59.29	81.07				
藥物 TDF (nM)	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00				標準偏差(% 化合物 24 (nM)
10.00	20.95	6.25	5.54	19.51	4.45	1.41				
3.33	2.99	2.31	4.58	5.73	2.67	0.32				
1.11	16.52	2.03	9.07	11.11	3.67	1.02				
0.37	19.46	1.06	13.17	2.12	3.62	0.7				
0.12	21.38	7.78	1.65	6.37	1.38	1.46				
0.00	15.8	17.16	15.42	5.85	4.36	3.8				
藥物 TDF (nM)	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00				相加性抑制 化合物 24 (nM)
10.00	15.4	59.04	52.17	20.64	53.02	78.15				

表 15b：在化合物 24 與 TDDF 之溶液外組合中對 ICCsAg 之影響

表 15c：在化合物 24 與 TDF 之溶液外組合中對 ICBcAg 之影響

NOB/V 分析終 點	抑制 劑 A	抑制 劑 B	抑制劑 A IC ₅₀ (nM) #	抑制 劑 B IC ₅₀ (nM) #	協同作 用體積 (μ M ² %) *	協同作 用 Log 體積	拮抗作用 體積 (μ M ² %) *	拮抗作用 Log 體積	結論
NOB/V DNA	100%	24	5.16	181.6	586.54	133.52	0	0	協同 作用
NOBsAg	100%	24	>100	~1104	166.48	37.9	0	0	協同 作用
NOBcAg	100%	24	>100	1087	0	0	0	0	相加 性

*在 99.9%置信區間

在較早的單獨實驗中測得

例题 16

化合物**23**與TDF之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HBV感染之人類原代肝細胞來確定化合物**23** (屬於胺基色滿化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑)及替諾福韋(呈前藥替諾福韋雙索酯反丁烯二酸酯或TDF形式，HBV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將TDF (濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM且進行5點滴定)與化合物**23** (濃度範圍為於3倍稀釋系列中2000 nM至24.69 nM且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物**23**或TDF處理觀測到的HBV DNA、HBsAg及HBeAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表16a、16b及16c中。TDF及化合物**23**之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表16d中；由不同批次之PHH細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性或相加性，沒有拮抗作用(表16d)。藉由顯微術或CCK8分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表16a：在化合物23與TDF之活體外組合中對HCBV DNA之影響

藥物 TDF (nM)	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	平均抑制% 化合物 23 (nM)
10.00	22.03	15.63	21.53	50.31	68.1	83.45	
3.33	24.89	11.9	25.62	42.03	71.16	83.1	
1.11	24.36	27.41	25.29	49.82	71.34	85.27	
0.37	4.64	15.87	10.9	25.68	66.73	79.5	
0.12	19.34	14.57	16.57	17.02	55.55	74.8	
0.00	0	15.33	36.58	0.78	30.45	69.97	
藥物 TDF (nM)	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	標準偏差(%) 化合物 23 (nM)
10.00	19.88	12.93	22.36	13.69	10.17	4.55	
3.33	25.42	13.82	12.76	20.92	9.9	3.38	
1.11	26.88	5.72	8.4	18.61	10.85	1	
0.37	22.45	24.04	16.71	27.51	6.72	2.89	
0.12	30.56	14.7	14.28	32.63	13.67	7.16	
0.00	28.21	25.59	43.45	19.95	15.55	7.23	
藥物 TDF (nM)	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	相加性抑制 化合物 23 (nM)
10.00	22.03	10.08	6.49	22.64	45.77	76.59	
3.33	24.89	13.38	2.59	25.48	47.76	77.44	
1.11	24.36	12.76	3.31	24.95	47.39	77.29	
0.37	4.64	20.68	42.92	3.82	27.22	68.58	
0.12	19.34	37.63	62.99	18.41	17	64.16	
0.00	0	15.33	36.58	0.78	30.45	69.97	
藥物 TDF (nM)	0	24.697	74.074	222.22	666.67	2000	協同作用曲線 (99.9%) 邦非朗 校正 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	協同作用 用 60.83
3.33	0	0	0	0	0	0	log 濃度 13.85
1.11	0	0	0.9556	0	0	9	

表 16b：在化合物 23 與 TDF 之系統外組合中對 HCBsAg 之影響

(nM)							力調整
10.00	0	0	0	0	0	0	酶作用
3.33	0	0	0	12.1624	0	0	用 45.85
1.11	0	2.80299	0	0	3.25499	0	log 底質 10.44
0.37	0	11.3314	0	2.46093	0	0	拮抗作用
0.12	0	123388	0	0	0	0	用 0
0.00	0	0	0	0	0	0	log 底質 0

表 16c：在化合物 23 與 TDF 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

藥物	0.00	24.69	14.01	222.22	666.61	2000.00	平均抑制%
TDF (nM)							化合物 23 (nM)
10.00	0.12	10.51	5.28	10.54	11.8	5.49	
3.33	9.05	5.09	3.12	2.98	4.06	4.28	
1.11	12.18	1.59	9.52	0.11	1	124	
0.37	6.14	4.31	2.31	6.35	6.4	10.51	
0.12	4.4	8.09	5.22	0.68	6.5	1.62	
0.00	0	8.82	6.36	12.11	1.94	1.09	

藥物	0.00	24.69	14.01	222.22	666.61	2000.00	標準偏差(%)
TDF (nM)							化合物 23 (nM)
10.00	10.18	11.81	6.61	8.4	11.1	15.98	
3.33	9.99	19.89	13.21	11.51	1.18	11.13	
1.11	8.33	4.36	8.23	1.06	4.64	6.33	
0.37	12.35	9.41	8.19	15.01	13.35	11.14	
0.12	5.94	2.55	2.12	11.85	12.5	9.82	
0.00	16.21	1.94	6.49	8.83	9.41	1.31	

藥物	0.00	24.69	14.01	222.22	666.61	2000.00	相加性抑制
TDF (nM)							化合物 23 (nM)
10.00	0.12	8.04	5.59	11.9	1.16	0.36	
3.33	9.05	1.03	3.21	2.51	1.83	8.06	
1.11	12.18	5.09	123	1.69	5.85	11.83	

NOB-V 分析 終點	抑制劑 A	抑制 劑 B	抑制 劑 A IC ₅₀ (nM) #	抑制 劑 B IC ₅₀ (nM) #	協同作用 體積 (μM ² %) *	協同作用 Log 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %) *	拮抗作用 Log 體積	結論
NOB-V DNA	TMDF	化合物 23	5.62	229.6	60.83	13.85	0	0	協同 作用
NOBsAg	TMDF	化合物 23	>100	4.36	45.85	10.44	0	0	協同 作用
NOBcAg	TMDF	化合物 23	>100	4.53	3.73	0.85	0	0	相加 性

*在 99.9% 置信區間

在較「準」的「獨實驗」測得

例 17

化合物23與TAE之活體外組合

酒體外組合研究 | 續

在活體外在細胞培養模型系統中使用 HCV 感染之人類原代肝細胞來確定化合物 23 (屬於胺基色滿化學類別之 HCV 衣殼化小分子抑制劑)及替諾福韋(呈前藥替諾福韋艾拉酚胺或 TAF 形式，HCV 聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將 TAF (濃度範圍為於 3 倍稀釋系列中 10.0 nM 至 0.12 nM 且進行 5 點滴定)與化合物 23 (濃度範圍為於 3 倍稀釋系列中 2000 nM 至 24.69 nM 且進行 5 點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物 23 或 TAF 處理觀測到的 HCV RNA 及 HCVsAg 之平均抑制 % 及 3 次重複之標準偏差顯示於如下所示之表 1/a 及 1/b 中。TAF 及化合物 23 之 EC₅₀ 值係在較早的實驗中測得且顯示於表 1/c 中；由不同批次之 PCCL₂ 細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照 MacSynergy III 分析且使用上文由 Prichard 及 Shipman (1992) 所描述之解釋準則發現組合為相加性，沒有拮抗作用(表 1/c)。藉由顯微術或 CCK8 分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表 1/a：在化合物 23 與 TAF 之活體外組合中對 HCV RNA 之影響

藥物	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	平均抑制 % 化合物 23 (nM)
TAF (nM)	0.00						
10.00	43.33	52.66	53.67	61.85	59.03	65.33	
3.33	42.6	41.59	42.58	42.01	55.87	53.47	
1.11	2.73	26	24.84	30.46	45.15	52.57	
0.37	11.59	10.66	15.11	15.55	38.82	64.27	

表 1/b：在化合物 23 與 TAF 之活體外組合中對 JCBsAg 之影響

藥物	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	平均抑制%
TAF (nM)							化合物 23 (nM)
0.00							
10.00	6.38	6.2	3.4	8.69	5.26	23.51	
3.33	16.12	9.58	9.56	0.37	11.57	28.58	
1.11	29.66	18.05	20.47	9.86	18.31	33.24	
0.37	7.04	11.13	3.66	2.3	2.92	22.22	
0.12	22.99	21.29	19.81	16.79	8.85	28.41	
0.00	0	0.77	5.27	4.83	1.95	22.77	
藥物	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	標準偏差(%)
TAF (nM)							化合物 23 (nM)
10.00	3.03	12.27	11.65	6.93	7.08	10.25	
3.33	3.66	2.28	2.6	17.49	9.97	8.2	
1.11	9.01	17.67	8.37	8.64	8.88	5.26	
0.37	9.67	9.77	10.47	17.15	5.76	1.93	
0.12	3.68	9.92	15.76	11.59	9.9	13.42	
0.00	1.83	21.63	8.58	26.08	6.99	7.12	
藥物	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	相對性抑制
TAF (nM)							化合物 23 (nM)
10.00	6.38	7.1	1.45	10.9	8.21	27.7	
3.33	16.12	16.77	11.7	20.17	17.76	35.22	
1.11	29.66	30.2	25.95	33.06	31.63	45.68	
0.37	7.04	7.76	2.14	11.53	8.85	28.21	
0.12	22.99	23.58	18.93	26.71	24.49	40.53	
0.00	0	0.77	5.27	4.83	1.95	22.77	
藥物	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	協同作用曲線 (99.9%)
TAF (nM)							邦非切 入調整
10.00	0	0	0	0	0	0	98%
							協同作用
							用
10.00	0	0	0	0	0	0	0

3.33	0	0	0	0	0	0	log 體積	0
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.12	0	0	0	0	0	0	log 體積	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

表 1/c：在 HepG2 細胞培養系統中化合物 23 及 TAEF 之活體外組合研究之結果的概述：

ECV 分析終點	抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (mM)#	抑制劑 B EC ₅₀ (mM)#	協同作用體積 (μM ² %)*	協同作用 Log 體積	拮抗作用體積 (μM ² %)*	拮抗作用 Log 體積	結論
ECV DNA	TAEF	化合物 23	0.405	229.6	1.89	0.43	-8.64	-1.97	相加性
ECVsAg	TAEF	化合物 23	>100	4.36	0	0	0	0	相加性

*在 99.9%置信區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例 18

IFNα2a 與化合物 25 之活體外組合研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用 ECV 感染之人類原代肝細胞來確定化合物 25 (屬於二氫喹啉酮化學類別的 ECV DNA、ECVsAg 及 ECcAg 之小分子抑制劑)及聚乙二醇化干擾素 α2a (IFNα2a，活化肝細胞中之先天免疫通路的抗病毒細胞因子)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將 IFNα2a (濃度範圍為於 3 倍稀釋系列中 10.0 IU/mL 至 0.123

IU/mL,且進行5點滴定)與化合物25 (濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM,且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之IFNa2a或化合物25處理觀測到的HCV DNA、HBSAg及HBCAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表18a、18b及18c中。IFNa2a及化合物25之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表18d中；由不同批次之HCC細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性，沒有拮抗作用(表18d)。藉由顯微術或CCK8分析未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表18a：在IFNa2a與化合物25之活體外組合中對HCV DNA之影響

藥物	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	平均抑制% 化合物 25 (uM)
IFNa2a IU/mL							
10.00	58.66	72.01	77.55	74.4	74.57	75.72	
3.33	46.92	70.84	75.67	71.52	79.37	81.47	
1.11	32.66	60.24	64.08	65.29	76.55	76.76	
0.37	22.81	48.83	55.68	55.85	71.09	75.44	
0.12	19.84	40.19	39.08	36.54	65.34	64.9	
0.00	0	14.4	9.87	4.3	32.64	53.78	
藥物	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	標準偏差(%) 化合物 25 (uM)
IFNa2a IU/mL							
10.00	8.37	0.96	1.44	5.16	6.13	9.02	
3.33	6.8	2.16	3.21	1.91	3.01	4.5	
1.11	7.03	10.58	6.34	2.57	2.47	2.79	
0.37	6.72	4.66	7.04	12.83	7.17	1.6	
0.12	15.09	10.34	11.46	15.82	5.84	3.79	

表 18b：在 CFNa₂a 與化合物 25 之活體外組合 [對] HCBsAg 之影響

	3.33	9.52	6.19	6.14	6.04	6.94	4.47												
	1.11	2.72	4.07	4.71	1.23	4.72	0.28												
	0.37	8.08	2.56	1.27	2.26	2.05	4.7												
	0.12	6.17	2.65	2.53	0.54	1.95	2.99												
	0.00	7	8.29	12.25	8.62	8.49	4.98												
藥物	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00													相加性抑制 化合物 25 (μ M)
IL-1 α 2a IU/mL																			
10.00	22.77	18.41	16.96	17.11	29.57	55.59													
3.33	18.32	13.71	12.18	12.33	25.52	53.03													
1.11	10.57	5.53	3.84	4.01	18.45	48.57													
0.37	2.74	2.75	4.57	4.39	11.31	44.07													
0.12	4.08	9.95	11.91	11.71	5.09	40.14													
0.00	0	5.64	7.52	7.33	8.81	42.49													
藥物	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10													協同作用曲線(99.9%) 邦邦以卡調 整 98%
IL-1 α 2a IU/mL																			
10.00	0	0	0	0	0	0													協同作用 218.76
3.33	0	0	0	3.32236	0	0													log 值 49.8
1.11	0	8.07563	12.2294	23.1621	4.71648	16.8785													
0.37	0	13.105	16.3704	22.0923	16.1835	0.9023													拮抗作用 0
0.12	0	13.0989	14.5038	24.4329	23.0126	6.66991													log 值 0
0.00	0	0	0	0	0	0													

表 18c：在 IL1 α 2a 與化合物 25 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

藥物	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00													平均抑制% 化合物 25 (μ M)
10.00	17.32	33.64	22.73	25.58	32.72	51.97													
3.33	6.47	24.71	20.71	19.06	27.19	49													
1.11	1.13	21.52	18.25	15.99	19.2	47.55													
0.37	12.17	10.2	8.56	12.48	14.45	40.46													
0.12	21.05	1.9	3.84	0.95	15.57	36.99													
0.00	0	11.25	13.81	16.8	7.31	22.04													

表 18d：在 PHH 細胞培養系統中 IFNα2a 及化合物 25 之活體外組合研究之結果的概述：

HBV 分析終 點	抑制劑 A	抑制 劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (IU/mL)#	抑制 劑 B EC ₅₀ (nM)#	協同作 用體積 (μM ² %)*	協同 作用 Log 體積	拮抗作 用體積 (μM ² %)*	拮抗 作用 Log 體積	結論
HBV DNA	IFNα2a	化 合 物 25	2.154	0.654	314.15	71.51	0	0	協同 作用
HBsAg	IFNα2a	化 合 物 25	13.8	4.503	218.76	49.8	0	0	協同 作用
HBeAg	IFNα2a	化 合 物 25	10.24	5.75	231.36	52.67	0	0	協同 作用

*在 99.9%置信區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例19

化合物25與化合物3之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HBV感染之人類原代肝細胞來確定化合物3（屬於胺磺醯基苯甲醯胺化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑）及化合物25（屬於二氫喹嗪酮化學類別之HBV DNA、HBsAg及HBeAg之小分子抑制劑）之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將化合物25（濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM且進行5點滴定）與化合物3（濃度範圍為於3倍稀釋系列中5000 nM至61.73 nM且進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物25或化合物3處理觀測到的HBV DNA、HBsAg及HBeAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表19a、19b及19c中。化合物25

及化合物3之 EC_{50} 值係在較早的實驗中測得且顯示於表19d中；由不同批次之PCDH細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性，沒有拮抗作用(表19d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表19a：在化合物25與化合物3之活體外組合中對HCBV DNA之影響

『藥物』 化合物 25 nM	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物3 (nM)
10.00	28	53.83	59.64	61.48	75.31	83.32	
3.33	15.24	52.77	48.78	55.49	77.84	86.19	
1.11	5.69	32.55	40.25	48.87	68.73	85.52	
0.37	51.8	21.47	28.54	33.37	64.04	83.77	
0.12	20.98	17.18	18.75	27.78	58.12	84.2	
0.00	0	28.13	25.93	3.32	25.94	74.78	
『藥物』 化合物 25 nM	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%) 化合物3 (nM)
10.00	13.66	6.65	4.22	12.05	4.52	3.89	
3.33	15.64	6.92	3.55	5.98	2.73	2.62	
1.11	2.13	7.36	12.67	3.75	8.6	1.07	
0.37	7.11	11.02	11.57	16.68	4.9	3.83	
0.12	6.37	6.92	8.03	5.44	6.89	1.72	
0.00	37.96	6.82	12.75	12.54	6.98	2.18	
『藥物』 化合物 25 nM	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物3 (nM)
10.00	28	77.75	9.33	25.61	46.68	81.84	
3.33	15.24	8.6	6.74	12.43	37.23	78.62	
1.11	5.69	20.84	18.76	2.56	30.15	76.22	
0.37	51.8	94.5	91.16	56.84	12.42	61.72	
0.12	20.98	55.01	52.35	25	10.4	69.49	

表 19b：在化合物 25 與化合物 3 之活體外組合中對 ICBSAg 之影響

	1.11	3.18	23.84	21.05	17.61	1.69	25.97		
	0.37	5.09	26.13	23.29	19.79	3.58	24.6		
	0.12	3.68	15.6	13	9.8	5.07	30.89		
	0.00	0	20.02	17.32	13.99	1.44	28.25		
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000		協同作用曲線(99.9%)	
化合物25								形態因子	
nM								調整	98%
10.00	0	3.37389	4.56648	15.5862	6.83859	0		協同作用	257.49
3.33	0	14.135	3.66216	11.9324	13.3447	797848		log 體積	58.62
1.11	0	42.7247	24.0086	28.0815	18.8898	16.0687			
0.37	0	15.2246	0	0	14.2288	11.7856		拮抗作用	0
0.12	0	2.26506	0	0	2.5805	0.19352		log 體積	0
0.00	0	0	0	0	0	0			

表 19c：在化合物 25 與化合物 3 之活體外組合中對 DCCAg 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00			平均抑制%
化合物25									化合物 3
nM									(nM)
10.00	33.17	29.55	32.13	35.12	45.53	56.72			
3.33	8.74	7.06	14.55	17.58	28.19	41.81			
1.11	4.51	14.84	10.85	17.54	27.32	48.49			
0.37	0.51	7.18	2.63	7.03	20.64	40.75			
0.12	5.33	4.76	1.23	8.26	17.34	42.34			
0.00	0	11.35	16	5.39	2.34	27.3			
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00			標準偏差(%)
化合物25									化合物 3
nM									(nM)
10.00	19.04	7.64	7.38	3.04	5.15	8.44			
3.33	17.53	4.42	4.02	3.71	1.17	3.68			
1.11	11.69	1.61	6.69	4.6	2.82	2.79			
0.37	17.52	6.16	9.21	11.25	2.17	4.33			
0.12	17.42	6.48	8.81	8.1	1.87	4.94			
0.00	27.36	3.5	5.88	8.38	7.46	13.79			
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00			相加性抑制
化合物25									化合物 3
nM									(nM)
10.00	33.17	25.58	22.48	29.57	34.73	51.41			
3.33	8.74	1.62	5.86	3.82	10.88	33.65			

研究目標

第 156 頁(發明說明書)

分子抑制劑)及替諾福韋(呈前藥替諾福韋艾拉酚胺或TAF形式，HCV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將TAF (濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM且進行5點滴定)與化合物3 (濃度範圍為於3倍稀釋系列中5560 nM至68.64 nM且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之TAF或化合物3處理觀測到的HCV DNA、HBSAg及HBCAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表20a、20b及20c中。TAF及化合物3之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表20d中；由不同批次之PEEC細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性或協同性，沒有拮抗作用(表20d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表20a：在TAF與化合物3之活體外組合中對HCV DNA之影響

藥物	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00	平均抑制% 化合物3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	78.31	76.66	75.83	84	83	81.22	
1.23	63.39	66.71	65.36	76.33	81.98	88.21	
0.41	28.78	50.25	43.6	56.51	77.12	86.4	
0.14	3.84	22.99	19.73	44.15	74.08	86.53	
0.05	8.77	15.84	18.49	40.03	71.93	83.56	
0.00	0	2.79	5.02	34.78	66.43	85.32	
藥物	0.00	68.64	205.93	617.78	1853.33	5560.00	標準偏差(%) 化合物3
TAF							

Table 20b: In the presence of compound 3, the effect of JCBsAg on the activity of TAF.

表 20c：在 TAF 與化合物 3 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

II							化合物 3 (nM)
IAF (nM)							
3.70	8.54	19.25	17.35	14.39	11.4	3.56	
1.23	13.91	1.05	5.26	6.23	11.06	5.69	
0.41	18.44	7.35	8.98	4.02	7.19	2.75	
0.14	11.41	19.4	4.08	12.99	5.4	4.89	
0.05	16.36	9.09	6.96	4.15	9.2	7.01	
0.00	28.29	2.3	6.31	5.64	11.69	6.37	
藥物 II	0.00	68.59	205.76	617.28	1857.85	5555.56	相似性抑制 化合物 3 (nM)
IAF (nM)							
3.70	11.87	7.42	6.29	14.31	38.01	47.46	
1.23	9.91	5.36	4.21	12.41	36.63	46.29	
0.41	1.76	3.2	4.46	4.48	30.9	41.43	
0.14	2.78	7.97	9.29	0.07	27.7	38.72	
0.05	1.17	3.82	5.09	3.91	30.48	41.08	
0.00	0	5.05	6.33	2.77	29.66	40.38	
藥物 II	0.00	68.59	205.76	617.28	1857.85	5555.56	酶作用曲線 (99.9%) 邦非以片 調整 98%
IAF (nM)							
3.70	0	0	0	0	0	2.42404	酶作用 5
1.23	0	2.57445	0	0	0	0	log 濃度 1.14
0.41	0	0	0	0	0	0	
0.14	0	0	0	0	0	0	酶作用 0
0.05	0	0	0	0	0	0	log 濃度 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

表 20d：在 PHH 細胞培養系統中 TAF 及化合物 3 之活體外組合研究之結果的概述：

HBV 分析終 點	抑制 劑 A	抑制 劑 B	抑制 劑 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 劑 B EC ₅₀ (nM)#	協同作 用體積 (μM ² %)*	協同 作用 Log 體積	拮抗作 用體積 (μM ² %)*	拮抗作 用 Log 體積	結論
HBV DNA	TAF	化 合 物 3	0.405	876.5	30.5	6.94	-1.73	-0.39	協同作 用
HBsAg	TAF	化 合 物 3	>100	7793	64.13	14.6	0	0	協同作 用
HBeAg	TAF	化 合 物 3	>100	8850	5.0	1.14	0	0	相加性

*在 99.9%置信區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例21

IFNα2a與化合物22之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HBV感染之人類原代肝細胞來確定化合物**22**（屬於胺磺醯基苯甲醯胺化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑）及聚乙二醇化干擾素α2a（IFNα2a，活化肝細胞中之先天免疫通路的抗病毒細胞因子）之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將IFNα2a（濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 IU/mL至0.123 IU/mL且進行5點滴定）與化合物**22**（濃度範圍為於3倍稀釋系列中5000 nM至61.721 nM且進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之IFNα2a或化合物**22**處理觀測到的HBV DNA、HBsAg及HBeAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表21a、21b及21c

中。IFN α 2a及化合物22之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表21d中；由不同批次之PEEC細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析及使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性或協同性，沒有拮抗作用(表21d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表 21a：在 IFN α 2a 與化合物 22 之活體外組合中對 HCBV DNA 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 22 (μ M)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	59	70.58	61.36	66.34	75.72	83.3	
3.33	52.39	69.79	71.36	68.3	72.01	84.76	
1.11	28.08	59.77	59.61	55.17	63.22	80.59	
0.37	6.59	44.09	42.48	42.82	61.33	75.33	
0.12	18.56	29.97	23.99	27.7	45.63	78.65	
0.00	0	9.02	33.53	13.72	22.31	69.19	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(% 化合物 22 (μ M))
IFN α 2a IU/mL							
10.00	7.24	3.95	0.56	10.17	3.06	4.6	
3.33	11.43	3.1	4.52	7.4	11.11	4.42	
1.11	16.44	2.71	2.78	22.26	6.66	1.34	
0.37	33.49	11.81	2.73	7.7	14.25	1.86	
0.12	23.97	16.1	11.97	10.1	9.2	2.49	
0.00	35.38	12.95	29.16	24.96	22.77	2.75	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 22 (μ M))
IFN α 2a IU/mL							
10.00	59	55.3	45.25	53.37	68.15	87.37	
3.33	52.39	48.1	36.43	45.86	63.01	85.33	
1.11	28.08	21.59	3.97	18.21	44.13	77.84	
0.37	6.59	1.84	24.73	6.23	27.43	71.22	
0.12	18.56	29.25	58.31	34.83	7.89	63.47	
0.00	0	9.02	33.53	13.72	22.31	69.19	

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	抑制作用曲線 (99.9%) 邦邦明 九調整 98%
IFNa2a IU/mL							
10.00	0	2.28055	20.267	0	0	0	抑制作用 用 311.72
3.33	0	11.4879	20.0547	0	0	0	log 濃度 70.96
1.11	0	29.2614	46.491	0	0	0	
0.37	0	7.06329	58.2256	23.7093	0	0	抑制作用 用 0
0.12	0	6.2349	12.9067	29.2909	7.4628	6.98541	log 濃度 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

表 21b：在 IFNa2a 與化合物 22 之活體外組合中對 HCBsAg 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制 % 化合物 22 (μM)
IFNa2a IU/mL							
10.00	20.1	23.86	18.44	23.51	32.47	46.3	
3.33	10.2	21.09	18.86	23.8	32.72	40.92	
1.11	8.8	17.52	19.02	18.44	29.23	41.77	
0.37	4.6	10.38	12.89	12.73	19.64	32.99	
0.12	1.67	10.33	10.48	16.18	20.01	33.22	
0.00	0	13.83	10.58	5.08	10.34	23.09	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差 (%) 化合物 22 (μM)
IFNa2a IU/mL							
10.00	13.1	8.15	6.53	2.24	6.55	3.24	
3.33	11.12	8.23	8.23	3.93	10.55	10.22	
1.11	14.56	12.01	8.75	8.2	12.13	11.6	
0.37	9.75	7.48	17.42	8.47	12.45	15.01	
0.12	20.23	10.68	5.97	9.82	12.81	14.29	
0.00	18.63	16.23	12.6	17.72	16.11	15.81	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相對抑制 化合物 22 (μM)
IFNa2a IU/mL							
10.00	20.1	9.05	11.65	16.04	28.36	38.55	
3.33	10.2	2.22	0.7	5.64	19.49	30.93	
1.11	8.8	3.81	0.85	4.17	18.23	29.86	
0.37	4.6	8.59	5.49	0.25	14.46	26.63	
0.12	1.67	15.73	12.43	6.83	8.84	21.81	
0.00	0	13.83	10.58	5.08	10.34	23.09	

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	額外作用曲線(99.9%) 邦非別克 調整
IFN α 2a IU/mL							
10.00	0	0	0	0.09816	0	0	額外作用 8.59
3.33	0	0	0	5.22631	0	0	log 濃度 1.96
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.12	0	0	3.26213	0	0	0	log 濃度 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

表 2.1c：在 IFN α 2a 與化合物 22 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 22 (μ M)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	30.13	29.1	26.43	26.51	34.37	48.55	
3.33	17.16	17.85	18	19.33	29.38	39.7	
1.11	15.27	14.17	15.76	10.98	26.67	41.95	
0.37	1.78	2.04	2.11	0.99	10.34	27.11	
0.12	7.42	11.7	10.2	8.06	14.8	34.39	
0.00	0	7.2	9.57	8.17	5.92	20.93	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%) 化合物 22 (μ M)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	0.33	8.25	5.02	1.12	4.12	3.3	
3.33	5.51	6.25	6.16	6.03	3.41	4.79	
1.11	2.91	12.64	3.52	11.08	6.97	8.93	
0.37	3.5	12.74	8.62	13.47	7.91	4.93	
0.12	6.9	9.72	7.43	4.72	11.46	7.25	
0.00	7.86	5.83	6.88	13.23	8.51	9.89	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 22 (μ M)
IFN α 2a IU/mL							
10.00	30.13	25.1	23.44	24.42	34.27	44.75	
3.33	17.16	11.2	9.23	10.39	22.06	34.5	
1.11	15.27	9.17	7.16	8.35	20.29	33	
0.37	1.78	5.29	7.62	6.24	7.59	22.34	
0.12	7.42	0.75	1.44	0.14	12.9	26.8	
0.00	0	7.2	9.57	8.17	5.92	20.93	

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用曲線(99.9%) 非比例； 調整 98%	
IFNa2a IU/mL								
10.00	0	0	0	0	0	0	協同作用	0
3.33	0	0	0	0	0	0	log 濃度	0
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.12	0	0	0	0	0	0	log 濃度	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

表 2.1d：在 H9000 細胞培養系統中 IFNa2a 及化合物 22 之活體外組合研究之結果的概述：

ICBV 分析終 點	抑制劑 A	抑制 劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (IU/mL)#	抑制劑 B EC ₅₀ (nM)#	協同作 用濃度 (μM ² %)*	協同 作用 Log 濃度	拮抗作 用濃度 (μM ² %)*	拮抗 作用 Log 濃度	結論
ICBV DNA	IFNa2a	化合 物 22	2.154	1020	311.72	70.9 6	0	0	協同 作用
ICBsAg	IFNa2a	化合 物 22	13.8	12,800	8.59	1.96	0	0	相加 性
ICBcAg	IFNa2a	化合 物 22	10.24	10,740	0	0	0	0	相加 性

*在 99.9%信託區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例2.2

化合物22與TAF之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用 ICBV 感染之人類原代肝細胞來確定化合物 22 (屬於胺磺醯基苯甲醯胺化學類別之 ICBV 衣殼化小分子抑制劑)及替諾福韋(呈前藥替諾福韋艾拉酚胺或 TAF 形式，ICBV 聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將TAR (濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM且進行5點滴定)與化合物22 (濃度範圍為於3倍稀釋系列中5000 nM至61.721 nM且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物22或TAR處理觀測到的HCV DNA、HBSAg及HBCAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表22a、22b及22c中。TAR及化合物22之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表22d中；由不同批次之PEEC細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性，沒有拮抗作用(表22d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表22a：在化合物22與TAR之活體外組合中對HCV DNA之影響

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	平均抑制% 化合物 22 (nM)
TAR (nM)							
10.00	50.21	60.62	59.41	66.66	65.77	71.26	
3.33	40.16	51.09	48.53	60.14	55.25	70.85	
1.11	4.95	25.5	30.09	25.21	42.82	62.1	
0.37	1.92	5.92	11.85	14.68	29.37	54.24	
0.12	2.6	5.22	5.12	11.67	36.5	52.5	
0.00	0	2.38	3.33	8.01	27.98	54.66	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	標準偏差(%) 化合物 22 (nM)
TAR (nM)							
10.00	1.32	8.36	3.9	10.1	3.39	11.57	
3.33	12.34	15.26	5.42	4.38	13.68	7.66	

	1.11	25.38	8.61	20.31	18.26	6.64	11.33		
	0.37	8.11	10.64	16.41	12.37	11.31	8.93		
	0.12	3.28	6.41	13.44	11.64	0.94	10.76		
	0.00	0.19	7.49	13.42	18.44	0.83	17.12		
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000		相對性抑制	
TAF (nM)								化合物 22 (nM)	
10.00	50.21	51.4	48.55	54.2	64.14	77.43			
3.33	40.16	41.58	38.17	44.95	56.9	72.87			
1.11	4.95	7.21	1.78	12.56	31.54	56.9			
0.37	1.92	0.51	5.31	6.24	26.6	53.79			
0.12	2.6	0.16	6.02	5.62	26.11	53.48			
0.00	0	2.38	3.33	8.01	27.98	54.66			
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000		協同作用曲線(99.9%)	
TAF (nM)								邦非別尼	
10.00	0	0	0	0	0	0		調整	98%
3.33	0	0	0	0.7754	2	0		協同作用	8.07
1.11	0	0	0	0	0	0		log 截距	1.84
0.37	0	0	0	0	0	0		拮抗作用	0
0.12	0	0	0	0	7.2964	6		log 截距	0
0.00	0	0	0	0	0	0			

表 22b：在化合物 22 與 TAF 之系統外組合中對 HCBsAg 之影響

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	平均抑制%
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10	7.97	3.97	21.33	7.89	24.84	38.54	
3.3333	9.06	6.48	16.7	16.53	24.27	44.07	
1.1111	20.81	13.85	21.8	20.98	27.18	46.11	
0.3703	10.78	3.62	10.04	10.32	23.21	45.05	
0.1234	29.82	19.99	14.56	21.8	21.67	48.57	
0	0	0.32	2.37	2.17	17.68	20.73	

【藥物】	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	標準偏流(%)
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10	5.77	2.84	10.6	6.45	2.33	6.64	
3.3333							
333	13.78	10.12	9.21	7.53	7.28	4.26	
1.1111							
111	5.53	6.36	15.1	9.66	4.2	2.72	
0.3703							
704	4.42	15.44	4.26	7.98	7.62	2.68	
0.1234							
568	3.67	4.25	4.49	3.91	8.82	1.51	
0	0.59	19.01	7.88	14.89	15.32	16.75	
【藥物】	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	輔助性抑制
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10	7.97	7.68	10.15	5.97	24.24	27.05	
3.3333							
333	9.06	8.77	11.22	7.09	25.14	27.91	
1.1111							
111	20.81	20.56	22.69	19.09	34.81	37.23	
0.3703							
704	10.78	10.49	12.89	8.84	26.55	29.28	
0.1234							
568	29.82	29.6	31.48	28.3	42.23	44.37	
0	0	0.32	2.37	2.17	17.68	20.73	
【藥物】	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	輔助性阻礙
TAF (nM)							(99.9%)
0							邦光阻劑 調整 98%
10	0	0	0	0	0	0	輔助作用 9.09
3.3333						2.1403	
333	0	0	0	0	0	4	log 數值 2.07
1.1111							
111	0	0	0	0	0	0	
0.3703						6.9501	
704	0	0	0	0	0	2	輔助作用 2.14
0.1234							
568	0	0	2.1434	0	0	0	log 數值 0.49
0	0	0	0	0	0	0	

藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	平均抑制%
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10.00	22.85	40.19	111.12	8.41	23.95	42.03	
3.33	19.69	114.8	8.11	3.2	24.12	36.2	
1.11	22.56	1.31	15.81	20.43	22.11	49.56	
0.37	9.9	114.54	2.63	10.1	21.6	42.03	
0.12	26.61	111.84	15.03	21.04	26.21	50.3	
0.00	0	6.11	12.41	5.06	10.1	29.14	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	標準偏差(%)
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10.00	19.83	13.1	2.25	11.61	11.95	8.64	
3.33	9.59	13.32	15.14	3.59	14.11	9.54	
1.11	8.99	14.21	16.19	10.18	1.53	2.18	
0.37	5.26	34.36	16.86	12.05	12.45	1.4	
0.12	4.11	14.39	8.61	5.08	4.18	4.19	
0.00	0.63	20.55	10.69	11.11	20.18	11.65	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	相加性抑制
TAF (nM)							化合物 22 (nM)
10.00	22.85	11.61	13.28	18.95	30.64	45.19	
3.33	19.69	14.3	9.12	15.63	21.8	43.51	
1.11	22.56	11.36	12.95	18.64	30.38	45.59	
0.37	9.9	3.85	1.28	5.34	19	36.1	
0.12	26.61	21.69	11.5	22.9	34.02	48.44	
0.00	0	6.11	12.41	5.06	10.1	29.14	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用曲線 (99.9%)
TAF (nM)							邦非以比; 調整 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	協同作用 0
3.33	0	0	0	0.6153	0	0	log 濃度 0
1.11	0	0	0	0	2.6348	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗性作用 3.25
0.12	0	0	0	0	0	0	log 濃度 0.14
0.00	0	0	0	0	0	0	

表 22d：在 PHH 細胞培養系統中化合物 22 及 TAF 之活體外組合研究之結果的概述：

HBV 分析終點	抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (nM)#	抑制劑 B EC ₅₀ (nM)#	協同作用體積 (μM ² %)*	協同作用 Log 體積	拮抗作用體積 (μM ² %)*	拮抗作用 Log 體積	結論
HBV DNA	TAF	化合物 22	0.405	1020	8.07	1.84	0	0	相加性
HBsAg	TAF	化合物 22	>100	12,800	9.09	2.07	-2.14	-0.49	相加性
HBeAg	TAF	化合物 22	>100	10,740	0	0	-3.25	-0.74	相加性

*在 99.9%置信區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例23

化合物22與化合物25之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HBV感染之人類原代肝細胞來確定化合物22（屬於胺磺醯基苯甲醯胺化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑）及化合物25（屬於二氫喹嗪酮化學類別之HBV DNA、HBsAg及HBeAg之小分子抑制劑）之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將化合物25（濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 nM至0.12 nM且進行5點滴定）與化合物22（濃度範圍為於3倍稀釋系列中5000 nM至61.73 nM且進行5點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物25或化合物22處理觀測到的HBV DNA、HBsAg及HBeAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表23a、23b及23c中。化合物25

及化合物22之 IC_{50} 值係在較早的實驗中測得且顯示於表23d中；由不同批次之PBCCL細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性或相加性，沒有拮抗作用(表23d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表23a：在化合物22與化合物25之活體外組合中對HCBV DNA之影響

藥物 化合物 25 (nM)	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制%
							化合物 22 (nM)
10.00	31.39	51.71	52.49	63.54	67.1	85.44	
3.33	16.41	50.43	52.25	53.21	62.83	82.08	
1.11	19.21	32.08	42.5	41.58	57.56	80.93	
0.37	46.48	30.71	23.72	21.3	52.22	73.23	
0.12	42.82	26.46	16.46	27.69	42.07	74.04	
0.00	0	11.75	9.12	12.7	17.94	63.06	
藥物 化合物 25 (nM)	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%)
							化合物 22 (nM)
10.00	7.33	4.11	2.57	4.94	5.09	1.95	
3.33	6.98	4.36	7.16	4.68	3.23	3.21	
1.11	35.51	7.87	0.68	13.48	7.26	1.34	
0.37	51.6	6.46	0.9	21	7.5	1.71	
0.12	21.05	7.83	6	5.3	0.16	2.16	
0.00	40.03	5.71	4.36	11.48	8.67	2.92	
藥物 化合物 25 (nM)	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	協同性抑制
							化合物 22 (nM)
10.00	31.39	30.03	31.68	29.44	48.62	76.87	
3.33	16.41	6.59	8.79	5.79	31.41	69.12	
1.11	19.21	33.22	30.08	34.35	2.18	55.96	

化合物 25 (nM)							化合物 22 (nM)
10.00	42.95	31.12	31.13	40.11	54.71	60.61	
3.33	20.81	13.56	12.12	17.18	37.13	45.33	
1.11	26.4	19.66	18.89	23.59	41.57	49.19	
0.37	12.93	4.95	4.04	9.6	30.88	39.89	
0.12	9.32	1.01	0.06	5.86	28.01	37.39	
0.00	0	9.16	10.21	3.82	20.61	30.96	
【藥物】 化合物25 (nM)	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用曲線 (99.9%) 邦非別 校正 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	協同作 用 9.68
3.33	0	8.61404	0	0	0	0	log 體積 2.2
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	1.03304	0	0	0	0	拮抗作 用 0
0.12	0	0	0	0	0	0	log 體積 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

表 23c：在化合物 22 與化合物 25 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

【藥物】	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 22 (nM)
10.00	28.42	45.7	39.35	42.14	42.65	52.15	
3.33	13.94	29.09	24.19	23.42	24.67	39.67	
1.11	14.98	23.14	18.39	20.55	25.39	36.15	
0.37	2.9	7.24	7.64	4.51	17.83	27.05	
0.12	4.8	7.81	10.06	9.31	20.68	33.46	
0.00	0	16.81	14.59	7.23	8.5	21.68	
【藥物】 化合物25 (nM)	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%) 化合物 22 (nM)
10.00	3.97	4.42	6.62	8.31	4.59	2.23	
3.33	9.3	1.4	6.29	15.17	11.71	2.03	
1.11	6.16	7.56	9.8	11.54	8.18	9.71	
0.37	10.44	7.8	10.09	14.23	7.82	10.34	

	0.12	14.29	8.35	1.66	17.07	9.08	4.79												
	0.00	10.71	11.88	5.84	11.39	4.94	6.86												
「藥物」	0.00																		
化合物 25																			
(nM)																			
10.00	28.42	16.39	17.98	23.24	34.5	43.94													
3.33	13.94	0.53	1.38	7.72	21.26	32.6													
1.11	14.98	0.69	2.58	8.83	22.21	33.41													
0.37	2.9	13.42	11.27	4.12	11.15	23.95													
0.12	4.8	11.2	9.09	2.08	12.89	25.44													
0.00	0	16.81	14.59	7.23	8.5	21.68													
「藥物」	0																		
化合物 25																			
(nM)																			
10.00	0	147638	0	0	0	147107													
3.33	0	250126	210961	0	0	0.38927													
1.11	0	0	0	0	0	0													
0.37	0	0	0	0	0	0													
0.12	0	0	13.6869	0	0	0													
0.00	0	0	0	0	0	0													

表 23d：在 IP3000 細胞培養系統中化合物 22 及化合物 25 之活體外組合研究之結果的概述：

IC50 分析終點	抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A IC50 (nM)#	抑制劑 B IC50 (nM)#	協同作用 體積 (μM ² %)*	協同作用 Log 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %)*	拮抗作用 Log 體積	結論
IC50 DNA	化合物 25	化合物 22	0.6535	1020	846.13	19.62	0	0	協同作用
IC50 sAg	化合物 25	化合物 22	4.503	12,800	9.68	2.2	0	0	相加性
IC50 cAg	化合物 25	化合物 22	5.75	10,740	57.43	13.07	0	0	協同作用

*在 99.9%置信區間
#在較早的單獨實驗中測得

實例24

IFN α 2a與化合物3之活體外組合

研究目標

在活體外在細胞培養模型系統中使用HBV感染之人類原代肝細胞來確定化合物3及聚乙二醇化干擾素 α 2a (IFN α 2a，活化肝細胞中之先天免疫通路的抗病毒細胞因子)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

結果及結論

將IFN α 2a (濃度範圍為於3倍稀釋系列中10.0 IU/mL至0.123 IU/mL且進行5點滴定)與化合物3 (濃度範圍為於3倍稀釋系列中5000 nM至61.73 nM且進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之IFN α 2a或化合物3處理觀測到的HBV DNA、HBsAg及HBeAg之平均抑制%及3次重複之標準偏差顯示於如下所示之表24a、24b及24c中。IFN α 2a及化合物3之EC₅₀值係在較早的實驗中測得且顯示於表24d中；由不同批次之PHH細胞觀測到一些偏差。

當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由添加性相互作用預測之值相比較時，按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為協同性，沒有拮抗作用(表24d)。藉由顯微術或CCK8分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表24a：在HFNα2a與化合物3之活體外組合中對HCBV DNA之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物3 (μM)
HFNα2a IU/mL							
10.00	61.87	71.15	80.53	79.65	80.46	83.13	
3.33	59.88	65.87	74.49	76.8	84.91	87.1	
1.11	43.03	53.87	58.69	73.59	83.9	86.29	
0.37	38.46	40.68	50.62	61.26	79.98	87.96	
0.12	8.4	28.63	36.65	50.15	78.43	86.51	
0.00	0	11.71	4.14	26.47	69.39	84.26	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%) 化合物3 (μM)
HFNα2a IU/mL							
10.00	5.9	5.47	5.52	2.67	4.37	2.84	
3.33	5.53	2.04	2.64	4.62	3.33	1.29	
1.11	6.9	8.86	6.4	0.85	1.88	1.74	
0.37	4.9	5.86	4.86	5.2	2.07	0.96	
0.12	10.36	7.77	6.24	3.95	6.78	1.78	
0.00	15.33	3.13	10.75	14.76	3.99	2.26	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物3 (μM)
HFNα2a IU/mL							
10.00	61.87	57.4	63.45	71.96	88.33	94	
3.33	59.88	55.18	61.54	70.5	87.72	93.69	
1.11	43.03	36.36	45.39	58.11	82.56	91.03	
0.37	38.46	31.25	41.01	54.75	81.16	90.31	
0.12	8.4	2.33	12.19	32.65	71.96	85.58	
0.00	0	11.71	4.14	26.47	69.39	84.26	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用曲線 (99.9%) 邦非切比 調整 98%
HFNα2a IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	1.5236	協同作用 34.73
3.33	0	3.97636	4.26176	0	0	2.3446	log 數據 7.91
1.11	0	0	0	12.6827	0	0	

0.3/	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	3.8/
0.12	0	5.38893	3.92416	4.50055	0	0	log 數值	-0.88
0.00	0	0	0	0	0	0		

表 24b：在 IFNa 與化合物 3 之活體外組合中對 HCBsAg 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制%
IFNa							化合物 3
IU/ml.							(μM)
10.00	24.94	33.38	33.93	39.7	49.84	61.18	
3.33	12.8	24.89	29.71	34.46	45.53	64.96	
1.11	14.91	22.82	26.09	36.42	44.97	67.18	
0.37	6.9	9.75	17.87	27.62	42.09	61.42	
0.12	1.56	10.13	19.07	22.18	42.08	62.05	
0.00	0	5.49	1.46	4.63	22.4	51.86	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	抑制偏差(%)
IFNa							化合物 3
IU/ml.							(μM)
10.00	24.86	7.76	9.93	15.02	12.81	9.59	
3.33	18.96	8.14	7.22	2.01	3.5	5.21	
1.11	20.01	4.74	6.41	3.05	5.38	4.26	
0.37	15.28	4.3	7.35	8.74	6.16	2.9	
0.12	16.47	3.75	5.07	7.78	7.65	6.59	
0.00	20.27	8.81	11.41	18.39	12.21	10.78	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制
IFNa							化合物 3
IU/ml.							(μM)
10.00	24.94	20.82	23.84	28.42	41.75	63.87	
3.33	12.8	8.01	11.53	16.84	32.33	58.02	
1.11	14.91	10.24	13.67	18.85	33.97	59.04	
0.37	6.9	1.79	5.54	11.21	27.75	55.18	
0.12	1.56	3.84	0.12	6.12	23.61	52.61	
0.00	0	5.49	1.46	4.63	22.4	51.86	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用曲線
IFNa							(99.9%)
IU/ml.							非線性
10.00	0	0	0	0	0	0	調整
3.33	0	0	0	11.0051	1.6815	0	98%
							協同作用
							24.11
							log 數值
							5.49

1.11	0	0	0	7.53245	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
		1.6287						
0.12	0	5	2.26463	0	0	0	log 拮抗	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

表 24c：在 UFNc2a 與化合物 3 之活體外組合中對 HCBcAg 之影響

藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 3 (μ M)
10.00	32.8	31.53	34.56	37.16	47.83	64.68	
3.33	14.38	25.43	28.01	30.3	39.42	61.88	
1.11	19.32	21.29	25.66	31.93	40.01	62.09	
0.37	2.24	6.43	9.53	18.94	28.32	53.12	
0.12	9.5	6.23	12.46	18.03	30.27	54.05	
0.00	0	11.14	4.9	1.02	12.42	42.06	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	標準偏差(%) 化合物 3 (μ M)
UcNa2a IU/mL							
10.00	6.87	6.73	5.55	4.84	7.1	3.14	
3.33	4.07	5.37	7.42	9.41	7.15	1.79	
1.11	7.88	5.45	5.22	7.63	7.94	3.23	
0.37	1.9	2.87	4.47	11.64	7.71	1.12	
0.12	15.48	5.14	3.22	4.52	1.47	2.18	
0.00	8.69	17.68	3.21	3.3	4.7	7	
藥物	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 3 (μ M)
UcNa2a IU/mL							
10.00	32.8	25.31	29.51	32.11	41.15	61.06	
3.33	14.38	4.84	10.18	13.51	25.01	50.39	
1.11	19.32	10.33	15.37	18.5	29.34	53.25	
0.37	2.24	13.63	7.25	3.28	10.46	40.76	
0.12	9.5	21.7	14.87	10.62	4.1	36.56	
0.00	0	11.14	4.9	1.02	12.42	42.06	
藥物	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	協同作用的總 (99.9%)
UcNa2a							邦非以克 調整 98%

100/mL								
10.00	0	0	0	0	0	0	協同作用	103.04
3.33	0	2.91733	0	0	0	5.59911	log 數積	23.46
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	10.6148	2.06923	0	0	8.67408	拮抗作用	0
0.12	0	11.0143	16.733	13.7747	21.3322	10.3156	log 數積	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

表 24d：在 IP0001 細胞培養系統中 EFNa2a 及化合物 3 之活體外組合研究之結果的概述：

ICBV 分析終點	抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A IC ₅₀ (IU/mL) #	抑制劑 B IC ₅₀ (mM) #	協同作用體積 (μM ² %)*	協同作用 Log 體積	拮抗作用體積 (μM ² %) *	拮抗作用 Log 體積	結論
ICBV DNA	EFNa2a	化合物 3	2.154	876.5	34.73	7.91	3.87	-0.88	協同作用
ICBsAg	EFNa2a	化合物 3	13.8	7793	24.11	5.49	0	0	協同作用
ICBcAg	EFNa2a	化合物 3	10.24	8580	103.04	23.46	0	0	協同作用
*在 99.9%置信區間									
#在校中的單獨實驗中測得									

實例2.5

TAR與SIORNA-NIP之活體外組合

研究目標

在活體外使用ICBV細胞培養模型系統來確定替諾福韋(呈前藥替諾福韋艾拉酚胺或TAR形式，ICBV聚合酶之核苷酸類似物抑制劑)及SIORNA-NIP (旨在促進所有病毒 mRNA轉錄物及病毒抗原之有效最低的 siRNA)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

用epID19實驗方案中之活體外組合

使用 Prichard 及 Shipman (1990) (Prichard MN, Shipman C, Jr.

1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res 14:181-205 以及 Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan)之方法來進行活體外組合研究。如 Guo等人 (2007) (Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. J Virol 81:12472-12484)中所描述研發HepDE19細胞株。其為經HBV基因組穩定轉染之人類肝癌細胞株，且其可表現HBV前基因組RNA且以四環素調控之方式支持HBV rcDNA (松環DNA)合成。將HepDE19細胞在不含四環素之補充有10%胎牛血清+ 1%青黴素-鏈黴素的DMEM/F12培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換新鮮培養基且用在相應EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育7天之持續時間。將抑制劑在100% DMSO (TAF)或生長培養基(SIRNA-NP)中稀釋，且分析中之最終DMSO濃度≤0.5%。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各濃度之抑制劑A與各濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制rcDNA產生的影響。在48小時孵育之後，使用bDNA分析(Affymetrix)用HBV特異性定製探針組及製造商之說明書量測存在於抑制劑處理之孔中的rcDNA含量。以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算由各孔產生之RLU資料且使用MacSynergy II程式分析以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積<25 μM²% (log體

積<2)：可能不顯著；25-50 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積>2.11<5)：微小但顯著，50-100 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積>5.11<9)：中度，在活體內可為重要的；超過100 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積>9)：強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近1000 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積>90)：異常地高，查驗資料。同時，使用用於使用細胞-效價Glo試劑(Promega)按照製造商之說明書測定作為細胞活力之度量的ATP含量的重複板來評估抑制劑組合對細胞活力之影響。

結果及結論

將TAIR (濃度範圍為於2倍稀釋系列中200.0 nM至0.781 nM)進行9點滴定)與siRNA-NIP (濃度範圍為於3倍稀釋系列中60 ng/mL至0.741 ng/mL)進行5點滴定)組合進行測試。使用單獨或組合形式之TAIR或siRNA-NIP處理觀測到之rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表25A中。TAIR及siRNA-NIP之EC₅₀值顯示於表25B中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較(表25A)時，按照MacSynergy III分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則發現組合為相加性，沒有拮抗作用(表25B)。藉由顯微術或細胞-效價Glo分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表25A：替諾福韋艾拉酚胺與siRNA-NIP之活體外組合

藥物I	0	0.781	1.563	3.125	6.250	12.500	25.000	50.000	100.000	200.000	平均抑制% TAIR (nM)
siRNA-NIP (ng/mL)											
60	98.19	98.66	98.73	98.87	99.33	99.71	99.7	99.5	99.58	99.59	
20.000	96.72	95.72	96.67	97.25	98.09	98.71	98.71	98.86	99.28	99.79	
6.667	88.02	88.65	91.27	91.67	94.7	95.11	95.07	95.97	98.26	98.98	
2.222	80.18	72.86	78.16	87.28	82.7	87.98	87.09	91.03	95.87	98.08	
0.741	53.05	55.76	55.73	62.01	63.65	78.75	72.62	82.77	90.77	96.27	

0	0	0.176	3.19	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	11.59	89.93	
I藥物 SIRNA-NP (ng/mL)	0	0.1813	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	抑制率(%) IC ₅₀ (mM)
60	0.61	0.16	0.63	0.55	0.11	0.23	0.1	0.06	0.04	0.1	
20.000	1.01	2.02	1.82	1.12	0.82	0.32	0.56	0.14	0.1	0.06	
6.667	2.35	3.56	4.19	5.91	1.68	0.94	1.15	0.51	0.51	0.12	
2.222	3.51	1.95	10.29	9.62	3.94	3.21	3.61	1.19	0.51	0.18	
0.141	12.82	16.91	11.3	11.62	9.12	10.02	1.11	3.1	0.5	0.83	
0	0	15.51	15.63	12.12	19.01	9.89	8.58	4.92	2.19	2.12	
I藥物 SIRNA-NP (ng/mL)	0	0.1813	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	拮抗性抑制 IC ₅₀ (mM)
60	98.19	98.1	98.25	98.2	98.38	98.11	98.55	99.15	99.59	99.82	
20.000	96.12	96.25	96.51	96.11	96.8	91.11	91.14	98.32	99.2	99.64	
6.667	88.02	81.15	88.11	88.09	89.29	91.15	90.12	91.39	91.32	98.19	
2.222	80.18	19.21	80.81	80.3	82.28	85.85	81.15	90.12	95.56	98	
0.141	53.05	50.82	51.69	53.33	58.02	66.18	62.16	18.03	89.18	95.21	
0	0	0.176	3.19	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	11.59	89.93	
I藥物 SIRNA-NP (ng/mL)	0	0.18	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50	100	200	協同作用曲線(99.9%) 拮抗性曲線 96%
60.0	0	0	0	0	0.390	0	0.520	0.152	0	0	協同作用 6.26
20.000	0	0	0	0	0	0.216	0	0.019	0	0	log 拮抗 0.9
6.667	0	0	0	0	0	0.566	0	0	0	0	
2.222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.141	0	0	0	0	0	0	1.334	0	0	0	log 拮抗 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

表 25.B：使用 bDNA 分析之，pcDNA 定量情況下之，DE19 細胞培養系統中之活
藥外組合研究之結果的概述：

抑制劑 A	抑制劑 B	抑制劑 A IC ₅₀ (ng/mL)	抑制劑 B IC ₅₀ (mM)	協同作用 用體積 (μM ² %)*	協同作用 用Log 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %)*	拮抗作用 用Log 體積	結論
SIRNA-NP	ICAF	0.624	44.52	6.26	0.9	0	0	拮抗性

*在 99.9%置信區間

實例2.6

化合物3與GLS4之活體外組合

研究目標

在活體外使用HBV細胞培養模型系統來確定化合物**3** (屬於胺磺醯基苯甲醯胺化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑)及GLS4 (屬於雜芳基二氫嘧啶或HAP化學類別之HBV衣殼化小分子抑制劑)之兩種藥物組合為相加性、協同性抑或拮抗性。

HepDE19實驗方案中之活體外組合

使用Prichard及Shipman (1990)之方法進行活體外組合研究。如Guo等人(2007)中所描述研發HepDE19細胞株。其為經HBV基因組穩定轉染之人類肝癌細胞株，且其可表現HBV前基因組RNA且以四環素調控之方式支持HBV rcDNA (松環DNA)合成。將HepDE19細胞在不含四環素之補充有10%胎牛血清+ 1%青黴素-鏈黴素的DMEM/F12培養基中塗鋪於96孔組織培養處理微量滴定板中且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育隔夜。次日，為細胞更換新鮮培養基且用在相應EC₅₀值附近之濃度範圍的抑制劑A及抑制劑B處理，且在濕潤孵育器中在37℃及5%CO₂下孵育7天之持續時間。將兩種抑制劑在100% DMSO中稀釋且分析中之最終DMSO濃度≤0.5%。單獨地以及以組合形式測試兩種抑制劑，該等組合係以棋盤方式進行使得各濃度之抑制劑A與各濃度之抑制劑B組合以確定其組合對抑制rcDNA產生的影響。在48小時孵育之後，使用bDNA分析(Affymetrix)用HBV特異性定製探針組及製造商之說明書量測存在於抑制劑處理之孔中的rcDNA含量。以佔未處理之對照孔的抑制%的形式計算由各孔產生之RLU資料且使用MacSynergy II程式分析以使用由Prichard及Shipman建立之解釋準則如

下確定組合為協同性、相加性抑或拮抗性：在95% CI下協同作用體積 <25 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 <2) =可能不顯著；25-50 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >2且 <5) =微小但顯著，50-100 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >5且 <9) =中度，在活體內可為重要的；超過100 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >9) =強協同作用，在活體內可能為重要的；體積接近1000 $\mu\text{M}^2\%$ ($\log$ 體積 >90) =異常地高，查驗資料。同時，使用用於使用細胞-效價Glo試劑(Promega)按照製造商之說明書測定作為細胞活力之度量的ATP含量的重複板來評估抑制劑組合對細胞活力之影響。

結果及結論

將化合物**3**（濃度範圍為於3倍稀釋系列中3.0 μM 至0.04 μM 且進行5點滴定）與GLS4（濃度範圍為於2倍稀釋系列中2.0 μM 至0.008 μM 且進行9點滴定）組合進行測試。使用單獨或組合形式之化合物**3**或GLS4處理觀測到的rcDNA之平均抑制%及4次重複之標準偏差顯示於表26a中。化合物**3**及GLS4之EC₅₀值顯示於表26b中。當在以上濃度範圍內將兩種抑制劑組合之觀測值與由相加性相互作用預測之值相比較（表26a）時，發現組合為在很大程度上相加性，且非常輕微地拮抗性（表26b）；按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard及Shipman (1992)所描述之解釋準則，拮抗作用之程度為微小但顯著的。藉由顯微術或細胞-效價Glo分析在所分析之樣品中未觀測到細胞活力或增殖之顯著抑制。

表 26a：化合物 3 與 GLS4 之活體外組合

[藥物] 化合物 3 μM	0	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	平均抑制 % GLS-4 (μM)
3.000	94.19	94.6	93.75	93.69	93.74	93.76	91.72	96.86	97	98.08	
1.000	86.57	85.25	87.63	86.08	84.96	87.22	92.9	96.99	97.78	97.01	
0.330	56.68	56.86	55.08	58.52	73.77	81.88	93.03	97.63	97.52	95.96	
0.110	19.99	13.03	18.73	23.81	53.91	77.73	95.32	97.65	97.52	98.12	
0.040	11.14	7.18	11.03	14.94	28.97	73.74	93.01	97.99	97.76	97.77	
0.000	0	1.77	5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	97.78	98.51	98.22	
[藥物] 化合物 3 μM	0	0.007813	0.01563	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	標準偏差 (%) GLS-4 (μM)
3	1.29	1.34	1.38	0.33	0.71	0.37	1.37	0.57	0.95	1.25	
1.000	3.95	5.77	1.98	1.54	3.07	2.38	0.89	0.56	0.8	1.73	
0.330	6.93	11.7	7.92	5.09	4.36	5.69	1.6	0.73	1.02	2.33	
0.110	15.95	12.76	10.23	4.24	14.05	5.6	1.61	0.83	0.72	0.31	
0.040	22.92	26.91	6.36	31.59	16.09	5.54	1.82	0.68	0.72	0.31	
0	0	17.77	15.72	15.34	10.95	6.65	1.39	1.77	0.59	0.35	
[藥物] 化合物 3 μM	0	0.007813	0.01563	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	相對性抑制 GLS-4 (μM)
3	94.19	94.73	94.77	94.88	96.64	98.78	99.71	99.86	99.92	99.9	
1.000	86.57	86.72	86.11	87.79	91.98	97.09	99.3	99.67	99.8	99.77	
0.330	56.68	56.77	54.76	59.73	73.55	90.39	97.68	98.97	99.35	99.23	
0.110	19.99	19.05	15.33	25.61	51.75	82.25	95.72	97.98	98.81	98.58	
0.040	11.14	10.7	5.97	17.39	45.75	80.29	95.25	97.76	98.68	98.72	
0	0	1.77	5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	97.78	98.51	98.22	
[藥物] 化合物 3 μM	0	0.007813	0.01563	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	協同作用曲線(%) 協同作用 濃度
3	0	0	0	-0.573	-1.508	-4.594	-5.304	-1.882	-1.068	0	協同作用 0
1.000	0	0	0	0	-1.002	-5.205	-4.655	-1.582	-0.752	0	log 濃度 0
0.330	0	0	0	0	0	0	-1.574	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	協同作用 -29.95
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-0.372	log 濃度 -4.13
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

藥物 化合物3 μM	0	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	協同作用曲線(99.9%) 斜率以1/ 調整 96%
3.0	0	0	0	-0.103	-0.563	-1.102	-3.481	-1.124	0	0	協同作用 0
1.000	0	0	0	0	0	-2.037	-3.771	-0.837	0	0	log 斜率 0
0.330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 -15.72
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 斜率 -2.17
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

表 26b：使用 bDNA 分析之 recDNA 定量情況下之 DE19 細胞培養系統中之活
體外組合研究之結果的概述：

抑制 劑 A	抑制 劑 B	抑制劑 A EC ₅₀ (μM)	抑制劑 B EC ₅₀ (μM)	協同作 用體積 (μM ² %)*	協同作 用 Log 體積	拮抗作用 體積 (μM ² %)*	拮抗作 用 Log 體積	結論
AB 423	GLS4	0.272	0.077	0	0	-15.72	-2.17	相加性*
AB 423	GLS4	0.272	0.077	0	0	-29.95	-4.13	微小的拮 抗作用#

*在 99.9%置信區間

#在 95%置信區間

所有公開案、專利及專利文件以引用之方式併入本文中，好象
單個地以引用之方式併入一般。已關於各種特定及較佳實施例及技術
描述本發明。然而，應瞭解可在保持在本發明之精神及範疇內的同時
作出許多變化及修改。

【序列表】

<110> 加拿大商艾爾布圖斯生技公司(ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION)

<120> 用於治療B型肝炎之治療組合物及方法

<150> US 62/420,969

<151> 2016-11-11

<150> US 62/409,180

<151> 2016-10-17

<150> US 62/345,476

<151> 2016-06-03

<150> US 62/343,514

<151> 2016-05-31

<150> US 62/276,722

<151> 2016-01-08

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (1)..(1)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (2)..(2)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (7)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (14)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 1
agguaugug cccguuuguu u 21

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (7)..(7)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 2
acaaacgggc aacauaccuu u 21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (3)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 3
gcucaguuuu cuagugccau u 21

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基
<222> (10)..(10)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 4
uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 5
ccgugugcac uucgcucau u 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 6
ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (3)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基

<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 7
gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (10)..(10)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 8
uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 9
ccgugugcac uucgcuucau u 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 10

ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (1)..(1)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (2)..(4)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (17)..(17)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (21)..(21)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 11

cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 12
cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 13
ccgugugcac uucgcucau u

<210> 14
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

21

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 14
ugaagcgaag ugcacacggu u

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

21

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (3)..(3)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (20)..(21)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 15

gcucaguuaa cuagugccau u

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (20)..(21)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 16

uggcacuagu aaacugagcu u

21

<210> 17
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (2)..(2)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (14)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(16)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 17
agguauguug cccguuuguu u

21

<210> 18
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (7)..(7)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (19)..(19)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 18
acaaacgggc aacauaccuu u 21

<210> 19
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基

<222> (4)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 19
gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 20
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (20)..(21)	
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)	
<400> 20	
uuccgcagua uggaucggcu u	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (1)..(1)	
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (4)..(4)	
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (6)..(6)	
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (13)..(14)	
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (16)..(17)	
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸	
<220>	
<221> 經修飾鹼基	
<222> (21)..(21)	
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)	
<400> 21	

gccgauccau acugcggaau u

21

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 22
uuccgcagua uggaucggcu u

21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (21)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 23
gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 24
uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 25
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (4)..(4)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 25
gccgauccau acugcggaau u 21

<210> 26
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 26
uuccgcagua uggaucggcu u 21

<210> 27
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (3)..(3)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (14)..(14)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (21)..(21)

<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 27

gcucaguuua cuagugccau u 21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (15)..(15)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 28

uggcacuagu aaacugagcu u 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (1)..(1)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (2)..(3)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 29
cuggcucagu uuacuagugu u 21

<210> 30
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (20)..(21)
<223> 解鎖核鹼基類似物 (UNA)

<400> 30
cacuaguaaa cugagccagu u 21

<210> 31
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (3)..(3)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (5)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (14)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (16)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 31
ccgugugcac uucgcucau u 21

<210> 32
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (2)..(4)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (6)..(6)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (10)..(10)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (12)..(12)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (14)..(15)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (17)..(19)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 32

cuggcucagu uuacuagugu u

21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (2)..(2)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>

<221> 經修飾鹼基

<222> (4)..(4)

<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(6)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (8)..(8)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (10)..(10)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (12)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (14)..(14)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 33
accucugccu aaucaucucu u 21

<210> 34
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (5)..(5)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (7)..(7)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基

<222> (11)..(12)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (17)..(18)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 34
ugaagcgaag ugcacacggu u 21

<210> 35
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (6)..(7)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (11)..(11)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 35
cacuaguaaa cugagccagu u

21

<210> 36
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (7)..(7)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (9)..(9)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (13)..(13)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<220>
<221> 經修飾鹼基
<222> (17)..(17)
<223> 2'OMe 修飾之核苷酸

<400> 36
gagaugauua ggcagagguu u

21

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 37
gacaaacggg caacatacct t

21

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 38
gtgtctgcgg cgttttatca

20

<210> 39
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成探針

<400> 39
cctctkcatc ctgctgctat gcctcatc

28

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種治療動物之B型肝炎的方法，其包括向該動物投與至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中向該動物投與至少一種逆轉錄酶抑制劑。

【請求項3】

如請求項2之方法，其中該逆轉錄酶抑制劑選自由以下組成之群：拉米夫定(lamivudine)、阿德福韋(adefovir)、恩替卡韋(entecavir)、替比夫定(telbivudine)及替諾福韋(tenofovir)。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之方法，其中向該動物投與至少一種衣殼抑制劑。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中該衣殼抑制劑選自由以下組成之群：Bay-41-4109、AT-61、DVR-01及DVR-23f。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之方法，其中向該動物投與至少一種cccDNA形成抑制劑。

【請求項7】

如請求項6之方法，其中該cccDNA形成抑制劑選自CCC-0975及CCC-0346。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中向該動物投與至少一種sAg分泌抑制劑。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該sAg分泌抑制劑選自由PBHBV-001及PBHBV-2-15組成之群。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之方法，其中向該動物投與至少一種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中向該動物投與至少兩種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項12】

如請求項10之方法，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選自由siRNA 1m至15m之二者siRNA組合組成之群。

【請求項13】

如請求項10之方法，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選

自由siRNA 1m至15m之三者siRNA組合組成之群。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之方法，其中向該動物投與至少一種免疫刺激劑。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中該免疫刺激劑選自由IFN基因刺激物(STING)及白介素之促效劑組成之群。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之方法，其中至少一種藥劑為經口投與。

【請求項17】

如請求項1至15中任一項之方法，其中至少兩種藥劑為經口投與。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之方法，其中寡聚核苷酸係靜脈內投與。

【請求項19】

如請求項1之方法，其中向該動物投與以下兩種藥劑之組合中之一者：

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及衣殼抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；
 衣殼抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
 衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
 衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
 衣殼抑制劑及免疫刺激劑；
 衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
 cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
 cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；
 cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；
 cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；
 cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
 sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
 sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
 sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
 sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
 sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
 免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
 免疫刺激劑及衣殼抑制劑；
 免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；
 免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；
 免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；
 逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
 逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；或

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑。

【請求項20】

如請求項1之方法，其中向該動物投與以下三種藥劑之組合中之一者：

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆

轉錄酶抑制劑；

- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；
- sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；
- sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；
- sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

- 免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；
- 免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；
- 逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；或
- 逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑。

【請求項21】

一種套組，其包含至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑

其以組合形式用於治療或預防病毒感染，諸如B型肝炎。

【請求項22】

如請求項21之套組，其包含至少一種逆轉錄酶抑制劑。

【請求項23】

如請求項22之套組，其中該逆轉錄酶抑制劑選自由以下組成之群：拉米夫定、阿德福韋、恩替卡韋、替比夫定及替諾福韋。

【請求項24】

如請求項21至23中任一項之套組，其包含至少一種衣殼抑制劑。

【請求項25】

如請求項24之套組，其中該衣殼抑制劑選自由以下組成之群：Bay-41-4109、AT-61、DVR-01及DVR-23f。

【請求項26】

如請求項21至25中任一項之套組，其包含至少一種cccDNA形成抑制劑。

【請求項27】

如請求項26之套組，其中該cccDNA形成抑制劑選自CCC-0975及

CCC-0346。

【請求項28】

如請求項21至27中任一項之套組，其包含至少一種sAg分泌抑制劑。

【請求項29】

如請求項28之套組，其中該sAg分泌抑制劑選自由PBHBV-001及PBHBV-2-15組成之群。

【請求項30】

如請求項21至29中任一項之套組，其包含至少一種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項31】

如請求項30之套組，其包含至少兩種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項32】

如請求項30之套組，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選自由siRNA 1m至15m之二者siRNA組合組成之群。

【請求項33】

如請求項30之套組，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選自由siRNA 1m至15m之三者siRNA組合組成之群。

【請求項34】

如請求項21至33中任一項之套組，其包含至少一種免疫刺激劑。

【請求項35】

如請求項34之套組，其中該免疫刺激劑選自由IFN基因刺激物(STING)及白介素之促效劑組成之群。

【請求項36】

如請求項21之套組，其包含以下兩種藥劑之組合中之一者：

- 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及衣殼抑制劑；
- 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；
- 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；
- 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；
- 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；
- 衣殼抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
- 衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- 衣殼抑制劑及免疫刺激劑；
- 衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；
- cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；
- sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；或

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑。

【請求項37】

如請求項21之套組，其包含以下三種藥劑之組合中之一者：

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺

激劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；或

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑。

【請求項38】

一種醫藥組合物，其包含醫藥學上可接受之載劑及至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑。

【請求項39】

如請求項38之醫藥組合物，其包含至少一種逆轉錄酶抑制劑。

【請求項40】

如請求項39之醫藥組合物，其中該逆轉錄酶抑制劑選自由以下組成之群：拉米夫定、阿德福韋、恩替卡韋、替比夫定及替諾福韋。

【請求項41】

如請求項38至40中任一項之醫藥組合物，其包含至少一種衣殼抑制劑。

【請求項42】

如請求項41之醫藥組合物，其中該衣殼抑制劑選自由以下組成之群：Bay-41-4109、AT-61、DVR-01及DVR-23f。

【請求項43】

如請求項38至42中任一項之醫藥組合物，其包含至少一種cccDNA形成抑制劑。

【請求項44】

如請求項43之醫藥組合物，其中該cccDNA形成抑制劑選自CCC-0975及CCC-0346。

【請求項45】

如請求項38至44中任一項之醫藥組合物，其包含至少一種sAg分泌抑制劑。

【請求項46】

如請求項45之醫藥組合物，其中該sAg分泌抑制劑選自由PBHBV-001及PBHBV-2-15組成之群。

【請求項47】

如請求項38至46中任一項之醫藥組合物，其包含至少一種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項48】

如請求項47之醫藥組合物，其包含至少兩種靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸。

【請求項49】

如請求項47之醫藥組合物，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選自由siRNA 1m至15m之二者siRNA組合組成之群。

【請求項50】

如請求項47之醫藥組合物，其中靶向B型肝炎基因組之該寡聚核苷酸選自由siRNA 1m至15m之三者siRNA組合組成之群。

【請求項51】

如請求項38至50中任一項之醫藥組合物，其包含至少一種免疫刺激劑。

【請求項52】

如請求項51之醫藥組合物，其中該免疫刺激劑選自由IFN基因刺激物(STING)及白介素之促效劑組成之群。

【請求項53】

如請求項38之醫藥組合物，其包含以下藥劑組合：

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及衣殼抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；

靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

衣殼抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；或

逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑。

【請求項54】

如請求項38之醫藥組合物，其包含以下藥劑組合：

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

- 衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
- 衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- 衣殼抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；
- 衣殼抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；
- 衣殼抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；
- 衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- 衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- 衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；
- cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
- cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；
- cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；

sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形

成抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及衣殼抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；

免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑及逆轉錄酶抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑；

免疫刺激劑及逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及cccDNA形成抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及sAg分泌抑制劑；

逆轉錄酶抑制劑及靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸及免疫刺激劑；

逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及sAg分泌抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及衣殼抑制劑及免疫刺激劑；
逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及衣殼抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及sAg分泌抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及cccDNA形成抑制劑及免疫刺激劑；
逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及衣殼抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及cccDNA形成抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及sAg分泌抑制劑及免疫刺激劑；
逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及衣殼抑制劑；
逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及cccDNA形成抑制劑；或
逆轉錄酶抑制劑及免疫刺激劑及sAg分泌抑制劑。

【請求項55】

一種請求項1至54中提供該組合之任一項不包含僅衣殼抑制劑與干擾素之組合。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種治療動物之B型肝炎的方法，其包括向該動物投與至少兩種選自由以下組成之群的藥劑：

- a) 逆轉錄酶抑制劑；
- b) 衣殼抑制劑；
- c) cccDNA形成抑制劑；
- d) sAg分泌抑制劑；
- e) 靶向B型肝炎基因組之寡聚核苷酸；及
- f) 免疫刺激劑。

【請求項2】

一種如說明書所載之發明。