

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-501202

(P2019-501202A)

(43) 公表日 平成31年1月17日 (2019.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 31/20 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/20	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 2 0 6
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>A 6 1 K 38/20 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 291 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-535880 (P2018-535880)	(71) 出願人	513146871
(86) (22) 出願日	平成29年1月6日 (2017.1.6)		アルプータス・バイオファーマー・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成30年8月22日 (2018.8.22)		カナダ国 V 5 J 5 J 8 プリティッシュ
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/012614		ユコロンビア州 バーナビー グレンリヨン パークウェイ 100-8900
(87) 国際公開番号	W02017/120527	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成29年7月13日 (2017.7.13)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	62/276, 722	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成28年1月8日 (2016.1.8)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	62/343, 514		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成28年5月31日 (2016.5.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/345, 476		
(32) 優先日	平成28年6月3日 (2016.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎を治療するための治療用組成物及び方法

## (57) 【要約】

本発明は、B型肝炎を治療するのに有用な治療用混合物及び治療方法を提供する。本発明は、HBVなどのウイルス感染症を治療するのに有用な治療用混合物及び治療方法を提供する。本明細書で提供する実施例は、HBVに対する異なる作用機序を有する薬剤を用いた、多数種混合物（例えば、2種混合物）による試験の結果について開示している。本明細書に記載のとおり、いくつかの薬剤混合物は予想外で相乗的な相互作用を示し、また混合物は、概ね拮抗作用を欠いていた。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

薬学的に許容される担体、ならびに、

- a) カプシド阻害剤、
- b) s A g 分泌阻害剤、
- c) 逆転写酵素阻害剤、
- d) c c c D N A 形成阻害剤、
- e) B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも 2 種の薬剤を含む医薬組成物。

10

## 【請求項 2】

少なくとも 1 種のカプシド阻害剤を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記カプシド阻害剤は、B a y - 4 1 - 4 1 0 9、A T - 6 1、D V R - 0 1 及び D V R - 2 3 f から選択される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

少なくとも 1 種の s A g 分泌阻害剤を含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記 s A g 分泌阻害剤は、P B H B V - 0 0 1 及び P B H B V - 2 - 1 5 からなる群から選択される、請求項 4 に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 6】

少なくとも 1 種の逆転写酵素阻害剤を含む、請求項 1 から請求項 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

前記逆転写酵素阻害剤は、ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テルビブジン及びテノホビルからなる群から選択される、請求項 6 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

少なくとも 1 種の c c c D N A 形成阻害剤を含む、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 9】

前記 c c c D N A 形成阻害剤は、C C C - 0 9 7 5 及び C C C - 0 3 4 6 から選択される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 1 種のオリゴマーヌクレオチドを含む、請求項 1 から請求項 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 2 種のオリゴマーヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 12】

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 2 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

40

## 【請求項 13】

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 3 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 14】

少なくとも 1 種の免疫刺激剤を含む、請求項 1 から請求項 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 15】

前記免疫刺激剤は、I F N 遺伝子刺激因子 ( S T I N G ) 作動薬及びインターロイキン

50

からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

以下の薬剤の混合物、

s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びカプシド阻害剤、  
 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤、  
 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、  
 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、  
 カプシド阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、  
 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、  
 c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、  
 s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、  
 免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、  
 逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、または、  
 逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤  
 を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

以下の薬剤の混合物、

カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c  
 c D N A 形成阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、 10  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤 20  
 、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、 30  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤  
 、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤 40  
 、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、 50

免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びcccDNA形成阻害剤、または、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びsAg分泌阻害剤  
 を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

10

20

【請求項18】

B型肝炎などのウイルス感染症を治療または予防するのに混合して使用する、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、
- e) B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を含むキット。

30

【請求項19】

少なくとも1種の逆転写酵素阻害剤を含む、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

前記逆転写酵素阻害剤は、ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テルビブジン及びテノホビルからなる群から選択される、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

少なくとも1種のカプシド阻害剤を含む、請求項18から請求項20のいずれか1項に記載のキット。

【請求項22】

前記カプシド阻害剤は、Bay-41-4109、AT-61、DVR-01及びDVR-23fから選択される、請求項21に記載のキット。

40

【請求項23】

少なくとも1種のcccDNA形成阻害剤を含む、請求項18から請求項22のいずれか1項に記載のキット。

【請求項24】

前記cccDNA形成阻害剤は、CCC-0975及びCCC-0346から選択される、請求項23に記載のキット。

【請求項25】

少なくとも1種のsAg分泌阻害剤を含む、請求項18から請求項24のいずれか1項に記載のキット。

50

## 【請求項 26】

前記 s A g 分泌阻害剤は、P B H B V - 0 0 1 及び P B H B V - 2 - 1 5 からなる群から選択される、請求項 25 に記載のキット。

## 【請求項 27】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 1 種のオリゴマーヌクレオチドを含む、請求項 18 から請求項 26 のいずれか 1 項に記載のキット。

## 【請求項 28】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 2 種のオリゴマーヌクレオチドを含む、請求項 27 に記載のキット。

## 【請求項 29】

10

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 2 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 27 に記載のキット。

## 【請求項 30】

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 3 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 27 に記載のキット。

## 【請求項 31】

少なくとも 1 種の免疫刺激剤を含む、請求項 18 から請求項 30 のいずれか 1 項に記載のキット。

## 【請求項 32】

前記免疫刺激剤は、I F N 遺伝子刺激因子 ( S T I N G ) 作動薬及びインターロイキンからなる群から選択される、請求項 31 に記載のキット。

20

## 【請求項 33】

以下の、2 種の薬剤の混合物、

カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びカプシド阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、

カプシド阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

30

カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、

カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

s A g 分泌阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、

40

s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、

s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

免疫刺激剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、

免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、

免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、

逆転写酵素阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、

50

逆転写酵素阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
逆転写酵素阻害剤及びsAg分泌阻害剤、または、  
逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤  
のうちの1つを含む、請求項18に記載のキット。

【請求項34】

以下の、3種の薬剤の混合物、

カプシド阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
カプシド阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
カプシド阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
カプシド阻害剤、sAg分泌阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
カプシド阻害剤、sAg分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
カプシド阻害剤、sAg分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
カプシド阻害剤、免疫刺激剤及びcccDNA形成阻害剤、  
カプシド阻害剤、免疫刺激剤及びsAg分泌阻害剤、  
カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
cccDNA形成阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びcccDNA形成阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びsAg分泌阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、カプシド阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、カプシド阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、sAg分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、sAg分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
cccDNA形成阻害剤、sAg分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、免疫刺激剤及びsAg分泌阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
cccDNA形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
sAg分泌阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びcccDNA形成阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、  
sAg分泌阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、カプシド阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
sAg分泌阻害剤、カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
sAg分泌阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
sAg分泌阻害剤、免疫刺激剤及びcccDNA形成阻害剤、

s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 免疫刺激剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成  
 阻害剤、  
 免疫刺激剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤  
 、  
 免疫刺激剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤  
 、  
 免疫刺激剤、カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N  
 A 形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌  
 阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤  
 、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、または、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤  
 のうちの 1 つを含む、請求項 18 に記載のキット。

10

20

30

40

50

# 【請求項 35】

動物の B 型肝炎を治療するための方法であって、前記方法は、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) c c c D N A 形成阻害剤、
- d) s A g 分泌阻害剤、
- e) B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも 2 種の薬剤を前記動物に投与することを含む、前記



方法。

【請求項 3 6】

少なくとも 1 種の逆転写酵素阻害剤を前記動物に投与する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記逆転写酵素阻害剤は、ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テルビブジン及びテノホビルからなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 種のカプシド阻害剤を前記動物に投与する、請求項 3 5 から請求項 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記カプシド阻害剤は、B a y - 4 1 - 4 1 0 9、A T - 6 1、D V R - 0 1 及び D V R - 2 3 f からなる群から選択される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

少なくとも 1 種の c c c D N A 形成阻害剤を前記動物に投与する、請求項 3 5 から請求項 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 c c c D N A 形成阻害剤は、C C C - 0 9 7 5 及び C C C - 0 3 4 6 から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

少なくとも 1 種の s A g 分泌阻害剤を前記動物に投与する、請求項 3 5 から請求項 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 s A g 分泌阻害剤は、P B H B V - 0 0 1 及び P B H B V - 2 - 1 5 からなる群から選択される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 1 種のオリゴマーヌクレオチドを前記動物に投与する、請求項 3 5 から請求項 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

B 型肝炎ゲノムを標的とする少なくとも 2 種のオリゴマーヌクレオチドを前記動物に投与する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 2 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

B 型肝炎ゲノムを標的とする前記オリゴマーヌクレオチドは、s i R N A 1 m ~ 1 5 m の 3 種 s i R N A 混合物からなる群から選択される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

少なくとも 1 種の免疫刺激剤を前記動物に投与する、請求項 3 5 から請求項 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記免疫刺激剤は、I F N 遺伝子刺激因子 ( S T I N G ) 作動薬及びインターロイキンからなる群から選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

少なくとも 1 種の薬剤は、経口投与される、請求項 3 5 から請求項 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

少なくとも 2 種の薬剤は、経口投与される、請求項 3 5 から請求項 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

オリゴマーヌクレオチドは、静脈内投与される、請求項 3 5 から請求項 5 1 のいずれか

10

20

30

40

50

1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

以下の、2 種の薬剤の混合物、

カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びカプシド阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、

B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤、

10

カプシド阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、

カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、

c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

s A g 分泌阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

20

s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、

s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、

s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

免疫刺激剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、

免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、

免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、

逆転写酵素阻害剤及び B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、

30

逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、

逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、または、

逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤

のうちの 1 つを前記動物に投与する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 5 4】

以下の、3 種の薬剤の混合物、

カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、

カプシド阻害剤、c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

40

カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、

カプシド阻害剤、s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、

カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、

カプシド阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、

カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、

カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、

カプシド阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、

c c c D N A 形成阻害剤、B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c

50

c D N A 形成阻害剤、

c c c D N A 形成阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A  
 g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転  
 写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、 s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、 10  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 c c c D N A 形成阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N  
 A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤 20  
 、  
 s A g 分泌阻害剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素  
 阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 s A g 分泌阻害剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及び c c c D N A 形成阻害剤、 30  
 s A g 分泌阻害剤、免疫刺激剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 s A g 分泌阻害剤、逆転写酵素阻害剤及び免疫刺激剤、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び c c c D N A 形成  
 阻害剤、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び s A g 分泌阻害剤  
 、  
 免疫刺激剤、 B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び逆転写酵素阻害剤 40  
 、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、 カプシド阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び s A g 分泌阻害剤、  
 免疫刺激剤、 c c c D N A 形成阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及び c c c D N A 形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、 s A g 分泌阻害剤及び逆転写酵素阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びカプシド阻害剤、 50

免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 免疫刺激剤、逆転写酵素阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、カプシド阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及びsAg分泌阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、cccDNA形成阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及びcccDNA形成阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、sAg分泌阻害剤及び免疫刺激剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びカプシド阻害剤、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びcccDNA形成阻害剤、または、  
 逆転写酵素阻害剤、免疫刺激剤及びsAg分泌阻害剤  
 のうちの1つを前記動物に投与する、請求項35に記載の方法。

10

20

#### 【請求項55】

前記混合物は、カプシド阻害剤及びインターフェロンのみの混合物を含まない、提供する請求項1から請求項54のいずれか1項。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

##### 関連出願の相互参照

本特許出願は、2016年1月8日出願の米国出願シリアル番号62/276,722、2016年5月31日出願の米国出願シリアル番号62/343,514、2016年6月3日出願の米国出願シリアル番号62/345,476、2016年10月17日出願の米国出願シリアル番号62/409,180、及び、2016年11月11日出願の米国出願シリアル番号62/420,969の優先権の利益を主張するものであり、これら出願は参照として本明細書に組み込まれる。

30

#### 【背景技術】

#### 【0002】

B型肝炎ウイルス(「HBV」と略される)は、ヘパドナウイルスファミリーのメンバーである。ウイルス粒子(ビリオンと呼ばれることもある)は、外側脂質エンベロープ、及び、タンパク質で構成される正二十面体ヌクレオカプシドコアを含む。ヌクレオカプシドは、ウイルスDNA、及び、逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼを封入している。外側エンベロープは、感受性細胞(一般的には肝細胞)へのウイルス結合及び進入に関与する包埋タンパク質を収容している。感染性ウイルス粒子に加え、コアの欠落したフィラメント体及び球状体が感染個体の血清中に見つかることもある。これらの粒子は感染性ではなく、ビリオン表面の一部を形成する脂質及びタンパク質で構成されている。この脂質及びタンパク質は表面抗原(HBsAg)と呼ばれており、ウイルスの生活環中、過剰に産生される。

40

#### 【0003】

HBVのゲノムは環状DNAからなっているが、そのDNAが完全に二本鎖ではないため異常である。全長鎖の一端は、ウイルスDNAポリメラーゼと結合している。ゲノムは、3020~3320ヌクレオチド長(全長鎖)及び1700~2800ヌクレオチド長

50

(短い鎖)である。ネガティブセンス(非コード)は、ウイルスmRNAに対して相補的である。ウイルスDNAは、細胞の感染直後における核内において見つかる。ゲノムによりコードされ、C、X、P及びSと呼ばれる4種類の周知の遺伝子が存在している。コアタンパク質はC遺伝子(HBcAg)によりコードされ、その開始コドンは、そこからプレコアタンパク質が産生される上流インフレーションAUG開始コドンによって先行される。HBeAgは、プレコアタンパク質のタンパク質分解プロセスにより産生される。DNAポリメラーゼは、P遺伝子によりコードされている。S遺伝子は、表面抗原(HBsAg)をコードする遺伝子である。HBsAg遺伝子は1つの長いオープンリーディングフレームであるが、遺伝子を3つの区画(pre-S1、pre-S2及びS)に分割する3つのインフレーション「開始」(ATG)コドンを含んでいる。複数の開始コドンが存在することにより、ラージ、ミドル及びスモールと呼ばれる、3つの異なるサイズのポリペプチドが産生される。X遺伝子がコードするタンパク質の機能は完全には解明されていないが、肝臓癌の進行に関係している。HBVの複製は複雑なプロセスである。複製は肝臓内において行われるが、ウイルスは血液中に拡散し、ウイルスタンパク質及びそれらに対する抗体が感染した人々において見つかることになる。HBVの構造、複製及び生態については、D. Glebe and C. M. Bremer, *Seminars in Liver Disease*, Vol. 33, No. 2, pages 103 - 112 (2013)において考察されている。

10

#### 【0004】

HBVがヒトに感染すると、肝臓の感染性炎症性疾患を引き起こす場合がある。感染個体は、長年にわたり症状を示さないこともある。世界人口の約3分の1が、その生涯において1度は感染していると推定される(慢性保菌者である3億5千万人を含む)。

20

#### 【0005】

ウイルスは、感染血液または感染体液に曝露することにより伝染する。周産期感染もまた、主な感染経路となり得る。急性疾患は、肝臓の炎症、嘔吐、黄疸、また場合により、死をもたらす。慢性B型肝炎が、最終的に肝硬変及び肝臓癌を引き起こす場合もある。

#### 【0006】

HBVに感染したほとんどの人々が彼らの免疫系の働きにより感染を除去するにもかかわらず、感染した人々の中には、侵襲性の感染症(劇症肝炎)を患う人々もあり、更に、慢性的な感染により肝疾患となる可能性が高まる人々もいる。現時点でいくつかの薬剤がHBV感染症治療用に承認されているが、感染個体は、これらの薬剤に対して様々な程度の効果を示しており、これら薬剤のどれも感染個体からウイルスを除去してはいない。

30

#### 【0007】

D型肝炎ウイルス(HDV)とは、B型肝炎ウイルス(HBV)の存在下でのみ増殖可能な小型円形包膜RNAウイルスのことである。詳細には、HDVは、自身を増殖させるためにHBV表面抗原タンパク質を必要とする。HBV及びHDVの両方に感染することにより、HBV単独による感染症と比較してより重大な合併症を引き起こすことになる。これらの合併症は、急性感染症において肝不全を患う可能性が高まること、肝硬変へと急速に進行すること(慢性感染症において肝臓癌を発症する高い可能性を伴う)を含む。B型肝炎ウイルスと組み合わせると、D型肝炎は、全ての肝炎感染症中、最も高い死亡率を示す。HDVの伝染経路は、HBVの伝染経路と類似している。感染は主に、HBV感染症のリスクが高い者、特に、麻薬常用者、及び、凝固因子濃縮製剤を投与している者に限定される。

40

それゆえ、動物(例えば、ヒト)のHBV感染症に加え、動物(例えば、ヒト)のHBV/HDV感染症を治療するための組成物及び方法に対する継続的な要望が存在している。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】D. Glebe and C. M. Bremer, *Seminars*

50

in Liver Disease, Vol. 33, No. 2, pages 103 - 112 (2013)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、HBVなどのウイルス感染症を治療するのに有用な治療用混合物及び治療方法を提供する。

【0010】

本明細書で提供する実施例は、HBVに対する異なる作用機序を有する薬剤を用いた、多数種混合物（例えば、2種混合物）による試験の結果について開示している。本明細書に記載のとおり、いくつかの薬剤混合物は予想外で相乗的な相互作用を示し、また混合物は、概ね拮抗作用を欠いていた。

10

【0011】

一実施形態では、本発明は、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、
- e) B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

20

からなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を提供する。

【0012】

別の実施形態では、本発明は、B型肝炎などのウイルス感染症を治療または予防するのに混合して使用する、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、
- e) B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

30

からなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を含むキットを提供する。

【0013】

別の実施形態では、本発明は、B型肝炎などのウイルス感染症を治療または予防するのに混合して使用する、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、
- e) B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

40

からなる群から選択される少なくとも3種の薬剤を含むキットを提供する。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、薬学的に許容される担体、ならびに、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、
- e) B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

50

からなる群から選択される少なくとも 2 種の薬剤を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

別の実施形態では、本発明は、薬学的に許容される担体、ならびに、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) c c c D N A 形成阻害剤、
- d) s A g 分泌阻害剤、
- e) B 型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、及び、
- f) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも 3 種の薬剤を含む医薬組成物を提供する。

10

【発明を実施するための形態】

【0016】

薬学的に許容される酸または塩基の塩として化合物を投与することが適切な場合がある。薬学的に許容される塩の例は、生理学的に許容されるアニオンを形成する酸で形成された有機酸付加塩であり、例えば、トルエンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 $\alpha$ -ケトグルタル酸塩及び  $\alpha$ -グリセロリン酸塩である。好適な無機塩もまた形成されてもよく、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩及び炭酸塩が挙げられる。

【0017】

薬学的に許容される塩は、当該技術分野において周知の標準的な手順を用いて得てもよく、例えば、アミンなど十分に塩基性の化合物を好適な酸と反応させて、生理学的に許容されるアニオンを生じさせることにより得てもよい。カルボン酸のアルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウムまたはリチウム）塩またはアルカリ土類金属（例えば、カルシウム）塩もまた調製可能である。

20

【0018】

逆転写酵素阻害剤

特定の実施形態では、逆転写酵素阻害剤はヌクレオシド類似体である。

【0019】

特定の実施形態では、逆転写酵素阻害剤は、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤（NARTIまたはNRTI）である。

30

【0020】

特定の実施形態では、逆転写酵素阻害剤は、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤（NtARTIまたはNtRTI）である。

【0021】

用語「逆転写酵素阻害剤」としては、エンテカビル、クレブジン、テルビブジン、ラミブジン、アデホビル、テノホビル、テノホビルジソプロキシル、テノホビルアラフェナミド、アデホビルジボボキシル、(1R, 2R, 3R, 5R) - 3 - (6 - アミノ - 9H - 9 - プリニル) - 2 - フルオロ - 5 - (ヒドロキシメチル) - 4 - メチレンシクロペンタン - 1 - オール（米国特許番号 8, 816, 074 に記載）、エムトリシタビン、アバカビル、エルブシタビン、ガンシクロビル、ロブカビル、ファムシクロビル、ペンシクロビル及びアムドキシビルが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0022】

用語「逆転写酵素阻害剤」としては、エンテカビル、ラミブジン、及び、(1R, 2R, 3R, 5R) - 3 - (6 - アミノ - 9H - 9 - プリニル) - 2 - フルオロ - 5 - (ヒドロキシメチル) - 4 - メチレンシクロペンタン - 1 - オールが挙げられるがこれらに限定されない。

【0023】

用語「逆転写酵素阻害剤」としては、上記した逆転写酵素阻害剤の共有結合したホスホラミデートまたはホスホンアミデート部分、または、例えば、米国特許番号 8, 816, 074、US 2011/0245484 A1 及び US 2008/0286230 A1 に記

50

載されているものが挙げられるがこれらに限定されない。

【0024】

用語「逆転写酵素阻害剤」としては、メチル（（（（1R, 3R, 4R, 5R）- 3 - （6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル） - 4 - フルオロ - 5 - ヒドロキシ - 2 - メチレンシクロペンチル）メトキシ）（フェノキシ）ホスホリル） - （DまたはL） - アラニネート及びメチル（（（（1R, 2R, 3R, 4R）- 3 - フルオロ - 2 - ヒドロキシ - 5 - メチレン - 4 - （6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9H - プリン - 9 - イル）シクロペンチル）メトキシ）（フェノキシ）ホスホリル） - （DまたはL） - アラニネートなどのホスホラミデート部分を含む、ヌクレオチド類似体が挙げられるがこれらに限定されない。更に、例えば、メチル（（R） - （（（1R, 3R, 4R, 5R）- 3 - （6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル） - 4 - フルオロ - 5 - ヒドロキシ - 2 - メチレンシクロペンチル）メトキシ）（フェノキシ）ホスホリル） - （DまたはL） - アラニネート及びメチル（（S） - （（（1R, 3R, 4R, 5R）- 3 - （6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル） - 4 - フルオロ - 5 - ヒドロキシ - 2 - メチレンシクロペンチル）メトキシ）（フェノキシ）ホスホリル） - （DまたはL） - アラニネートを含む、個々のそれらのジエステレオマーが挙げられる。

10

【0025】

用語「逆転写酵素阻害剤」としては、テノホビルアラフェナミドなどのホスホンアミデート部分に加えて、US 2008 / 0286230 A1に記載されるものが挙げられるがこれらに限定されない。活性剤を含有する立体選択的なホスホラミデートまたはホスホンアミデートを調製するための方法については、例えば、米国特許番号 8, 816, 074 に加え、US 2011 / 0245484 A1 及び US 2008 / 0286230 A1 に記載されている。

20

【0026】

カプシド阻害剤

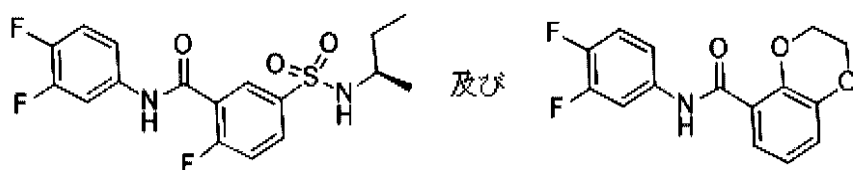
本明細書に記載する場合、用語「カプシド阻害剤」としては、カプシドタンパク質の発現及び／または機能を、直接または間接的のいずれかで阻害可能な化合物が挙げられる。例えば、カプシド阻害剤としては、カプシドアセンブリを阻害する、非カプシドポリマーの形成を誘導する、過剰なカプシドアセンブリまたは誤ったカプシドアセンブリを促進する、カプシドの安定化に悪影響を及ぼす、及び／または、RNAの封入を阻害する、任意の化合物を挙げてもよいがこれらに限定されない。カプシド阻害剤としてはまた、複製プロセス内の下流イベント（複数可）（例えば、ウイルスDNA合成、弛緩型開環状DNA（rcDNA）の核内への輸送、共有結合閉環状DNA（cccDNA）の形成、ウイルスの成熟、出芽及び／または放出など）において、カプシド機能を阻害する、任意の化合物が挙げられる。例えば、特定の実施形態では、例えば、本明細書に記載のアッセイを用いて測定する際、阻害剤は、カプシドタンパク質の発現レベルまたは生物活性を検出可能に阻害する。特定の実施形態では、阻害剤は、ウイルスの生活環におけるrcDNA及び下流産物のレベルの、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも75%、または、少なくとも90%を阻害する。

30

【0027】

用語「カプシド阻害剤」としては、以下の化合物、

【化1】



を含む、国際特許出願公開番号WO 2013 006394、WO 2014 106019 及び WO 2014 089296 に記載の化合物が挙げられる。

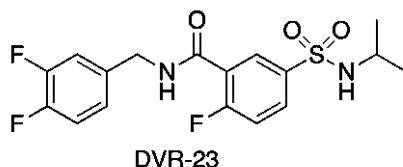
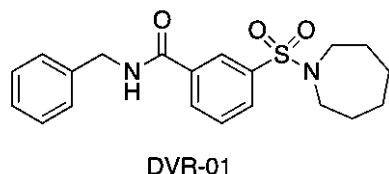
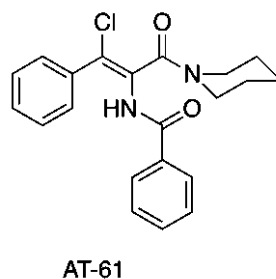
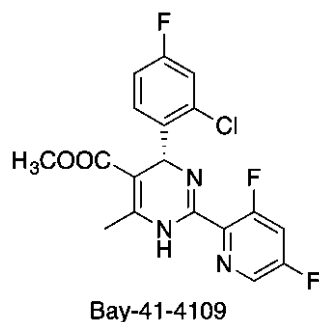
【0028】

50



用語「カプシド阻害剤」としてはまた、化合物、Bay - 41 - 4109（国際特許出願公開番号WO/2013/144129を参照のこと）、AT - 61（国際特許出願公開番号WO/1998/33501、及び、King, RW, et al., Antimicrob Agents Chemother., 1998, 42, 12, 3179 - 3186を参照のこと）、DVR - 01及びDVR - 23（国際特許出願公開番号WO2013/006394、及び、Campagna, MR, et al., J. of Virology, 2013, 87, 12, 6931を参照のこと）、ならびに、薬学的に許容されるそれらの塩が挙げられる。

【化2】



【0029】

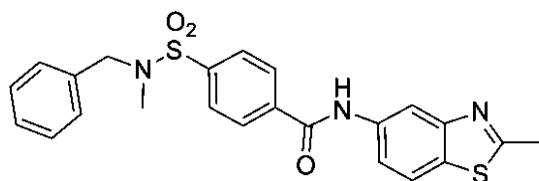
c c c DNA 形成阻害剤

共有結合閉環状DNA（cccDNA）は、細胞核内においてウイルスrcDNAから生成され、ウイルスmRNAの転写鋳型として機能する。本明細書に記載する場合、用語「cccDNA形成阻害剤」としては、cccDNAの形成及び/または安定性を、直接または間接的のいずれかで阻害可能な化合物が挙げられる。例えば、cccDNA形成阻害剤としては、カプシドディスアセンブリ、核内へのrcDNAの進入、及び/または、rcDNAのcccDNAへの変換を阻害する、任意の化合物を挙げてもよいがこれらに限定されない。例えば、特定の実施形態では、例えば、本明細書に記載のアッセイを用いて測定する際、阻害剤は、cccDNAの形成及び/または安定性を検出可能に阻害する。特定の実施形態では、阻害剤は、cccDNAの形成及び/または安定性の、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも75%、または、少なくとも90%を阻害する。

【0030】

用語「cccDNA形成阻害剤」としては、以下の化合物、

【化3】



を含む、国際特許出願公開番号WO2013130703に記載の化合物が挙げられる。

【0031】

用語「cccDNA形成阻害剤」としては、通常特に、米国特許出願公開番号US2015/0038515A1号に記載されているものが挙げられるがこれらに限定されない。用語「cccDNA形成阻害剤」としては、1-(フェニルスルホニル)-N-(ピリジン-4-イルメチル)-1H-インドール-2-カルボキサミド；1-ベンゼンスルホニル-ピロリジン-2-カルボン酸(ピリジン-4-イルメチル)-アミド；2-(2-クロロ-N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)-4-(トリフルオロメチル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(4-クロロ-N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)-4-(トリフルオロメチル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)-4-メトキシフェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピペリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)プロパンアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-3-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリミジン-5-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリミジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-(N-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イルメチル)アセトアミド；2-[(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-(4-フルオロ-ベンゼンスルホニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-アセトアミド；2-[(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-(トルエン-4-スルホニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-プロモ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-(2-メチル-ベンゾチアゾール-5-イル)-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-[4-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-ベンジル]-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-[3-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-ベンジル]-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-ベンジル-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-アセトアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-プロピオンアミド；2-[ベンゼンスルホニル-(2-フルオロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-アミノ]-N-ピリジン-4-イルメチル-アセトアミド；4(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-N-(ピリジン-4-イル-メチル)ブタンアミド；4-(2-(N-(2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)フェニル)フェニルスルホンアミド)-アセトアミド)-メチル)-1,1-ジメチルピペリジン-1-イウムクロリド；4-(ベンジル-メチル-スルファモイル)-N-(2-クロロ-5-トリフルオロメチル-フェニル)-ベンズアミド；4-(ベンジル-メチル-スルファモイル)-N-(2-メチル-1H-インドール-5-イル)-ベンズアミド；4-(ベンジル-メチル-スルファモイル)-N-(2-メチル-1H-インドール-5-イル)-ベンズアミド；4-(ベンジル-メチル-スルファモイル)

- N - ( 2 - メチル - ベンゾチアゾール - 5 - イル ) - ベンズアミド ; 4 - ( ベンジル - メチル - スルファモイル ) - N - ( 2 - メチル - ベンゾチアゾール - 6 - イル ) - ベンズアミド ; 4 - ( ベンジル - メチル - スルファモイル ) - N - ( 2 - メチル - ベンゾチアゾール - 6 - イル ) - ベンズアミド ; 4 - ( ベンジル - メチル - スルファモイル ) - N - ピリジン - 4 - イルメチル - ベンズアミド ; N - ( 2 - アミノエチル ) - 2 - ( N - ( 2 - クロロ - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ) フェニルスルホンアミド ) - アセトアミド ; N - ( 2 - クロロ - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ) - N - ( 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロ - 2 , 6 - ナフチリジン - 2 ( 1 H ) - イル ) - 2 - オキシエチル ) ベンゼンスルホンアミド ; N - ベンゾチアゾール - 6 - イル - 4 - ( ベンジル - メチル - スルファモイル ) - ベンズアミド ; N - ベンゾチアゾール - 6 - イル - 4 - ( ベンジル - メチル - スルファモイル ) - ベンズアミド ; t e r t - ブチル ( 2 - ( 2 - ( N - ( 2 - クロロ - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ) フェニルスルホンアミド ) アセトアミド ) - エチル ) カルバメート ; 及び t e r t - ブチル 4 - ( ( 2 - ( N - ( 2 - クロロ - 5 - ( トリフルオロメチル ) フェニル ) フェニルスルホンアミド ) - アセトアミド ) - メチル ) ピペリジン - 1 - カルボキシレート、ならびに、任意選択的に、これらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。

10

#### 【 0 0 3 2 】

##### s A g 分泌阻害剤

本明細書に記載する場合、用語「s A g 分泌阻害剤」としては、H B V 感染細胞由来のサブウイルス粒子及び／またはD N A 含有ウイルス粒子を有するs A g ( S、M 及び／またはL 表面抗原) の分泌を、直接または間接的のいずれかで阻害可能な化合物が挙げられる。例えば、特定の実施形態では、例えば、当該技術分野において周知または本明細書に記載のアッセイ (例えば、E L I S A アッセイ) またはウェスタンブロットを用いて測定する際、阻害剤は、s A g の分泌を検出可能に阻害する。特定の実施形態では、阻害剤は、s A g の分泌を、少なくとも5 %、少なくとも10 %、少なくとも20 %、少なくとも50 %、少なくとも75 %、または、少なくとも90 % だけ阻害する。特定の実施形態では、阻害剤は、患者におけるs A g の血清レベルの、少なくとも5 %、少なくとも10 %、少なくとも20 %、少なくとも50 %、少なくとも75 %、または、少なくとも90 % を低下させる。

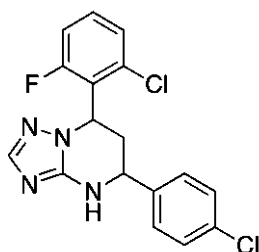
20

#### 【 0 0 3 3 】

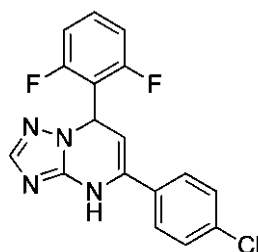
用語「s A g 分泌阻害剤」としては、米国特許番号8 , 9 2 1 , 3 8 1 に記載の化合物に加え、米国特許出願公開番号2 0 1 5 / 0 0 8 7 6 5 9 及び2 0 1 3 / 0 3 0 3 5 5 2 に記載の化合物が挙げられる。例えば、この用語としては、化合物、P B H B V - 0 0 1 及びP B H B V - 2 - 1 5、ならびに、薬学的に許容されるそれらの塩が挙げられる。

30

#### 【 化 4 】



PBHBV-001



PBHBV-2-15

40

#### 【 0 0 3 4 】

##### 免疫刺激剤

用語「免疫刺激剤」としては、免疫応答を調節可能な化合物 (例えば、免疫応答を刺激する (例えば、アジュバント) ) が挙げられる。用語「免疫刺激剤」としては、ポリイノシン酸：ポリシチジル酸 (ポリI : C) 及びインターフェロンが挙げられる。

#### 【 0 0 3 5 】

50

用語「免疫刺激剤」としては、IFN遺伝子刺激因子(STING)作動薬及びインターロイキンが挙げられる。この用語としてはまた、HBsAg放出阻害剤、TLR-7作動薬(GS-9620、RG-7795)、T細胞刺激剤(GS-4774)、RIG-1阻害剤(SB-9200)、及び、SMAC模倣薬(ピリナパント)が挙げられる。用語「免疫刺激剤」としてはまた、抗PD-1抗体及びその断片が挙げられる。

【0036】

オリゴマーヌクレオチド

用語「B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド」としては、Arrowhead-ARC-520が挙げられる(米国特許番号8,809,293、及び、Wooddell CI, et al., Molecular Therapy, 2013, 21, 5, 973-985を参照のこと)。

10

【0037】

HBVゲノムの1つまたは複数の遺伝子及び/または転写物を標的とするように、オリゴマーヌクレオチドを設計してもよい。このようなsiRNA分子の例は、本明細書の表Aに記載のsiRNA分子である。

【0038】

用語「B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド」としてはまた、それぞれがセンス鎖及びそのセンス鎖にハイブリダイズしたアンチセンス鎖を含む、単離した二本鎖siRNA分子が挙げられる。siRNAは、HBVゲノムの1つまたは複数の遺伝子及び/または転写物を標的とする。siRNA分子の例は、本明細書の表Aに記載のsiRNA分子である。

20

【0039】

別の態様では、その用語としては、本明細書の表Bに記載の単離したセンス鎖及びアンチセンス鎖が挙げられる。

【0040】

用語「B型肝炎ウイルス」(HBVと略される)とは、オルソヘパドナウイルス属のウイルス種のことを意味し、ウイルスのヘパドナウイルス科ファミリーの一部であり、またヒトにおいて肝臓の炎症を引き起こし得る。

【0041】

用語「D型肝炎ウイルス」(HDVと略される)とは、デルタウイルス属のウイルス種のことを意味し、ヒトにおいて肝臓の炎症を引き起こし得る。

30

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「低分子干渉RNA」または「siRNA」とは、siRNAが標的遺伝子または標的配列と同一の細胞内に存在する場合、標的遺伝子または標的配列の発現を抑制または阻害(例えば、分解を媒介するか、または、siRNA配列に対して相補的なmRNAの翻訳を阻害するかによって)することができる二本鎖RNA(すなわち、二重鎖RNA)のことを意味する。siRNAは、標的遺伝子または標的配列と実質的にまたは完全に同一であってもよく、または、ミスマッチ領域(すなわち、ミスマッチモチーフ)を含んでいてもよい。特定の実施形態では、siRNAは、約19~25(二重鎖)ヌクレオチド長であってもよく、好ましくは、約20~24、21~22または21~23(二重鎖)ヌクレオチド長である。siRNA二重鎖は、約1~約4ヌクレオチドまたは約2~約3ヌクレオチドの3'オーバーハング、及び、5'リン酸末端を含んでいてもよい。siRNAの例としては、2本の別々の鎖分子(一方の鎖はセンス鎖であり、もう一方の鎖は相補的なアンチセンス鎖である)から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0043】

siRNAは、化学合成されることが好ましい。siRNAはまた、より長いdsRNA(例えば、約25ヌクレオチド長超のdsRNA)をE. coli RNase IIIまたはDicerで開裂させることにより生成してもよい。これらの酵素は、dsRNAを生物学的に活性なsiRNAへと処理する(例えば、Yang et al., Pr

50

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 9942 - 9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 14236 (2002); Byrom et al., Ambion Techno-tes, 10(1): 4 - 6 (2003); Kawasaki et al., Nucl-  
eic Acids Res., 31: 981 - 987 (2003); Knight et  
al., Science, 293: 2269 - 2271 (2001); 及び、Rob-  
ertson et al., J. Biol. Chem., 243: 82 (1968)を  
参照のこと)。dsRNAは、少なくとも50ヌクレオチド長～約100、200、30  
0、400または500ヌクレオチド長であることが好ましい。dsRNAは、1000  
、1500、2000、5000ヌクレオチド長ほどの長さであってもよく、または、  
それ以上の長さであってもよい。dsRNAは、完全な遺伝子転写物または部分的な遺伝子  
転写物をコードすることができる。特定の例においては、siRNAは、プラスミドによ  
りコードされてもよい(例えば、自動的にヘアピンループを有する二重鎖へと折り畳まれ  
る配列として転写される)。

#### 【0044】

語句「標的遺伝子の発現を阻害する」とは、標的遺伝子(例えば、HBVゲノム内の遺  
伝子)の発現をサイレンシング、抑制または阻害するsiRNAの機能のことを意味する  
。遺伝子サイレンシングの程度を測定するために、試験用試料(例えば、標的遺伝子を発  
現する目的の生物由来の生体試料、または、標的遺伝子を発現する培養物中の細胞試料)  
を、標的遺伝子の発現をサイレンシング、抑制または阻害するsiRNAと接触させる。  
試験用試料中における標的遺伝子の発現を、siRNAと接触させていない対照試料(例  
えば、標的遺伝子を発現する目的の生物由来の生体試料、または、標的遺伝子を発現する  
培養物中の細胞試料)中における標的遺伝子の発現と比較する。対照試料(例えば、標的  
遺伝子を発現する試料)に100%の数値を割り当ててもよい。特定の実施形態では、対  
照試料(例えば、緩衝液のみ、異なる遺伝子を標的とするsiRNA配列、スクランブル  
siRNA配列など)と比較した試験用試料の数値が、約100%、99%、98%、9  
7%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、8  
7%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、7  
7%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、3  
5%、30%、25%、20%、15%、10%、5%または0%である場合、標的遺伝  
子発現のサイレンシング、抑制または阻害を行う。好適なアッセイとしては、当業者に周  
知の手法(例えば、ドットプロット法、ノーザンプロット法、in situハイブリダ  
イゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能に加え、当業者に周知の表現型アッセイ  
)を用いた、タンパク質レベルまたはmRNAレベルの試験が挙げられるがこれらに限定  
されない。治療用核酸(siRNAなど)の「有効量」または「治療有効量」とは、所望  
の効果をもたらすのに、例えば、siRNAの不在下で検出された通常発現レベルと比  
較して、標的配列の発現を阻害するのに十分な量のことである。特定の実施形態では、対  
照(例えば、緩衝液のみ、異なる遺伝子を標的とするsiRNA配列、スクランブルsi  
RNA配列など)と比較して、siRNAにより得られた数値が、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%または0%である場合  
、標的遺伝子発現または標的配列発現の阻害を行う。標的遺伝子発現または標的配列発現  
を測定するための好適なアッセイとしては、当業者に周知の手法(例えば、ドットプロッ  
ト法、ノーザンプロット法、in situハイブリダイゼーション、ELISA、免疫  
沈降、酵素機能に加え、当業者に周知の表現型アッセイ)を用いた、タンパク質レベルま  
たはmRNAレベルの試験が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0045】

本明細書で使用する場合、用語「核酸」とは、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれか

において、少なくとも2種のヌクレオチド（すなわち、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド）を含有し、DNA及びRNAを含むポリマーのことを意味する。「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）またはリボース（RNA）、塩基、及び、リン酸基を含有する。ヌクレオチドは、リン酸基を介して互いに結合している。「塩基」としてはプリン及びピリミジンが挙げられ、更に、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、及び天然類似体、ならびに、プリン及びピリミジンの合成誘導体（新しい反応性基（限定するわけではないが例えば、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート及びハロゲン化アルキル）を導入する修飾を含むがこれらに限定されない）が挙げられる。核酸としては、周知のヌクレオチド類似体、または、修飾主鎖残基もしくは結合部を含有する核酸が挙げられ、それらは合成、天然及び非天然であり、参照核酸と類似した結合特性を有している。このような類似体及び/または修飾残基の例としては、ホスホロチオネート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、及び、ペプチド-核酸（PNA）が挙げられるがこれらに限定されない。加えて、核酸は、1つまたは複数のUNA部分を含んでいてもよい。

#### 【0046】

用語「核酸」としては、最大60ヌクレオチド（一般にオリゴヌクレオチドと呼ばれる）を含有する断片、及び、より長い断片（ポリヌクレオチドと呼ばれる）である、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが挙げられる。デオキシリボオリゴヌクレオチドは、糖の5'炭素及び3'炭素の位置でリン酸と共有結合して、交互の非分枝鎖ポリマーを形成する5-炭素糖（デオキシリボースと呼ばれる）から構成される。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、凝縮前のDNA、PCR産物、ベクター、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、または、これらの群の誘導体及び組み合わせの形態であってもよい。リボオリゴヌクレオチドは、5-炭素糖がリボースである類似の反復構造から構成される。RNAは、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、ダイサー-基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、tRNA、rRNA、ウイルスRNA（vRNA）、及びこれらの組み合わせの形態であってもよい。それゆえ、用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」とは、天然の塩基、糖及び糖間（主鎖）結合部からなるヌクレオチドモノマーまたはヌクレオシドモノマーのポリマーまたはオリゴマーのことを意味する。用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」としてはまた、非天然モノマーを含むポリマーまたはオリゴマー、またはその一部（同様に機能する）が挙げられる。例えば、高い細胞取り込み性、低い免疫原性、及び、ヌクレアーゼ存在下における高い安定性などの特性を有しているため、多くの場合、このような修飾または置換オリゴヌクレオチドが、天然形態よりも好ましい場合がある。

#### 【0047】

特に指示がない限り、個々の核酸配列はまた、明確に示した配列に加え、その保存的修飾変異体（例えば、縮重コドン置換体）、対立遺伝子、オルソログ、SNP及び相補配列を暗に包含する。具体的には、選択したコドンの1つまたは複数（または全て）における第3の位置を混合塩基及び/またはデオキシイノシン残基で置換した配列を生成することによって、縮重コドン置換体を得てもよい（Batzner et al., Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)）。

#### 【0048】

「単離した」または「精製した」DNA分子またはRNA分子は、その天然環境とは別に存在するDNA分子またはRNA分子である。単離したDNA分子またはRNA分子は、精製形態で存在していてもよく、または、非天然環境（例えば、遺伝子組換え宿主細胞など）で存在していてもよい。例えば、「単離した」または「精製した」核酸分子または

その生物活性部位は、組換え技術を用いて生成する際に、その他の細胞性物質または培地を実質的に含まず、または、化学合成を行う際に、化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない。一実施形態では、「単離した」核酸は、そこから核酸を得る生物のゲノムDNA内において、通常は核酸に隣接する配列（すなわち、核酸の5'末端及び3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、様々な実施形態では、単離した核酸分子は、そこから核酸を得る細胞のゲノムDNA内において、通常は核酸分子に隣接する、約5 kb未満の、約4 kb未満の、約3 kb未満の、約2 kb未満の、約1 kb未満の、約0.5 kb未満の、または、約0.1 kb未満のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

#### 【0049】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチドまたは前駆体ポリペプチドの生成に必要な部分長または完全長のコード配列を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列のことを意味する。

#### 【0050】

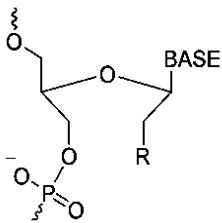
本明細書で使用する場合、「遺伝子産物」とは、RNA転写物またはポリペプチドなどの、遺伝子の産物のことを意味する。

#### 【0051】

用語「アンロックド核酸塩基類似体」（「UNA」と略される）とは、リボース環のC2'原子及びC3'原子が共有結合していない、非環式核酸塩基のことを意味する。用語「アンロックド核酸塩基類似体」としては、構造Aとして識別した以下の構造、

構造 A

#### 【化5】



を有する核酸塩基類似体が挙げられ、

式中、Rはヒドロキシルであり、Baseは、任意の天然または非天然の塩基、例えば、アデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）及びチミン（T）などである。UNAとしては、米国特許シリアル番号8,314,227に記載の非環式2'-3'-セコヌクレオチドモノマーとして識別した分子が挙げられる。

#### 【0052】

用語「脂質」とは、脂肪酸のエステルが挙げられるがこれらに限定されない有機化合物群のことを意味し、水には不溶性であるが、ほとんどの有機溶媒には可溶性であることを特徴とする。脂質は通常、少なくとも3つの部類、（1）「単純脂質」（脂肪及び油に加えワックスが挙げられる）、（2）「複合脂質」（リン脂質及び糖脂質が挙げられる）、及び、（3）「誘導脂質」（ステロイドなど）に分類される。

#### 【0053】

用語「脂質粒子」としては、治療用核酸（例えば、siRNA）を目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）へと送達するのに使用可能な脂質製剤が挙げられる。好ましい実施形態では、脂質粒子は通常、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び任意選択的に、粒子の凝集を防止するコンジュゲート脂質から形成される。核酸分子（例えば、siRNA分子）を含む脂質粒子は、核酸-脂質粒子と呼ばれている。通常、核酸は脂質粒子内に完全に封入されており、そのため、核酸は酵素分解から保護される。

#### 【0054】

特定の例においては、核酸-脂質粒子は、それらが静脈（i.v.）注射後において長期間にわたる循環寿命を示し得ること、それらが遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）に蓄積可能であること、及び、それらがこれら遠位部位において標的遺伝

10

20

30

40

50

子発現のサイレンシングを媒介可能であることから、全身投与において極めて有用である。核酸は、縮合剤と複合体を形成してもよく、またPCT公開番号WO00/03683に記載のとおり、脂質粒子内に封入されてもよい（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0055】

脂質粒子は通常、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nmまたは150nmの平均粒径を有し、実質的に非毒性である。加えて、核酸は、脂質粒子内に存在する場合、水溶液中において、ヌクレアーゼによる分解に耐性を示す。核酸-脂質粒子及びそれらの調製方法については、例えば、米国特許公開番号20040142025及び20070042031に開示されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

10

#### 【0056】

本明細書で使用する場合、「脂質封入」とは、siRNAなどの治療用核酸に、完全な封入、部分的な封入、またはその両方をもたらす脂質粒子のことを意味し得る。好ましい実施形態では、核酸（例えば、siRNA）は、脂質粒子内に完全に封入される（例えば、核酸-脂質粒子を形成するために）。

20

#### 【0057】

用語「脂質コンジュゲート」とは、脂質粒子の凝集を阻害するコンジュゲート化脂質のことを意味する。このような脂質コンジュゲートとしては、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、ジアルキルオキシプロピルと結合したPEG（例えば、PEG-DAAコンジュゲート）、ジアシルグリセロールと結合したPEG（例えば、PEG-DAGコンジュゲート）、コレステロールと結合したPEG、ホスファチジルエタノールアミンと結合したPEG、及び、セラミドとコンジュゲートしたPEG（例えば、米国特許番号5,885,613を参照のこと）など、カチオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート（例えば、POZ-DAAコンジュゲート）、ポリアミドオリゴマー（例えば、ATTA-脂質コンジュゲート）、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。POZ-脂質コンジュゲートの別の例については、PCT公開番号WO2010/006282に記載されている。PEGまたはPOZを、脂質に直接コンジュゲートしてもよく、または、リンカー部分を介して脂質に結合させてもよい。PEGまたはPOZを脂質に結合させるのに使用可能で好適な任意のリンカー部分としては、例えば、非エステル含有リンカー部分及びエステル含有リンカー部分が挙げられる。特定の好ましい実施形態では、非エステル含有リンカー部分、例えば、アミドまたはカルバメートなどを用いる。

30

#### 【0058】

用語「両親媒性脂質」とは部分的に、脂質物質の疎水性部分が疎水相に向く一方で、親水性部分が水相に向くような、任意の好適な物質のことを意味する。親水特性は、極性基または荷電基、例えば、炭化水素基、リン酸基、カルボキシル基、スルファト基、アミノ基、スルフヒドリル基、ニトロ基、ヒドロキシル基、及び、その他類似の基などの存在に由来する。長鎖飽和及び不飽和脂肪族炭化水素基、及び、1個または複数個の芳香族基、脂環基または複素環基（複数可）で置換されたような基が挙げられるがこれらに限定されない無極性基を包含することにより、疎水性が付与され得る。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質及びスフィンゴ脂質が挙げられるがこれらに限定されない。

40

#### 【0059】

リン脂質の代表例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン

50



、ホスファチジルセリン、ホスファチジリノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、及び、ジリノレオイルホスファチジルコリンが挙げられるがこれらに限定されない。リンを欠くその他の化合物、例えば、スフィンゴ脂質、糖スフィンゴ脂質ファミリー、ジアシルグリセロール及び - アシルオキシ酸などもまた、両親媒性脂質と呼ばれる基に含まれる。加えて、上記の両親媒性脂質を、トリグリセリド及びステロールを含むその他の脂質と混合してもよい。

#### 【0060】

用語「中性脂質」とは、選択した pH において、非荷電形態または中性双性イオン形態のいずれかで存在する、多数の脂質種のうちのいずれかのことを意味する。生理学的 pH におけるこのような脂質としては、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ケファリン、コレステロール、セレブロシド及びジアシルグリセロールが挙げられる。

10

#### 【0061】

用語「非カチオン性脂質」とは、任意の両親媒性脂質に加え、任意のその他中性脂質またはアニオン性脂質のことを意味する。

#### 【0062】

用語「アニオン性脂質」とは、生理学的 pH において負に荷電した任意の脂質のことを意味する。これらの脂質としては、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N - ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N - サクシニルホスファチジルエタノールアミン、N - グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リシルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (POPG)、及び、中性脂質に結合したその他アニオン性修飾基が挙げられるがこれらに限定されない。

20

#### 【0063】

用語「疎水性脂質」とは、長鎖飽和及び不飽和脂肪族炭化水素基、及び、1個または複数個の芳香族基、脂環基または複素環基（複数可）で任意選択的に置換されたような基が挙げられるがこれらに限定されない無極性基を有する化合物のことを意味する。好適な例としては、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N - N - ジアルキルアミノ、1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - アミノプロパン、及び、1, 2 - ジアルキル - 3 - アミノプロパンが挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【0064】

用語「カチオン性脂質」及び「アミノ脂質」は、本明細書において同じ意味で用いられ、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の脂肪酸または脂肪族アルキル鎖、及び、pH 滴定可能なアミノ先端基（例えば、アルキルアミノ先端基またはジアルキルアミノ先端基）を有するような脂質及びそれらの塩が挙げられる。カチオン性脂質は通常、カチオン性脂質の  $pK_a$  未満の pH でプロトン化し（すなわち、正に荷電する）、その  $pK_a$  超の pH において実質的に中性である。カチオン性脂質はまた、滴定可能なカチオン性脂質とも呼ばれる。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、プロトン化可能な第三級アミン（例えば、pH 滴定可能な）先端基、 $C_{1-8}$  アルキル鎖（それぞれのアルキル鎖は独立して、0 ~ 3（例えば、0、1、2または3）の二重結合を有する）、及び、先端基とアルキル鎖との間にエーテル、エステルまたはケタール結合部を含む。このようなカチオン性脂質としては、DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、-DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA (DLin-C2K-DMA、XTC2及びC2Kとしても周知)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、-DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA (MC2としても周知)、及び、DLin-M-C3-DMA (MC3としても周知) が挙げられるがこれらに限定されない。

40

#### 【0065】

50

用語「塩」としては、任意のアニオン性またはカチオン性の複合体、例えば、カチオン性脂質と1つまたは複数のアニオンとの間に形成された複合体などが挙げられる。アニオンの非限定例としては、無機アニオン及び有機アニオン、例えば、水素化物、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、オキサレート（例えば、ヘミオキサレート）、リン酸塩、ホスホン酸塩、リン酸水素塩、二水素リン酸塩、酸化物、炭酸塩、重炭酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、窒化物、亜硫酸水素塩、硫化物、亜硫酸塩、重硫酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、硫酸水素塩、ホウ酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、アクリレート、ポリアクリレート、フマル酸塩、マレイン酸塩、イタコン酸塩、グリコール酸塩、グルコン酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩、チグリン酸塩、アスコルビン酸塩、サリチル酸塩、ポリメタクリレート、過塩素酸塩、塩素酸塩、亜塩素酸塩、次亜塩素酸塩、臭素酸塩、次亜臭素酸塩、ヨウ素酸塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、ヒ酸塩、亜ヒ酸塩、クロム酸塩、重クロム酸塩、シアン化物、シアン酸塩、チオシアン酸塩、水酸化物、過酸化物、過マンガン酸塩、及びこれらの混合物が挙げられる。特定の実施形態では、本明細書で開示するカチオン性脂質の塩は、結晶性塩である。

10

#### 【0066】

用語「アルキル」としては、1～24個の炭素原子を含有する、直鎖または分枝鎖の、非環式または環式の、飽和脂肪族炭化水素が挙げられる。代表的な飽和直鎖アルキルとしては、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどが挙げられるがこれらに限定されず、また、飽和分枝鎖アルキルとしては、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチルなどが挙げられるがこれらに限定されない。代表的な飽和環式アルキルとしては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられるがこれらに限定されず、また、不飽和環式アルキルとしては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

20

#### 【0067】

用語「アルケニル」としては、隣接した炭素原子間に少なくとも1つの二重結合を含有する、上で定義したアルキルが挙げられる。アルケニルとしては、シス異性体及びトランス異性体の両方が挙げられる。代表的な直鎖及び分枝鎖のアルケニルとしては、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【0068】

用語「アルキニル」としては、隣接した炭素間に少なくとも1つの三重結合を更に含有する、上で定義した任意のアルキルまたはアルケニルが挙げられる。代表的な直鎖及び分枝鎖のアルキニルとしては、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0069】

用語「アシル」としては、以下で定義するが、結合点の炭素がオキシ基で置換された、任意のアルキル、アルケニルまたはアルキニルが挙げられる。以下、-C(=O)アルキル、-C(=O)アルケニル、及び、-C(=O)アルキニルは、アシル基の非限定例である。

40

#### 【0070】

用語「複素環」としては、飽和、不飽和または芳香族のいずれかである、5～7員環単環式または7～10員環二環式の複素環が挙げられ、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される1または2個のヘテロ原子を含有し、窒素ヘテロ原子及び硫黄ヘテロ原子は任意選択的に酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は任意選択的に四級化されていてもよく、上記の複素環のいずれかがベンゼン環に縮合した二環式の環を含む。複素環は、任意のヘテロ原子または炭素原子を介して結合してもよい。複素環としては、以下で定義するヘテロアリールに加え、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル(p

50

iperidiny l)、ピペリジニル(piperizyny l)、ヒダントイニル、パレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0071】

用語「任意選択的に置換されたアルキル」、「任意選択的に置換されたアルケニル」、「任意選択的に置換されたアルキニル」、「任意選択的に置換されたアシル」及び「任意選択的に置換された複素環」とは、置換される場合、少なくとも1個の水素原子が置換基で置換されることを意味する。オキソ置換基(=O)について言えば、2個の水素原子が置換されている。これに関連し、置換基としては、オキソ、ハロゲン、複素環、-CN、-OR<sup>x</sup>、-NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>、-NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>、-NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>、-C(=O)R<sup>x</sup>、-C(=O)OR<sup>x</sup>、-C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>、-SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>及び-SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>が挙げられるがこれらに限定されず、式中、nは0、1または2であり、R<sup>x</sup>及びR<sup>y</sup>は同一または異なっており、独立して、水素、アルキルまたは複素環であり、アルキル置換基及び複素環置換基のそれぞれは、オキソ、ハロゲン、-OH、-CN、アルキル、-OR<sup>x</sup>、複素環、-NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>、-NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>、-NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>、-C(=O)R<sup>x</sup>、-C(=O)OR<sup>x</sup>、-C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>、-SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>及び-SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>のうちの1個または複数個で更に置換されてもよい。置換基のリストの前に用いる場合、用語「任意選択的に置換された」とは、リストの置換基のそれぞれが、本明細書に記載のとおり任意選択的に置換され得るということを意味する。

#### 【0072】

用語「ハロゲン」としては、フルオロ、クロロ、ブロモ及びヨードが挙げられる。

#### 【0073】

用語「融合」とは、脂質粒子が細胞の膜と融合する能力のことを意味する。膜は、原形質膜、または、オルガネラ(例えば、エンドソーム、核など)を取り囲む膜のいずれかであってもよい。

#### 【0074】

本明細書で使用する場合、用語「水溶液」とは、水を全体的にまたは部分的に含む組成物のことを意味する。

#### 【0075】

本明細書で使用する場合、用語「有機脂質溶液」とは、脂質を有する有機溶媒を全体的にまたは部分的に含む組成物のことを意味する。

#### 【0076】

脂質粒子について記載するのに用いる場合、用語「電子高密度コア」とは、クライオ透過型電子顕微鏡(「クライオTEM」)を用いて画像化する際における、脂質粒子内部の暗い外観のことを意味する。一部の脂質粒子は、電子高密度コアを有し脂質二重層構造を欠いている。一部の脂質粒子は、電子高密度コアを有し、脂質二重層構造を欠き、また逆六方相構造または立方相構造を有している。理論に束縛されるものではないが、非二重層の脂質パッキングが、水及び核酸をその内部に含有する脂質シリンダーの三次元ネットワークをもたらす、すなわち、水性チャンネルに浸透した脂質液滴が実質的に核酸を収容していると考えられている。

#### 【0077】

本明細書で使用する場合、「遠位部位」とは物理的に離れた部位のことを意味し、隣接した毛細血管床に限定されず、生体内の至るところに広く分布した部位を包含する。

#### 【0078】

核酸-脂質粒子と関連する場合、「血清安定性」とは、遊離DNAまたは遊離RNAを有意に分解する血清アッセイまたはヌクレアーゼアッセイに曝露した後に、粒子が有意には分解されないということを意味する。好適なアッセイとしては、例えば、標準的な血清アッセイ、DNaseアッセイまたはRNaseアッセイが挙げられる。

## 【0079】

本明細書で使用する場合、「全身送達」とは、s i R N Aなどの活性剤を生体内に広く分布させることにつながる、脂質粒子の送達のことを意味する。一部の投与手法を用いると、特定の薬剤の全身送達をもたらされ得る（その他の薬剤ではもたらされない）。全身送達とは、有用量の、好ましくは治療量の薬剤が、体のほとんどの部位に作用することを意味する。広く体内に分布させるためには通常、投与部位から遠く離れた疾患部位に届く前に、薬剤が急速に分解または消失（初回通過臓器（肝臓、肺など）または急速で非特異的な細胞への結合などによる）しないような血中寿命が必要となる。例えば、静脈内、皮下及び腹腔内を含む当該技術分野において周知の任意の手段を用いて、脂質粒子の全身送達を行ってもよい。好ましい実施形態では、脂質粒子の全身送達は、静脈内送達により行われる。

10

## 【0080】

本明細書で使用する場合、「局所送達」とは、s i R N Aなどの活性剤を、生体内の標的部位へと直接送達することを意味する。例えば、疾患部位、その他標的部位、または、標的臓器（例えば、肝臓、心臓、脾臓、腎臓など）へと直接注射することにより、薬剤を局所送達してもよい。

## 【0081】

本明細書で使用する場合、用語「ウイルス粒子量」とは、血液などの体液中に存在するウイルス粒子（例えば、H B V及び/またはH D V）数の測定値のことを意味する。例えば、粒子量は、ミリリットル（例えば、血液）あたりのウイルス粒子の数で表してもよい。核酸増幅ベースの試験法に加え、非核酸ベースの試験法を用いて、粒子量試験を実施してもよい（例えば、Puren et al., The Journal of Infectious Diseases, 201: S27-36 (2010)を参照のこと）。

20

## 【0082】

用語「哺乳動物」とは、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ハムスター、モルモット、ウサギ、家畜類などの任意の哺乳動物種のことを意味する。

表 A

【表 A - 1】

名 称	二重鎖配列	I C 5 0 ( n M)
1 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> <div>3´</div> <div> <u>U U</u> U C C A u A C A A C G G g C A A A C A </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号 : 1)</div> <div>1 .</div> </div> <div> <div>5´ (配 列 番 号 : 2)</div> <div>4 3</div> </div>
2 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> <div>3´</div> <div> U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号 : 3)</div> <div>0 .</div> </div> <div> <div>5´ (配 列 番 号 : 4)</div> <div>3 7</div> </div>
3 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> <div>3´</div> <div> <u>U U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号 : 5)</div> <div>0 .</div> </div> <div> <div>5´ (配 列 番 号 : 6)</div> <div>0 6</div> </div>
4 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> <div>3´</div> <div> <u>U U</u> C g A G U C A A A u G A U C A C G G U </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号 : 7)</div> <div>0 .</div> </div> <div> <div>5´ (配 列 番 号 : 8)</div> <div>3 1</div> </div>
5 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> <div>3´</div> <div> U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号 : 9)</div> <div>0 .</div> </div> <div> <div>5´ (配 列 番 号 : 1 0)</div> <div>0 6</div> </div>
6 m	<div> <div>5´</div> <div> <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> </div> </div>	<div> <div>3´ (配 列 番 号</div> <div>0 .</div> </div> <div> <div>列 番 号</div> <div>0 5</div> </div>

10

20

30

40

【表 A - 2】

名 称	二重鎖配列	I C 5 0 ( n M)
	3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C : 11) 5' (配 列 番 号 : 12)	
7 5' m 3'	<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 U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U : 13) 0 . 5' (配 0 6 列 番 号 : 14)	
8 5' m 3'	<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 U</u> C G A G u C A A A U G A U C A C G G U : 15) 0 . 5' (配 2 4 列 番 号 : 16)	
9 5' m 3'	<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 U</u> u C C A u A C A A C G G g C A A A C A : 17) 0 . 5' (配 1 3 列 番 号 : 18)	
1 5' 0 3' m	<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 U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U : 19) 0 . 5' (配 3 4 列 番 号 : 20)	
1 5' 1 3' m	<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 C g G C U A g G U A U g A C G C C U U : 21) 0 . 5' (配 3 1	

10

20

30

40

【表 A - 3】

名 称	二重鎖配列	I C 5 0 ( n M)
	列 番 号 : 2 2)	
1 2 m	5' <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> 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U	3' (配 列 番 号 : 2 3) 0 . 5' (配 1 6 列 番 号 : 2 4)
1 3 m	5' <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' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U	3' (配 列 番 号 : 2 5) 0 . 5' (配 2 列 番 号 : 2 6)
1 4 m	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' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U	3' (配 列 番 号 : 2 7) 0 . 5' (配 1 6 列 番 号 : 2 8)
1 5 m	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>U</u> 3' <u>U</u> <u>U</u> G A C C g A G U C A A A U G A U C A C	3' (配 列 番 号 : 2 9) 0 . 5' (配 1 7 列 番 号 : 3 0)
小文字 = 2' O-メチル修飾 下線 = UNA部分		

10

20

30

40

## 【0083】

オリゴヌクレオチド（表Bに記載のセンスRNA鎖及びアンチセンスRNA鎖など）は、標的ポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするか、または、標的ポリヌクレオチド配列に対して相補的である。本明細書で使用する場合、用語「特異的にハイブリダイズ可能」及び「相補的」とは、DNA標的またはRNA標的とオリゴヌクレオチドとの間に安定で特異的な結合が生じるように、十分な程度の相補性があることを意味する。特

50

異的にハイブリダイズ可能となるために、オリゴヌクレオチドが、その標的核酸配列に対して100%相補的である必要はないということを理解されたい。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドが標的配列に結合する際に、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能であり、標的配列の通常作用に干渉して、その標的配列の発現の有効性を低下させ、また、アッセイを実施する条件下において、特異的結合が望まれる条件下で、すなわち、インビボアッセイまたは治療処置の場合、または、インビトロアッセイの場合のような生理学的条件下で、非標的配列に対するオリゴヌクレオチドの非特異的結合を避けるほどの、十分な程度の相補性がある。それゆえ、オリゴヌクレオチドが標的とするまたは特異的にハイブリダイズする、遺伝子またはmRNA配列の領域と比較して、オリゴヌクレオチドには、1、2、3またはそれ以上の塩基置換が含まれていてもよい。

表 B

【表 B - 1】

名称	センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')
1 m	<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> (配列番号: 1)	A C A A A C g G G C A A C A u A C C U <u>U U</u> (配列番号: 2)
2 m	<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> (配列番号: 3)	U G G C A C U A G u A A A C U G A g C U U (配列番号: 4)
3 m	<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> (配列番号: 5)	U G A A G C G A A G U g C A C A C g G <u>U U</u> (配列番号: 6)
4 m	<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> (配列番号: 7)	U G G C A C U A G u A A A C U G A g C <u>U U</u> (配列番号: 8)
5 m	<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> (配列番号: 9)	U G A A G C G A A G U g C A C A C g G <u>U U</u> (配列番号: 10)
6 m	<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> (配列番号: 11)	C A C U A g U A A A C U g A g C C A G U U (配列番号: 12)
7 m	<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> (配列番号: 13)	U G A A G C G A A G U g C A C A C g G <u>U U</u> (配列番号: 14)
8 m	<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> (配列番号: 15)	U G G C A C U A G U A A A C u G A G C <u>U U</u> (配列番号: 16)
9 m	<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> (配列番号: 17)	A C A A A C g G G C A A C A u A C C u <u>U U</u> (配列番号: 18)
10 m	<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> (配列番号: 19)	U U C C G C A g U A U G g A U C G g C <u>U U</u> (配列番号: 20)
11 m	<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> (配列番号: 21)	U U C C G C A g U A U G g A U C G g C U U (配列番号: 22)
12 m	<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> (配列番号: 23)	U U C C G C A g U A U G g A U C G g C U U (配列番号: 24)
13 m	<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> (配列番号: 25)	U U C C G C A g U A U G g A U C G g C <u>U U</u> (配列番号: 26)

10

20

30

40



【表 B - 2】

1 4 m	<u>G C u C A g U U U A C u A g U</u> G C C A U U (配列番号：2 7)	U G G C A C U A G U A A A C u G A G C U U (配列番号：2 8)
1 5 m	<u>C u g G C u C A G U U u A C U</u> A G U G U U (配列番号：2 9)	C A C U A G U A A A C U G A g C C A G U U (配列番号：3 0)
小文字 = 2' オーメチル修飾		
下線 = UNA部分		

## 【0084】

s i R N A 分子の生成

s i R N A は、例えば、1つまたは複数の単離低分子干渉RNA ( s i R N A ) 二重鎖、より長い二本鎖RNA ( d s R N A )、または、DNA プラスミド内の転写カセットから転写した s i R N A もしくは d s R N A を含むいくつかの形態で提供することができる。一部の実施形態では、酵素的にまたは部分的 / 全面的な有機合成により、s i R N A を調製してもよく、また、酵素的にまたは有機合成により、修飾リボヌクレオチドをインビトロで導入してもよい。特定の例においては、それぞれの鎖を化学的に調製する。RNA 分子を合成するための方法は当技術分野において周知であり、例えば、Verma and Eckstein ( 1998 ) に記載の化学合成法、または、本明細書に記載の方法が挙げられる。

## 【0085】

RNA を単離するための方法、RNA を合成するための方法、核酸をハイブリダイズするための方法、cDNA ライブラリを作製及びスクリーニングするための方法、及び、PCR を行うための方法は、当該技術分野において周知である ( ( 例えば、Gubler and Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra を参照のこと)、PCR 法については ( 米国特許番号 4,683,195 及び 4,683,202 ; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications ( Innis et al., eds, 1990 ) を参照のこと) )。発現ライブラリもまた当業者に周知である。一般的な方法を開示する別の基本的なテキストとしては、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); 及び、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994) が挙げられる。これら参照文献の開示内容は、あらゆる目的においてその内容全体が参照として本明細書に組み込まれる。

## 【0086】

通常、s i R N A は化学合成される。当該技術分野において周知の様々な手法、例えば、Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); 及び、Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997) に記載されているような手法のいずれかを用いて、s i R N A 分子を含むオリゴヌクレオチドを合成してもよい。オリゴヌクレオチドの合成においては、一般的な核酸保護基及び核酸カップリング基 ( 例えば、5' 末端にジメトキシトリチル、また 3' 末端にホスホラミダイト ) を利用する。非限定例として、0.2 μmol スケールのプロトコルを用いた Applied Biosystems 製の合成装置上で、小規模の合成を行ってもよい。あるいは、Protogen ( Palo Alto, CA ) 製の 96 ウェルプレート合成装置上で、0.2 μmol

10

20

30

40

50

スケールの合成を行ってもよい。しかしながら、より大規模またはより小規模な合成もまた本範囲に含まれる。オリゴヌクレオチド合成用の好適な試薬、RNAの脱保護方法、及び、RNAの精製方法については、当業者に周知である。

#### 【0087】

2つの異なるオリゴヌクレオチド（一方のオリゴヌクレオチドはsiRNAのセンス鎖を含み、もう一方のオリゴヌクレオチドはsiRNAのアンチセンス鎖を含む）から、siRNA分子をアセンブルしてもよい。例えば、それぞれの鎖を別々に合成し、合成及び／または脱保護に続いて、ハイブリダイゼーションまたはライゲーションを行うことで互いに結合させてもよい。

#### 【0088】

治療用核酸を収容する担体系

脂質粒子

脂質粒子は、1種または複数種のsiRNA（例えば、表Aに記載のsiRNA分子）、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び、粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質を含んでいてもよい。一部の実施形態では、siRNA分子は、脂質粒子内のsiRNA分子が水溶液中においてヌクレアーゼによる分解に耐性を示すように、脂質粒子の脂質部分の内部に完全に封入される。その他の実施形態では、本明細書に記載の脂質粒子は実質的に、ヒトなどの哺乳動物に対して非毒性である。脂質粒子は通常、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、または、約70～約90nmの平均粒径を有する。特定の実施形態では、脂質粒子は、約30nm～約150nmの中央粒径を有する。脂質粒子はまた通常、約1：1～約100：1、約1：1～約50：1、約2：1～約25：1、約3：1～約20：1、約5：1～約15：1、または、約5：1～約10：1の脂質：核酸比率（例えば、脂質：siRNA比率）（重量／重量比率）を有する。特定の実施形態では、核酸-脂質粒子は、約5：1～約15：1の脂質：siRNA重量比率を有する。

#### 【0089】

脂質粒子としては、1種または複数種のsiRNA分子（例えば、表Aに記載のsiRNA分子）、カチオン性脂質（例えば、本明細書に記載する1種または複数種の式I～IIIのカチオン性脂質またはその塩）、非カチオン性脂質（例えば、1種または複数種のリン脂質及びコレステロールの混合物）、及び、粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質（例えば、1種または複数種のPEG-脂質コンジュゲート）を含む、血清安定性の核酸-脂質粒子が挙げられる。脂質粒子は、本明細書に記載の遺伝子のうちの1種または複数種を標的とする、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種またはそれ以上のsiRNA分子（例えば、表Aに記載のsiRNA分子）を含んでいてもよい。核酸-脂質粒子及びそれらの調製方法については、例えば、米国特許番号5,753,613、5,785,992、5,705,385、5,976,567、5,981,501、6,110,745及び6,320,017、ならびに、PCT公開番号WO96/40964に記載されている（それら開示内容全体はそれぞれ、あらゆる目的において本明細書に参照として組み込まれる）。

#### 【0090】

核酸-脂質粒子において、1種または複数種のsiRNA分子（例えば、表Aに記載のsiRNA分子）は、粒子の脂質部分の内部に完全に封入されてもよく、それにより、siRNAはヌクレアーゼ分解から保護される。特定の例においては、核酸-脂質粒子内のsiRNAは、粒子を、37で少なくとも約20、30、45または60分間、ヌクレアーゼに曝露した後、実質的に分解されない。特定のその他の例においては、核酸-脂質粒子内のsiRNAは、粒子を、37で少なくとも約30、45もしくは60分間、または、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34もしくは36時間、血清中でインキュベートした後、実質的に分解されない。その他の実施形態では、siRNAは、粒子の脂

10

20

30

40

50

質部分と複合体を形成する。本製剤における利点の1つは、核酸-脂質粒子組成物が実質的に、ヒトなどの哺乳動物に対して非毒性であるという点である。

【0091】

用語「完全に封入される」とは、遊離DNAまたは遊離RNAを有意に分解する血清アッセイまたはヌクレアーゼアッセイに曝露した後に、核酸-脂質粒子内のsiRNA（例えば、表Aに記載のsiRNA分子）が有意には分解されないことを意味する。完全に封入された系では、通常100%の遊離siRNAが分解される治療薬中において、粒子内の約25%未満のsiRNAしか分解されないことが好ましく、約10%未満がより好ましく、粒子内の約5%未満のsiRNAしか分解されないことが最も好ましい。「完全に封入される」とはまた、核酸-脂質粒子が血清安定性であること、すなわち、インビボ投与時に核酸-脂質粒子が、その構成成分へと急速には分解しないことを意味する。

10

【0092】

核酸に関しては、核酸と結合すると高い蛍光を示す色素を用いた、膜不透過性蛍光色素排除アッセイを行うことにより、完全な封入を測定することができる。プラスミドDNA、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、及び/または、一本鎖リボヌクレオチドもしくは二本鎖リボヌクレオチドの定量測定を行うのに、OliGreen（登録商標）及びRibogreen（登録商標）（Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA）などの特定の色素が利用可能である。リボソーム製剤に色素を加えて得られた蛍光を測定し、その蛍光を、少量の非イオン性界面活性剤を加えた際に観測される蛍光と比較することによって、封入を測定する。界面活性剤が介在するリボソーム二重層の崩壊により封入核酸が放出されて、膜不透過性色素とその核酸が相互作用するようになる。 $E = (I_o - I) / I_o$ （式中、I及びI<sub>o</sub>は、界面活性剤を加える前後の蛍光強度を示す）を用いて、核酸封入を算出することができる（Wheeler et al., Gene Ther., 6:271-281（1999）を参照のこと）。

20

【0093】

一部の例においては、核酸-脂質粒子組成物は、約30%～約100%、約40%～約100%、約50%～約100%、約60%～約100%、約70%～約100%、約80%～約100%、約90%～約100%、約30%～約95%、約40%～約95%、約50%～約95%、約60%～約95%、約70%～約95%、約80%～約95%、約85%～約95%、約90%～約95%、約30%～約90%、約40%～約90%、約50%～約90%、約60%～約90%、約70%～約90%、約80%～約90%、または、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）の粒子がその内部にsiRNAを封入するように、粒子の脂質部分の内部に完全に封入されたsiRNA分子を含む。

30

【0094】

その他の例においては、核酸-脂質粒子組成物は、約30%～約100%、約40%～約100%、約50%～約100%、約60%～約100%、約70%～約100%、約80%～約100%、約90%～約100%、約30%～約95%、約40%～約95%、約50%～約95%、約60%～約95%、約70%～約95%、約80%～約95%、約85%～約95%、約90%～約95%、約30%～約90%、約40%～約90%、約50%～約90%、約60%～約90%、約70%～約90%、約80%～約90%、または、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）の入力siRNAが粒子の内部に封入されるように、粒子の脂質部分の内部に完全に封入されたsiRNAを含む。

40

【0095】

脂質粒子の使用目的に応じて構成成分比率を変化させてもよく、また、例えば、エンド

50

ソーム放出パラメータ（ERP）アッセイを用いて、特定の製剤の送達効率を測定してもよい。

# 【0096】

## カチオン性脂質

様々なカチオン性脂質またはそれらの塩のいずれかを、単独で、または、1種または複数種のその他カチオン性脂質種または非カチオン性脂質種との混合でのいずれかで、脂質粒子に用いてもよい。カチオン性脂質としては、その（R）及び／または（S）エナンチオマーが挙げられる。

# 【0097】

一態様では、カチオン性脂質はジアルキル脂質である。例えば、ジアルキル脂質としては、2本の飽和または不飽和アルキル鎖を含む脂質を挙げてもよく、そのアルキル鎖のそれぞれは、置換または非置換であってもよい。特定の実施形態では、2本のアルキル鎖のそれぞれは、少なくとも例えば、8個の炭素原子、10個の炭素原子、12個の炭素原子、14個の炭素原子、16個の炭素原子、18個の炭素原子、20個の炭素原子、22個の炭素原子、または、24個の炭素原子を含む。

10

# 【0098】

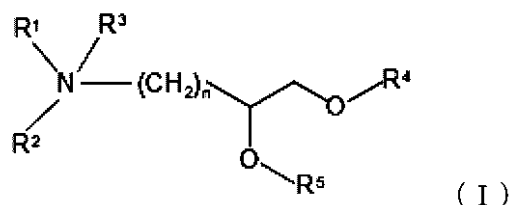
一態様では、カチオン性脂質はトリアルキル脂質である。例えば、トリアルキル脂質としては、3本の飽和または不飽和アルキル鎖を含む脂質を挙げてもよく、そのアルキル鎖のそれぞれは、置換または非置換であってもよい。特定の実施形態では、3本のアルキル鎖のそれぞれは、少なくとも例えば、8個の炭素原子、10個の炭素原子、12個の炭素原子、14個の炭素原子、16個の炭素原子、18個の炭素原子、20個の炭素原子、22個の炭素原子、または、24個の炭素原子を含む。

20

# 【0099】

一態様では、以下の構造を有する式Iのカチオン性脂質、

## 【化6】



30

またはその塩が有用であり、式中、

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、同一または別々のいずれかであり、独立して、水素（H）または任意選択的に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニルもしくは C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルキニルであり、または、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は結合して、4～6個の炭素原子、及び、窒素（N）、酸素（O）からなる群から選択される1または2個のヘテロ原子、ならびにこれらの組み合わせの任意選択的に置換された複素環を形成してもよく、

R<sup>3</sup> は、不在、または、水素（H）もしくは第四級アミンをもたらす C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキルのいずれかであり、

R<sup>4</sup> 及び R<sup>5</sup> は、同一または別々のいずれかであり、独立して、任意選択的に置換された C<sub>10</sub> - C<sub>24</sub> アルキル、C<sub>10</sub> - C<sub>24</sub> アルケニル、C<sub>10</sub> - C<sub>24</sub> アルキニルまたは C<sub>10</sub> - C<sub>24</sub> アシルであり、式中、R<sup>4</sup> 及び R<sup>5</sup> のうち少なくとも1つは、少なくとも2つの不飽和部位を含み、

40

n は 0、1、2、3 または 4 である。

# 【0100】

一部の実施形態では、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は独立して、任意選択的に置換された C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> アルケニルまたは C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> アルキニルである。一つの好ましい実施形態では、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、両方ともメチル基である。その他の好ましい実施形態では、n は、1 または 2 である。その他の実施形態では、R<sup>3</sup> は、pH がカチオン性脂質の pK<sub>a</sub> 超である場合、不在であり、また R<sup>3</sup> は、pH がカチオン性脂質の pK<sub>a</sub> 未満である場

50

合（アミノ先端基がプロトン化されるような）、水素である。代替実施形態では、 $R^3$ は、第四級アミンをもたらす、任意選択的に置換された $C_{1-4}$ アルキルである。更なる実施形態では、 $R^4$ 及び $R^5$ は独立して、任意選択的に置換された $C_{12-20}$ または $C_{14-22}$ アルキル、 $C_{12-20}$ または $C_{14-22}$ アルケニル、 $C_{12-20}$ または $C_{14-22}$ アルキニル、または、 $C_{12-20}$ または $C_{14-22}$ アシルであり、式中、 $R^4$ 及び $R^5$ のうち少なくとも1つは、少なくとも2つの不飽和部位を含む。

#### 【0101】

特定の実施形態では、 $R^4$ 及び $R^5$ は、ドデカジエニル部分、テトラデカジエニル部分、ヘキサデカジエニル部分、オクタデカジエニル部分、イコサジエニル部分、ドデカトリエニル部分、テトラデカトリエニル部分、ヘキサデカトリエニル部分、オクタデカトリエニル部分、イコサトリエニル部分、アラキドニル部分、及び、ドコサヘキサエノイル部分、ならびに、それらのアシル誘導体（例えば、リノレオイル、リノレノイル、 $\gamma$ -リノレノイルなど）からなる群から独立して選択される。一部の例においては、 $R^4$ 及び $R^5$ のうちの一方は、分枝鎖アルキル基（例えば、フィタニル部分）、または、そのアシル誘導体（例えば、フィタノイル部分）を含む。特定の例においては、オクタデカジエニル部分は、リノレイル部分である。特定のその他の例においては、オクタデカトリエニル部分は、リノレニル部分または $\gamma$ -リノレニル部分である。特定の実施形態では、 $R^4$ 及び $R^5$ は両方とも、リノレイル部分、リノレニル部分または $\gamma$ -リノレニル部分である。特定の実施形態では、式Iのカチオン性脂質は、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLiNDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLeNDMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-(N,N-ジメチル)-ブチル-4-アミン(C2-DLiNDMA)、1,2-ジリノレオイルオキシ-(N,N-ジメチル)-ブチル-4-アミン(C2-DLiNDAP)、またはこれらの混合物である。

#### 【0102】

一部の実施形態では、式Iのカチオン性脂質は、1つまたは複数のアニオンと塩（好ましくは、結晶性塩）を形成する。1つの特定の実施形態では、式Iのカチオン性脂質は、そのオキサラート（例えば、ヘミオキサラート）塩であり、好ましくは、結晶性塩である。

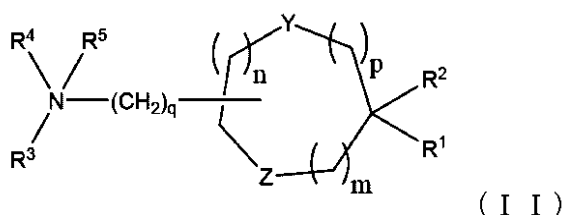
#### 【0103】

DLiNDMA及びDLeNDMAなどのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、米国特許公開番号20060083780に記載されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。C2-DLiNDMA及びC2-DLiNDAPなどのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、国際特許出願番号WO2011/000106に記載されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0104】

別の態様では、以下の構造を有する式IIのカチオン性脂質（またはその塩）、

#### 【化7】



が有用であり、

式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、同一または別々のいずれかであり、独立して、任意選択的に置換された $C_{12-24}$ アルキル、 $C_{12-24}$ アルケニル、 $C_{12-24}$ アルキニル、または、 $C_{12-24}$ アシルであり、 $R^3$ 及び $R^4$ は、同一または別々のいずれかで

あり、独立して、任意選択的に置換された  $C_1 - C_6$  アルキル、 $C_2 - C_6$  アルケニルまたは  $C_2 - C_6$  アルキニルであり、または、 $R^3$  及び  $R^4$  は結合して、4 ~ 6 個の炭素原子、ならびに、窒素及び酸素から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子の任意選択的に置換された複素環を形成してもよく、 $R^5$  は、不在、または、水素 (H) もしくは第四級アミンをもたらす  $C_1 - C_6$  アルキルのいずれかであり、m、n 及び p は、同一または別々のいずれかであり、m、n 及び p が同時に 0 ではない場合、独立して、0、1 または 2 のいずれかであり、q は 0、1、2、3 または 4 であり、Y 及び Z は、同一または別々のいずれかであり、独立して、O、S、または NH である。好ましい実施形態では、q は 2 である。

#### 【0105】

一部の実施形態では、式 I I のカチオン性脂質は、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C2 - DMA、「XTC2」または「C2K」)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C3 - DMA、「C3K」)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - (4 - ジメチルアミノブチル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - C4 - DMA、「C4K」)、2, 2 - ジリノレイル - 5 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキサソ (DLin - K6 - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - N - メチルペピアジノ - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - MPZ)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - DMA)、2, 2 - ジオレオイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DO - K - DMA)、2, 2 - ジステアロイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DS - K - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - N - モルホリノ - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K - MA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - トリメチルアミノ - [1, 3] - ジオキソランクロリド (DLin - K - TMA.Cl)、2, 2 - ジリノレイル - 4, 5 - ビス (ジメチルアミノメチル) - [1, 3] - ジオキソラン (DLin - K<sup>2</sup> - DMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - メチルピペラジン - [1, 3] - ジオキソラン (D - Lin - K - N - メチルピペラジン)、またはこれらの混合物である。一実施形態では、式 I I のカチオン性脂質は、DLin - K - C2 - DMA である。

#### 【0106】

一部の実施形態では、式 I I のカチオン性脂質は、1 つまたは複数のアニオンと塩 (好ましくは、結晶性塩) を形成する。1 つの特定の実施形態では、式 I I のカチオン性脂質は、そのオキサート (例えば、ヘミオキサート) 塩であり、好ましくは、結晶性塩である。

#### 【0107】

DLin - K - DMA などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、PCT 公開番号 WO 09 / 086558 に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。DLin - K - C2 - DMA、DLin - K - C3 - DMA、DLin - K - C4 - DMA、DLin - K6 - DMA、DLin - K - MPZ、DO - K - DMA、DS - K - DMA、DLin - K - MA、DLin - K - TMA.Cl、DLin - K<sup>2</sup> - DMA 及び D - Lin - K - N - メチルピペラジンなどのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」と題された PCT 出願番号 PCT / US 2009 / 060251 (2009 年 10 月 9 日出願) に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0108】

更なる態様では、以下の構造を有する式 I I I のカチオン性脂質、

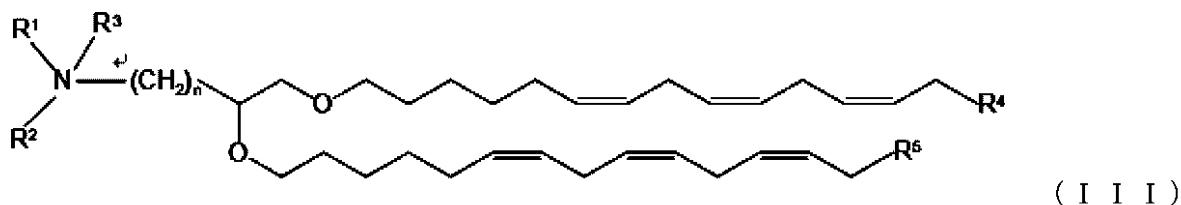
10

20

30

40

## 【化 8】



またはその塩が有用であり、式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、同一または別々のいずれかであり、独立して、任意選択的に置換された  $C_1 - C_6$  アルキル、 $C_2 - C_6$  アルケニルまたは  $C_2 - C_6$  アルキニルであり、または、 $R^1$  及び  $R^2$  は結合して、4 ~ 6 個の炭素原子、及び、窒素 (N)、酸素 (O) からなる群から選択される 1 または 2 個のヘテロ原子、ならびにこれらの組み合わせの任意選択的に置換された複素環を形成してもよく、 $R^3$  は、不在、または、水素 (H) もしくは第四級アミンをもたらす  $C_1 - C_6$  アルキルのいずれかであり、 $R^4$  及び  $R^5$  は、不在または存在のいずれかであり、存在する場合、同一または別々のいずれかであり、独立して、任意選択的に置換された  $C_1 - C_{10}$  アルキルまたは  $C_2 - C_{10}$  アルケニルであり、 $n$  は 0、1、2、3 または 4 である。

## 【0109】

一部の実施形態では、 $R^1$  及び  $R^2$  は独立して、任意選択的に置換された  $C_1 - C_4$  アルキル、 $C_2 - C_4$  アルケニルまたは  $C_2 - C_4$  アルキニルである。好ましい実施形態では、 $R^1$  及び  $R^2$  は、両方ともメチル基である。別の好ましい実施形態では、 $R^4$  及び  $R^5$  は、両方ともブチル基である。更に別の好ましい実施形態では、 $n$  は 1 である。その他の実施形態では、 $R^3$  は、pH がカチオン性脂質の  $pK_a$  超である場合、不在であり、また  $R^3$  は、pH がカチオン性脂質の  $pK_a$  未満である場合 (アミノ先端基がプロトン化されるような)、水素である。代替実施形態では、 $R^3$  は、第四級アミンをもたらす、任意選択的に置換された  $C_1 - C_4$  アルキルである。更なる実施形態では、 $R^4$  及び  $R^5$  は独立して、任意選択的に置換された  $C_2 - C_6$  または  $C_2 - C_4$  アルキル、または、 $C_2 - C_6$  または  $C_2 - C_4$  アルケニルである。

## 【0110】

代替実施形態では、式 III のカチオン性脂質は、アミノ先端基とアルキル鎖の一方または両方との間にエステル結合を含む。一部の実施形態では、式 III のカチオン性脂質は、1 つまたは複数のアニオンと塩 (好ましくは、結晶性塩) を形成する。1 つの特定の実施形態では、式 III のカチオン性脂質は、そのオキサレート (例えば、ヘミオキサレート) 塩であり、好ましくは、結晶性塩である。

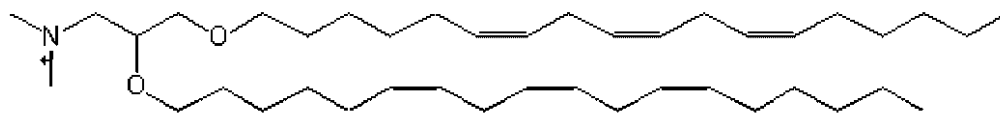
## 【0111】

式 III 中のアルキル鎖のそれぞれは、6 位、9 位及び 12 位のシス二重結合 (すなわち、シス、シス、シス - <sup>6</sup>、<sup>9</sup>、<sup>12</sup>) を含有しているが、代替実施形態では、アルキル鎖の一方または両方におけるこれら二重結合のうちの 1、2 または 3 つは、トランス構造であってもよい。

## 【0112】

特定の実施形態では、式 III のカチオン性脂質は、以下の構造を有する。

## 【化 9】



$\gamma$ -DL enDMA (15)

## 【0113】

-DL enDMA (15) などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合

成については、「Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」と題された米国仮出願番号61/222,462(2009年7月1日出願)に記載されている(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0114】

DLin-M-C3-DMA(「MC3」)などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質(例えば、MC3の特定の類似体)の合成については、「Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics」と題された米国仮出願番号61/185,800(2009年6月10日出願)、及び、「Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids」と題された米国仮出願番号61/287,995(2009年12月18日出願)に記載されている(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0115】

脂質粒子中に含まれていてもよいその他のカチオン性脂質またはその塩の例としては、WO2011/000106(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)に記載されるもののようなカチオン性脂質に加えて、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(DODAC)、1,2-ジオレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DODMA)、1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DSDMA)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)、N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTAP)、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパン-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スペルミン-カルボキシアミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート(DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン(DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-3-オキシブタン-4-オキシ)-1-(シス、シス-9,12-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CLindMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-オキシ)-3'-オキサペントキシ)-3-ジメチル-1-(シス、シス-9',1-2'-オクタデカジエンオキシ)プロパン(CpLindMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン(DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン(DLincarbDAP)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン(DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-S-DMA)、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩(DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLin-MPZ)、3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DLinAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)、1,2-ジオレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DO-C-DAP)、1,

10

20

30

40

50



2 - ジミリストレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DMDAP)、1, 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロリド (DOTAP・Cl)、ジリノレイルメチル - 3 - ジメチルアミノプロピオネート (DLin - M - C2 - DMA; DLin - M - K - DMA または DLin - M - DMA としても周知)、及びこれらの混合物などのカチオン性脂質が挙げられるがこれらに限定されない。脂質粒子中に含まれていてもよい別のカチオン性脂質またはその塩については、米国特許公開番号 20090023673 に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0116】

CLinDMA などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、米国特許公開番号 20060240554 に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。DLin - C - DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin - S - DMA、DLin - 2 - DMAP、DLinTMA・Cl、DLinTAP・Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP 及び DLin - EG - DMA などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、PCT 公開番号 WO09/086558 に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。DO - C - DAP、DMDAP、DOTAP・Cl、DLin - M - C2 - DMA などのカチオン性脂質に加えて、別のカチオン性脂質の合成については、「Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids」と題された PCT 出願番号 PCT/US2009/060251 (2009 年 10 月 9 日出願) に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。多数のその他カチオン性脂質及び関連類自体の合成については、米国特許番号 5,208,036、5,264,618、5,279,833、5,283,185、5,753,613 及び 5,785,992、ならびに、PCT 公開番号 WO96/10390 に記載されている (それら開示内容全体はそれぞれ、あらゆる目的において本明細書に参照として組み込まれる)。加えて、多数のカチオン性脂質市販剤、例えば、LIPOFECTIN (登録商標) (Invitrogen から市販されている DOTMA 及び DOPE を含む)、LIPOFECTAMINE (登録商標) (Invitrogen から市販されている DOSPA 及び DOPE を含む)、及び、TRANSFECTAM (登録商標) (Promega Corp. から市販されている DOGS を含む) などを用いてもよい。

#### 【0117】

一部の実施形態では、カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 50 mol % ~ 約 90 mol %、約 50 mol % ~ 約 85 mol %、約 50 mol % ~ 約 80 mol %、約 50 mol % ~ 約 75 mol %、約 50 mol % ~ 約 70 mol %、約 50 mol % ~ 約 65 mol %、約 50 mol % ~ 約 60 mol %、約 55 mol % ~ 約 65 mol %、または、約 55 mol % ~ 約 70 mol % (またはその任意の端数もしくはその中の範囲) を含む。特定の実施形態では、カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 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 % または 65 mol % (またはその任意の端数) を含む。

#### 【0118】

その他の実施形態では、カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 2 mol % ~ 約 60 mol %、約 5 mol % ~ 約 50 mol %、約 10 mol % ~ 約 50 mol %、約 20 mol % ~ 約 50 mol %、約 20 mol % ~ 約 40 mol %、約 30 mol % ~ 約 40 mol %、または、約 40 mol % (またはその任意の端数もしくはその中の範囲) を含む。

#### 【0119】

10

20

30

40

50

脂質粒子に用いるのに好適なカチオン性脂質における別の百分率及び範囲については、PCT公開番号WO09/127060、米国公開出願番号US2011/0071208、PCT公開番号WO2011/000106、及び、米国公開出願番号US2011/0076335に記載されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0120】

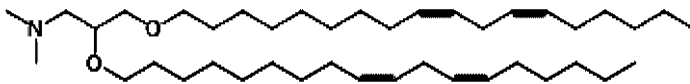
脂質粒子中に存在するカチオン性脂質の百分率は目標量であり、製剤中に存在する実際のカチオン性脂質の量は、例えば、 $\pm 5 \text{ mol } \%$ で変化し得ると理解すべきである。例えば、1つの例示的な脂質粒子製剤において、カチオン性脂質の目標量は $57.1 \text{ mol } \%$ であるが、実際のカチオン性脂質の量は、その他の脂質構成成分からなる配合物の残部として、その目標量の $\pm 5 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 4 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 3 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 2 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 1 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.75 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.5 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.25 \text{ mol } \%$ 、または、 $\pm 0.1 \text{ mol } \%$ であり得る（粒子中に存在する総脂質は合計 $100 \text{ mol } \%$ となるが、当業者は、総 $\text{mol } \%$ が、丸めにより、例えば、 $99.9 \text{ mol } \%$ または $100.1 \text{ mol } \%$ など、 $100 \%$ からわずかにずれ得ることを理解するであろう）。

10

#### 【0121】

脂質粒子に包含させるのに有用なカチオン性脂質の更なる例について、以下に記載する。

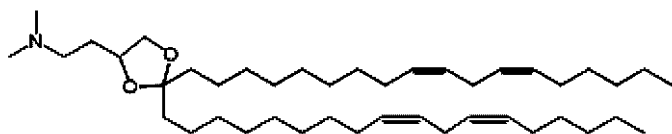
#### 【化10-1】



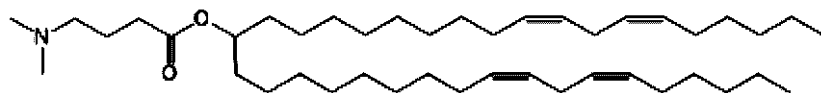
20

## 【化 10 - 2】

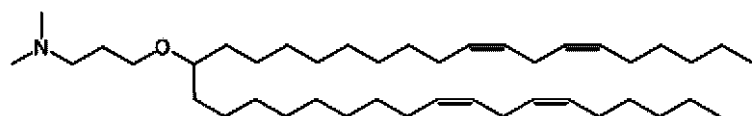
N, N-ジメチル-2, 3-ビス((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル  
オキシ) プロパン-1-アミン (5)



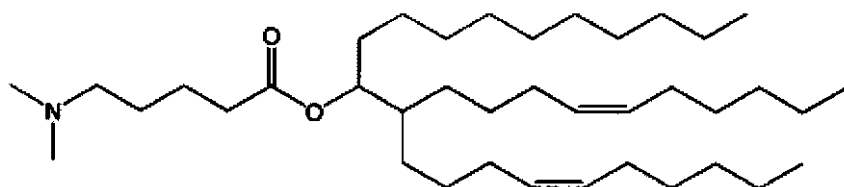
2-(2,2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)-1,3-ジ  
オキソラン-4-イル)-N, N-ジメチルエタンアミン (6)



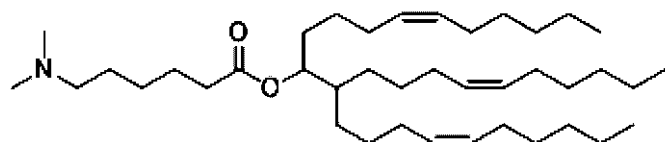
(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラ  
エン-19-イル 4-(ジメチルアミノ) ブタノエート (7)



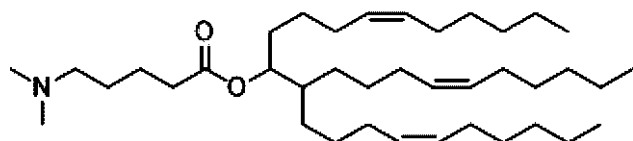
3-((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テ  
トラエン-19-イルオキシ)-N, N-ジメチルプロパン-1-アミン (8)



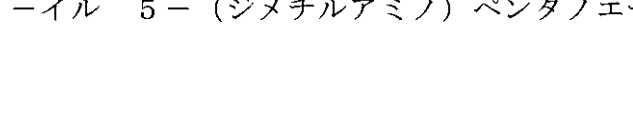
(Z)-12-((Z)-デカ-4-エニル) ドコサ-16-エン-11-イル 5-(  
ジメチルアミノ) ペンタノエート (53)



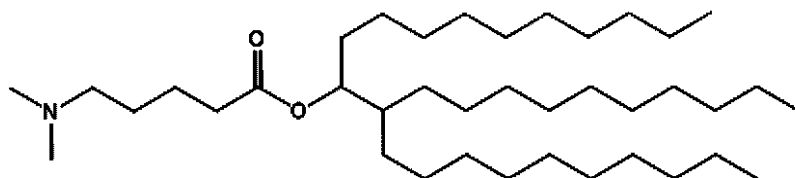
(6Z, 16Z)-12-((Z)-デカ-4-エニル) ドコサ-6, 16-ジエン-1  
1-イル 6-(ジメチルアミノ) ヘキサノエート (11)



(6Z, 16Z)-12-((Z)-デカ-4-エニル) ドコサ-6, 16-ジエン-1  
1-イル 5-(ジメチルアミノ) ペンタノエート (13)



## 【化 10 - 3】



1,2-デシルドコサン-11-イル 5-(ジメチルアミノ)ペンタノエート (14)

## 【0122】

## 非カチオン性脂質

10

脂質粒子に用いる非カチオン性脂質は、安定した複合体を生成可能な、様々な中性非荷電脂質、双性イオン性脂質またはアニオン性脂質のいずれかであってもよい。

## 【0123】

非カチオン性脂質の非限定例としては、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (ESM)、ケファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DPE)、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレオイル - ホスファチジルグリセロール (POPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (DPE - mal)、ジパルミトイル - ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイル - ホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチル - ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル - ホスファチジルエタノールアミン、ジェラドイル - ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、ステアロイルオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、リソホスファチジルコリン、

20

30

## 【0124】

非カチオン性脂質の別の例としては、コレステロール及びその誘導体などのステロールが挙げられる。コレステロール誘導体の非限定例としては、5 - コレスタノール、5 - コプロスタノール、コレステリル - (2' - ヒドロキシ) - エチルエーテル、コレステリル - (4' - ヒドロキシ) - ブチルエーテル、及び、6 - ケトコレスタノールなどの極性類似体、5 - コレスタン、コレステノン、5 - コレスタノン、5 - コレスタノン、及び、コレステリルデカノエートなどの非極性類似体、ならびにこれらの混合物が挙げられる。好ましい実施形態では、コレステロール誘導体は、コレステリル - (4' - ヒドロキシ) - ブチルエーテルなどの極性類似体である。コレステリル - (2' - ヒドロキシ) - エチルエーテルの合成については、PCT公開番号WO09/127060に記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

40

## 【0125】

一部の実施形態では、脂質粒子中に存在する非カチオン性脂質は、1種または複数種のリン脂質及びコレステロールまたはその誘導体の混合物を含むかまたはそれらから構成さ

50

れる。その他の実施形態では、脂質粒子中に存在する非カチオン性脂質は、1種または複数種のリン脂質（例えば、コレステロールフリーの脂質粒子配合物）を含むかまたはそれらから構成される。更にその他の実施形態では、脂質粒子中に存在する非カチオン性脂質は、コレステロールまたはその誘導体（例えば、リン脂質フリーの脂質粒子配合物）を含むかまたはそれらから構成される。

#### 【0126】

用いるのに好適な非カチオン性脂質のその他の例としては、非リン含有脂質、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、アセチルパルミテート、グリセロールリシノレエート、ヘキサデシルステアレート、イソプロピルミリステート、両性アクリルポリマー、トリエタノールアミン・ラウリルサルフェート、アルキル・アリアルサルフェートポリエチルオキシレート化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、セラミド、スフィンゴミエリンなどが挙げられる。

10

#### 【0127】

一部の実施形態では、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約10mol%～約60mol%、約20mol%～約55mol%、約20mol%～約45mol%、約20mol%～約40mol%、約25mol%～約50mol%、約25mol%～約45mol%、約30mol%～約50mol%、約30mol%～約45mol%、約30mol%～約40mol%、約35mol%～約45mol%、約37mol%～約45mol%、または、約35mol%、36mol%、37mol%、38mol%、39mol%、40mol%、41mol%、42mol%、43mol%、44mol%もしくは45mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を含む。

20

#### 【0128】

脂質粒子がリン脂質及びコレステロールまたはコレステロール誘導体の混合物を含有する実施形態では、その混合物は、粒子中に存在する総脂質の最大約40mol%、45mol%、50mol%、55mol%または60mol%を含んでいてもよい。

#### 【0129】

一部の実施形態では、混合物中のリン脂質構成成分は、粒子中に存在する総脂質の約2mol%～約20mol%、約2mol%～約15mol%、約2mol%～約12mol%、約4mol%～約15mol%、または、約4mol%～約10mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を含んでいてもよい。特定の実施形態では、混合物中のリン脂質構成成分は、粒子中に存在する総脂質の約5mol%～約17mol%、約7mol%～約17mol%、約7mol%～約15mol%、約8mol%～約15mol%、または、約8mol%、9mol%、10mol%、11mol%、12mol%、13mol%、14mol%もしくは15mol%（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）を含む。非限定例として、リン脂質及びコレステロールの混合物を含む脂質粒子配合物は、粒子中に存在する総脂質の約7mol%（またはその任意の端数）でDPPCまたはDSPCなどのリン脂質を含んでいてもよく、例えば、コレステロールまたはコレステロール誘導体を含む混合物を、約34mol%（またはその任意の端数）で含んでいてもよい。別の非限定例として、リン脂質及びコレステロールの混合物を含む脂質粒子配合物は、粒子中に存在する総脂質の約7mol%（またはその任意の端数）でDPPCまたはDSPCなどのリン脂質を含んでいてもよく、例えば、コレステロールまたはコレステロール誘導体を含む混合物を、約32mol%（またはその任意の端数）で含んでいてもよい。

30

40

#### 【0130】

更なる例としては、有用な脂質製剤は、約10:1の脂質:薬剤（例えば、siRNA）比率を有する（例えば、9.5:1～11:1、9.9:1～11:1、または、10:1～10.9:1の脂質:薬剤比率）。特定のその他実施形態では、有用な脂質製剤は、約9:1の脂質:薬剤（例えば、siRNA）比率を有する（例えば、9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1、及び、9.8:1を含む、8.5:1～10:1、または8.9:1～10:1、または9:1～9

50

． 9 : 1 の脂質 : 薬物比率 ) 。

【 0 1 3 1 】

その他の実施形態では、混合物中のコレステロール構成成分は、粒子中に存在する総脂質の約 25 mol % ~ 約 45 mol %、約 25 mol % ~ 約 40 mol %、約 30 mol % ~ 約 45 mol %、約 30 mol % ~ 約 40 mol %、約 27 mol % ~ 約 37 mol %、約 25 mol % ~ 約 30 mol %、または、約 35 mol % ~ 約 40 mol % ( またはその任意の端数もしくはその中の範囲 ) を含んでいてもよい。特定の好ましい実施形態では、混合物中のコレステロール構成成分は、粒子中に存在する総脂質の約 25 mol % ~ 約 35 mol %、約 27 mol % ~ 約 35 mol %、約 29 mol % ~ 約 35 mol %、約 30 mol % ~ 約 35 mol %、約 30 mol % ~ 約 34 mol %、約 31 mol % ~ 約 33 mol %、または、約 30 mol %、31 mol %、32 mol %、33 mol %、34 mol % もしくは 35 mol % ( またはその任意の端数もしくはその中の範囲 ) を含む。

10

【 0 1 3 2 】

脂質粒子がリン脂質フリーである実施形態では、コレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する総脂質の最大約 25 mol %、30 mol %、35 mol %、40 mol %、45 mol %、50 mol %、55 mol % または 60 mol % を含んでいてもよい。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、リン脂質フリーの脂質粒子配合物中におけるコレステロールまたはその誘導体は、粒子中に存在する総脂質の約 25 mol % ~ 約 45 mol %、約 25 mol % ~ 約 40 mol %、約 30 mol % ~ 約 45 mol %、約 30 mol % ~ 約 40 mol %、約 31 mol % ~ 約 39 mol %、約 32 mol % ~ 約 38 mol %、約 33 mol % ~ 約 37 mol %、約 35 mol % ~ 約 45 mol %、約 30 mol % ~ 約 35 mol %、約 35 mol % ~ 約 40 mol %、または、約 30 mol %、31 mol %、32 mol %、33 mol %、34 mol %、35 mol %、36 mol %、37 mol %、38 mol %、39 mol % もしくは 40 mol % ( またはその任意の端数もしくはその中の範囲 ) を含んでいてもよい。非限定例として、脂質粒子配合物は、粒子中に存在する総脂質の約 37 mol % ( またはその任意の端数 ) でコレステロールを含んでいてもよい。別の非限定例として、脂質粒子配合物は、粒子中に存在する総脂質の約 35 mol % ( またはその任意の端数 ) でコレステロールを含んでいてもよい。

20

30

【 0 1 3 4 】

その他の実施形態では、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 5 mol % ~ 約 90 mol %、約 10 mol % ~ 約 85 mol %、約 20 mol % ~ 約 80 mol %、約 10 mol % ( 例えば、リン脂質のみ )、または、約 60 mol % ( 例えば、リン脂質及びコレステロールまたはその誘導体 ) ( またはその任意の端数もしくはその中の範囲 ) を含む。

【 0 1 3 5 】

脂質粒子に用いるのに好適な非カチオン性脂質における別の百分率及び範囲については、PCT 公開番号 WO 09 / 127060、米国公開出願番号 US 2011 / 0071208、PCT 公開番号 WO 2011 / 000106、及び、米国公開出願番号 US 2011 / 0076335 に記載されている ( その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる ) 。

40

【 0 1 3 6 】

脂質粒子中に存在する非カチオン性脂質の百分率は目標量であり、製剤中に存在する実際の非カチオン性脂質の量は、例えば、 $\pm 5 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 4 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 3 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 2 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 1 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.75 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.5 \text{ mol } \%$ 、 $\pm 0.25 \text{ mol } \%$ 、または、 $\pm 0.1 \text{ mol } \%$  で変化し得ると理解すべきである。

【 0 1 3 7 】

脂質コンジュゲート

50

カチオン性脂質及び非カチオン性脂質に加え、脂質粒子は、脂質コンジュゲートを更に含んでいてもよい。コンジュゲート脂質は、粒子の凝集を防止するのに有用である。好適なコンジュゲート脂質としては、PEG-脂質コンジュゲート、POZ-脂質コンジュゲート、ATTA-脂質コンジュゲート、カチオン性のポリマー-脂質コンジュゲート(CPL)、及びこれらの混合物が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、粒子は、CPLと共に、PEG-脂質コンジュゲートまたはATTA-脂質コンジュゲートのいずれか一方を含む。

#### 【0138】

好ましい実施形態では、脂質コンジュゲートはPEG脂質である。PEG脂質の例としては、例えば、PCT公開番号WO05/026372に記載のジアルキルオキシプロピルと結合したPEG(PEG-DAA)、例えば、米国特許公開番号20030077829及び2005008689に記載のジアシルグリセロールと結合したPEG(PEG-DAG)、ホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質と結合したPEG(PEG-PE)、例えば、米国特許番号5,885,613に記載のセラミドとコンジュゲートしたPEG、コレステロールまたはその誘導体とコンジュゲートしたPEG、及びこれらの混合物が挙げられるがこれらに限定されない。これら特許文献の開示内容は、あらゆる目的においてその内容全体が参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0139】

用いるのに好適な別のPEG脂質としては、mPEG2000-1,2-ジ-O-アルキル-sn3-カルボモイルグリセリド(PEG-C-DOMG)が挙げられるがこれらに限定されない。PEG-C-DOMGの合成については、PCT公開番号WO09/086558に記載されている(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。更なる別の好適なPEG-脂質コンジュゲートとしては、1-[8'- (1,2-ジミリストイル-3-プロパノキシ)-カルボキシアミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル- -メチル-ポリ(エチレングリコール)(2KPEG-DMG)が挙げられるがこれらに限定されない。2KPEG-DMGの合成については、米国特許番号7,404,969に記載されている(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0140】

PEGは、2個の末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG反復単位からなる直鎖状の水溶性ポリマーである。PEGはその分子量により分類され、例えば、PEG2000は、約2,000ダルトンの平均分子量を有し、またPEG5000は、約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co.及びその他の会社から市販されており、以下、モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-サクシネート(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルサクシネート(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン(MePEG-NH<sub>2</sub>)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート(MePEG-TRES)、モノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル(MePEG-IM)に加え、末端メトキシ基に代えて末端ヒドロキシル基を含有するような化合物(例えば、HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH<sub>2</sub>など)が挙げられるがこれらに限定されない。米国特許番号6,774,180及び7,053,150に記載されるもののようなその他のPEG(例えば、mPEG(20KDa)アミン)もまた、PEG-脂質コンジュゲートを調製するのに有用である。これら特許の開示内容は、あらゆる目的においてその内容全体が参照として本明細書に組み込まれる。加えて、モノメトキシポリエチレングリコール-酢酸(MePEG-CH<sub>2</sub>COOH)は、PEG-脂質コンジュゲート(例えば、PEG-DAAコンジュゲートを含む)を調製するのに特に有用である。

#### 【0141】

本明細書に記載するPEG-脂質コンジュゲートのPEG部分は、約550ダルトン～

約 10,000 ダルトンの範囲の平均分子量を含んでいてもよい。特定の例においては、PEG 部分は、約 750 ダルトン～約 5,000 ダルトン（例えば、約 1,000 ダルトン～約 5,000 ダルトン、約 1,500 ダルトン～約 3,000 ダルトン、約 750 ダルトン～約 3,000 ダルトン、約 750 ダルトン～約 2,000 ダルトンなど）の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、PEG 部分は、約 2,000 ダルトンまたは約 750 ダルトンの平均分子量を有する。

#### 【0142】

特定の例においては、PEG は、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリアル基で任意選択的に置換されてもよい。PEG を、脂質に直接コンジュゲートしてもよく、または、リンカー部分を介して脂質に結合させてもよい。PEG を脂質に結合させるのに使用可能で好適な任意のリンカー部分としては、例えば、非エステル含有リンカー部分及びエステル含有リンカー部分が挙げられる。好ましい実施形態では、リンカー部分は非エステル含有リンカー部分である。本明細書で使用する場合、用語「非エステル含有リンカー部分」とは、カルボン酸エステル結合（-OC(O)-）を含有しないリンカー部分のことを意味する。好適な非エステル含有リンカー部分としては、アミド（-C(O)NH-）、アミノ（-NR-）、カルボニル（-C(O)-）、カルバメート（-NHCO(O)-）、尿素（-NHCO(NH)-）、ジスルフィド（-S-S-）、エーテル（-O-）、サクシニル（-（O）CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-）、スクシンアミジル（-NHCO（O）CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-）に加え、これらの組み合わせ（カルバメートリンカー部分及びアミドリナー部分の両方を含有するリンカーなど）が挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、カルバメートリンカーを用いて、PEG を脂質に結合させる。

10

20

#### 【0143】

その他の実施形態では、エステル含有リンカー部分を用いて、PEG を脂質に結合させる。好適なエステル含有リンカー部分としては、例えば、カーボネート（-OC(O)O-）、サクシノニル、リン酸エステル（-O-（O）POH-O-）、スルホン酸エステル、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0144】

鎖長及び飽和度が様々な種々のアシル鎖基を有するホスファチジルエタノールアミンを PEG にコンジュゲートさせて、脂質コンジュゲートを形成してもよい。このようなホスファチジルエタノールアミンは市販されているか、または、当業者に周知の通常の手法を用いて単離または合成してもよい。C<sub>10</sub>～C<sub>20</sub> の範囲の炭素鎖長の飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸を含有するホスファチジル-エタノールアミンが好ましい。モノ不飽和脂肪酸またはジ不飽和脂肪酸、ならびに、飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸の混合物を含有するホスファチジルエタノールアミンもまた用いてもよい。好適なホスファチジルエタノールアミンとしては、ジミリストイル-ホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイル-ホスファチジルエタノールアミン（DPE）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、及び、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン（DSPE）が挙げられるがこれらに限定されない。

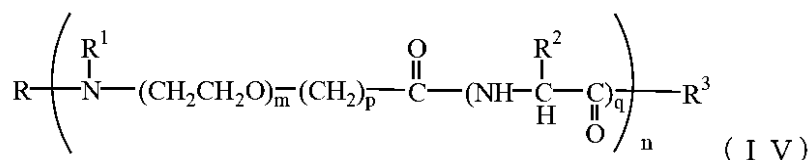
30

#### 【0145】

用語「ATTA」または「ポリアミド」としては、米国特許番号 6,320,017 及び 6,586,559 に記載の化合物が挙げられるがこれらに限定されない（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。これらの化合物としては、式、

40

#### 【化 11】



50



を有する化合物が挙げられ、

式中、R は、水素、アルキル及びアシルからなる群から選択される要素であり、R<sup>1</sup> は、水素及びアルキルからなる群から選択される要素であり、または任意選択的に、R 及び R<sup>1</sup> ならびにそれらが結合する窒素は、アジド部分を形成し、R<sup>2</sup> は、水素、任意選択的に置換されたアルキル、任意選択的に置換されたアリール、及び、アミノ酸の側鎖から選択される基の要素であり、R<sup>3</sup> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、メルカプト、ヒドラジノ、アミノ及び NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> からなる群から選択される要素であり（式中、R<sup>4</sup> 及び R<sup>5</sup> は独立して、水素またはアルキル）、n は 4 ~ 80 であり、m は 2 ~ 6 であり、p は 1 ~ 4 であり、q は 0 または 1 である。その他のポリアミドも可能であることは、当業者には明白である。

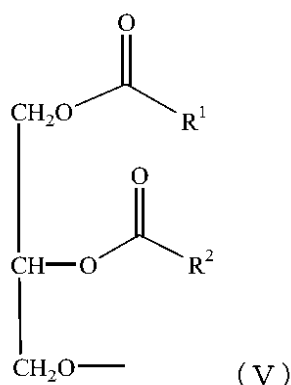
10

#### 【0146】

用語「ジアシルグリセロール」または「DAG」としては、2本の脂肪酸アシル鎖 R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup>（その両方が、独立して、グリセロールの1位及び2位にエステル結合で結合した2 ~ 30個の炭素を有する）を有する化合物が挙げられる。アシル基は、飽和していてもよく、または、様々な不飽和度を有していてもよい。好適なアシル基としては、ラウロイル（C<sub>12</sub>）、ミリストイル（C<sub>14</sub>）、パルミトイル（C<sub>16</sub>）、ステアロイル（C<sub>18</sub>）及びイコソイル（C<sub>20</sub>）が挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は同一、すなわち、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は両方ともミリストイル（すなわち、ジミリストイル）、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は両方ともステアロイル（すなわち、ジステアロイル）などである。ジアシルグリセロールは、以下の一般式を有する。

20

#### 【化12】

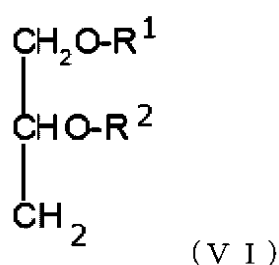


30

#### 【0147】

用語「ジアルキルオキシプロピル」または「DAA」としては、2本のアルキル鎖 R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup>（その両方が、独立して、2 ~ 30個の炭素を有する）を有する化合物が挙げられる。アルキル基は、飽和していてもよく、または、様々な不飽和度を有していてもよい。ジアルキルオキシプロピルは、以下の一般式を有する。

#### 【化13】

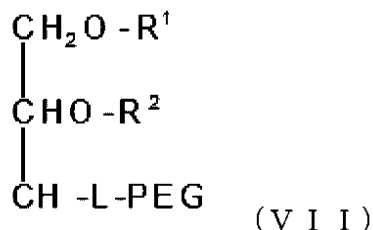


40

#### 【0148】

好ましい実施形態では、PEG-脂質は、以下の式、

## 【化 1 4】



を有する PEG-DAA コンジュゲートであり、

式中、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は独立して選択され、約 10 ~ 約 22 個の炭素原子を有する長鎖アルキル基であり、PEG はポリエチレングリコールであり、L は、上記のとおり、非エステル含有リンカー部分またはエステル含有リンカー部分である。長鎖アルキル基は、飽和または不飽和であってもよい。好適なアルキル基としては、デシル ( $\text{C}_{10}$ )、ラウリル ( $\text{C}_{12}$ )、ミリスチル ( $\text{C}_{14}$ )、パルミチル ( $\text{C}_{16}$ )、ステアリル ( $\text{C}_{18}$ ) 及びイコシル ( $\text{C}_{20}$ ) が挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は同一、すなわち、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は両方ともミリスチル (すなわち、ジミリスチル)、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は両方ともステアリル (すなわち、ジステアリル) などである。

## 【0149】

上記の式 VII において、PEG は、約 550 ダルトン ~ 約 10,000 ダルトンの範囲の平均分子量を有する。特定の例においては、PEG は、約 750 ダルトン ~ 約 5,000 ダルトン (例えば、約 1,000 ダルトン ~ 約 5,000 ダルトン、約 1,500 ダルトン ~ 約 3,000 ダルトン、約 750 ダルトン ~ 約 3,000 ダルトン、約 750 ダルトン ~ 約 2,000 ダルトンなど) の平均分子量を有する。好ましい実施形態では、PEG は、約 2,000 ダルトンまたは約 750 ダルトンの平均分子量を有する。PEG は、任意選択的に、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリール基で置換されてもよい。特定の実施形態では、末端ヒドロキシル基は、メトキシ基またはメチル基で置換される。

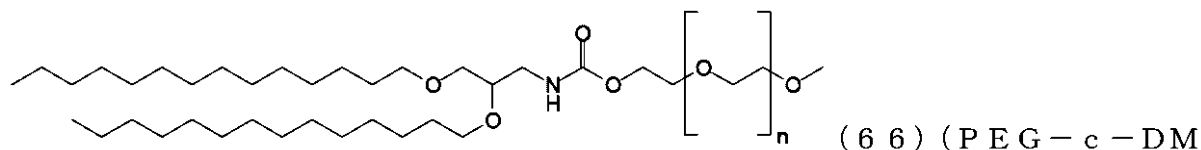
## 【0150】

好ましい実施形態では、「L」は、非エステル含有リンカー部分である。好適な非エステル含有リンカーとしては、アミドリリンカー部分、アミノリンカー部分、カルボニルリンカー部分、カルバメートリンカー部分、尿素リンカー部分、エーテルリンカー部分、ジスルフィドリンカー部分、スクシニアミジルリンカー部分、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、非エステル含有リンカー部分は、カルバメートリンカー部分 (すなわち、PEG-C-DAA コンジュゲート) である。別の好ましい実施形態では、非エステル含有リンカー部分は、アミドリリンカー部分 (すなわち、PEG-A-DAA コンジュゲート) である。更に別の好ましい実施形態では、非エステル含有リンカー部分は、スクシニアミジルリンカー部分 (すなわち、PEG-S-DAA コンジュゲート) である。

## 【0151】

特定の実施形態では、PEG-脂質コンジュゲートは、

## 【化 15-1】



A) 及び、

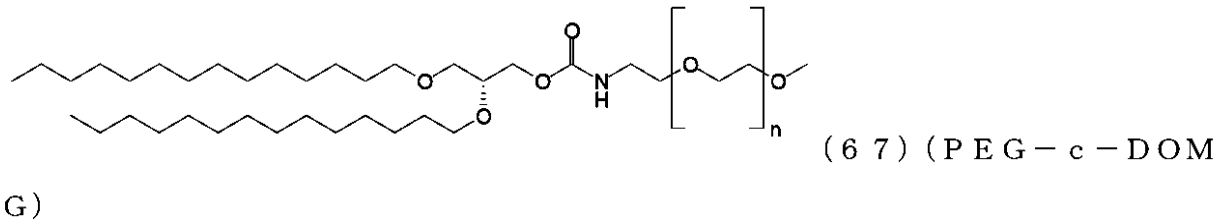
10

20

30

40

## 【化 15 - 2】



から選択される。

## 【0152】

当業者に周知の標準的な手法及び試薬を用いて、PEG-DAAコンジュゲートを合成する。PEG-DAAコンジュゲートが各種アミド結合、アミン結合、エーテル結合、チオ結合、カルバメート結合及び尿素結合を含有することは、理解されるであろう。これら結合を形成するための方法及び試薬は周知であり容易に利用可能であることを、当業者は理解するであろう。例えば、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 及び、Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989)を参照のこと。存在する任意の官能基が、PEG-DAAコンジュゲートの合成において、異なる位置に保護及び脱保護を必要とし得るということもまた理解されるであろう。このような手法が周知であることを当業者は認識しているであろう。例えば、Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)を参照のこと。

## 【0153】

PEG-DAAコンジュゲートは、好ましくは、PEG-ジデシルオキシプロピル(C<sub>10</sub>)コンジュゲート、PEG-ジラウリルオキシプロピル(C<sub>12</sub>)コンジュゲート、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(C<sub>14</sub>)コンジュゲート、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(C<sub>16</sub>)コンジュゲート、または、PEG-ジステアリルオキシプロピル(C<sub>18</sub>)コンジュゲートである。これらの実施形態では、PEGは、約750～約2,000ダルトンの平均分子量を有していることが好ましい。1つの特に好ましい実施形態におけるPEG-脂質コンジュゲートとしては、PEG2000-C-DMAが挙げられる(「2000」はPEGの平均分子量を意味し、「C」はカルバメートリンカー部分を意味し、また「DMA」はジミリスチルオキシプロピルを意味する)。別の特に好ましい実施形態におけるPEG-脂質コンジュゲートとしては、PEG750-C-DMAが挙げられる(「750」はPEGの平均分子量を意味し、「C」はカルバメートリンカー部分を意味し、また「DMA」はジミリスチルオキシプロピルを意味する)。特定の実施形態では、PEGの末端ヒドロキシル基は、メチル基で置換される。その他のジアルキルオキシプロピルをPEG-DAAコンジュゲートに使用可能であることを、当業者は容易に理解するであろう。

## 【0154】

上記に加え、PEGに代えてその他の親水性ポリマーが使用可能であることは、当業者には容易に明白となるであろう。PEGに代えて使用できる好適なポリマーの例としては、ポリビニルピロリドン、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド及びポリジメチルアクリルアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ならびに、ヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースなどの誘導体化セルロースが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0155】

上記構成成分に加え、脂質粒子は、カチオン性のポリ(エチレングリコール)(PEG)脂質またはCPLを更に含んでもよい(例えば、Chen et al., Bio

10

20

30

40

50

conj. Chem., 11: 433-437 (2000); 米国特許番号 6, 852, 334; PCT 公開番号 WO 00/62813 を参照のこと) (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

【0156】

好適な CPL としては、式 VII I の化合物、  
A - W - Y (VII I)  
が挙げられ、  
式中、A、W 及び Y については、以下で説明する。

【0157】

式 VII I に関して、「A」は、両親媒性脂質、中性脂質、または、脂質アンカーとして機能する疎水性脂質などの脂質部分である。好適な脂質の例としては、ジアシルグリセロリル、ジアルキルグリセロリル、N - N - ジアルキルアミノ、1, 2 - ジアシルオキシ - 3 - アミノプロパン、及び、1, 2 - ジアルキル - 3 - アミノプロパンが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0158】

「W」は、親水性ポリマーまたは親水性オリゴマーなどのポリマーまたはオリゴマーである。親水性ポリマーは、非免疫原性であるかまたは元々免疫原性の低い、生体適合性ポリマーであることが好ましい。あるいは、親水性ポリマーは、適切なアジュバントと共に用いる場合、わずかに抗原性であってもよい。好適な非免疫原性ポリマーとしては、PEG、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸/ポリグリコール酸コポリマー、及びこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、ポリマーは、約 250 ~ 約 7, 000 ダルトンの分子量を有する。

20

【0159】

「Y」はポリカチオン部分である。用語「ポリカチオン部分」とは、選択された pH、好ましくは生理学的 pH において、正電荷、好ましくは少なくとも 2 個の正電荷を有する化合物、誘導体または官能基のことを意味する。好適なポリカチオン部分としては、塩基性アミノ酸及びそれらの誘導体、例えば、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、リジン及びヒスチジン、スペルミン、スペルミジン、カチオン性デンドリマー、ポリアミン、ポリアミン糖及びアミノ多糖などが挙げられる。ポリカチオン部分は、直鎖状（例えば、直鎖状のテトラリジンなど）、分枝鎖状、または、デンドリマー構造であってもよい。ポリカチオン部分は、選択された pH 値において、約 2 ~ 約 15 個の正電荷、好ましくは、約 2 ~ 約 12 個の正電荷、より好ましくは、約 2 ~ 約 8 個の正電荷を有する。採用するポリカチオン部分の選択は、望まれる粒子用途のタイプによって決定してもよい。

30

【0160】

ポリカチオン部分の電荷は、粒子部分全体に分布するか、または、粒子部分の 1 箇所の特定領域における離散的な濃度の電荷密度（例えば、電荷スパイク）のいずれかであってもよい。電荷密度が粒子上に分布している場合、電荷密度は、均等に分布していてもよく、または、不均等に分布していてもよい。ポリカチオン部分における電荷分布のあらゆるバリエーションが包含される。

【0161】

脂質「A」及び非免疫原性ポリマー「W」は、様々な方法で、好ましくは、共有結合で結合させることができる。当業者に周知の方法を用いて、「A」及び「W」を共有結合させてもよい。好適な結合としては、アミド結合、アミン結合、カルボキシル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、エステル結合、及び、ヒドラゾン結合が挙げられるがこれらに限定されない。「A」及び「W」が、結合を生じさせるための相補的な官能基を有していなければならないということは、当業者には明白である。これら 2 個の基（一方は脂質上、もう一方はポリマー上）が反応することにより、所望の結合がもたらされる。例えば、脂質がジアシルグリセロールであり、例えば、NHS 及び DCC でその末端ヒドロキシルが活性化している場合、活性エステルが形成され、その後、アミノ基を含有するポリマー（例えば、ポリアミドなど）と反応して（例えば、米国特許番号 6, 320, 01

40

50

7及び6, 586, 559を参照のこと)(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)、2個の基の間にアミド結合が形成される。

#### 【0162】

特定の例においては、ポリカチオン部分は、カルシウムと錯体を形成するために結合した配位子、例えば、標的配位子またはキレート化部分などを有していてもよい。配位子の結合後に、カチオン部分が正電荷を維持することが好ましい。特定の例においては、結合した配位子は正電荷を有する。好適な配位子としては、化合物、または、反応性官能基を備えた機器が挙げられるがこれらに限定されず、脂質、両親媒性脂質、担体化合物、生体親和性化合物、バイオマテリアル、バイオポリマー、医用機器、解析的に検出可能な化合物、治療用活性化合物、酵素、ペプチド、タンパク質、抗体、免疫刺激剤、放射能標識、  
10  
蛍光原、ビオチン、薬物、ハプテン、DNA、RNA、多糖、リボソーム、ピロゾーム、ミセル、免疫グロブリン、官能基、その他の標的部分、または、毒素を含む。

#### 【0163】

一部の実施形態では、脂質コンジュゲート(例えば、PEG-脂質)は、粒子中に存在する総脂質の約0.1mol%~約3mol%、約0.5mol%~約3mol%、または、約0.6mol%、0.7mol%、0.8mol%、0.9mol%、1.0mol%、1.1mol%、1.2mol%、1.3mol%、1.4mol%、1.5mol%、1.6mol%、1.7mol%、1.8mol%、1.9mol%、2.0mol%、2.1mol%、2.2mol%、2.3mol%、2.4mol%、2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%もしくは3mol%  
20  
(またはその任意の端数もしくはその中の範囲)を含む。

#### 【0164】

その他の実施形態では、脂質コンジュゲート(例えば、PEG-脂質)は、粒子中に存在する総脂質の約0mol%~約20mol%、約0.5mol%~約20mol%、約2mol%~約20mol%、約1.5mol%~約18mol%、約2mol%~約15mol%、約4mol%~約15mol%、約2mol%~約12mol%、約5mol%~約12mol%、または、約2mol%(またはその任意の端数もしくはその中の範囲)を含む。

#### 【0165】

更なる実施形態では、脂質コンジュゲート(例えば、PEG-脂質)は、粒子中に存在する総脂質の約4mol%~約10mol%、約5mol%~約10mol%、約5mol%~約9mol%、約5mol%~約8mol%、約6mol%~約9mol%、約6mol%~約8mol%、または、約5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%もしくは10mol%(またはその任意の端数もしくはその中の範囲)を含む。  
30

#### 【0166】

脂質粒子中に存在する脂質コンジュゲートの百分率は目標量であり、製剤中に存在する実際の脂質コンジュゲートの量は、例えば、±5mol%、±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1mol%、±0.75mol%、±0.5mol%、±0.25mol%、または、±0.1mol%で変化し得ると理解すべきである。  
40

#### 【0167】

脂質粒子に用いるのに好適な脂質コンジュゲートにおける別の百分率及び範囲については、PCT公開番号WO09/127060、米国公開出願番号US2011/0071208、PCT公開番号WO2011/000106、及び、米国公開出願番号US2011/0076335に記載されている(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

#### 【0168】

用いる脂質コンジュゲート、及び、脂質粒子が融合する割合に応じて、脂質コンジュゲートの濃度が変化し得るということを、当業者は理解するであろう。

#### 【0169】

10

20

30

40

50

脂質コンジュゲートの組成及び濃度を調節することによって、脂質コンジュゲートが脂質粒子の外部と交換する割合を調節すること、更には、脂質粒子が融合する割合を調節することが可能となる。例えば、PEG-DAAコンジュゲートを脂質コンジュゲートとして用いる場合、脂質粒子が融合する割合は、例えば、脂質コンジュゲートの濃度を变化させることによって、PEGの分子量を变化させることによって、または、PEG-DAAコンジュゲート上のアルキル基の鎖長及び飽和度を变化させることによって、変化し得る。加えて、脂質粒子が融合する割合を变化及び/または調節するために用いることができるその他の変動要因としては、例えば、pH、温度、イオン強度などが挙げられる。脂質粒子が融合する割合を調節するために用いることができるその他の方法については、本開示を読解することで、当業者には明らかとなるであろう。また、脂質コンジュゲートの組成及び濃度を調節することによって、脂質粒径を調節することが可能となる。

10

#### 【0170】

##### 別の担体系

用いるのに好適な別の脂質ベース担体系の非限定例としては、リポプレックス（例えば、米国特許公開番号20030203865；及び、Zhang et al., J. Control Release, 100:165-180 (2004)を参照のこと）、pH応答性リポプレックス（例えば、米国特許公開番号20020192275を参照のこと）、可逆的にマスクされたりポプレックス（例えば、米国特許公開番号20030180950を参照のこと）、カチオン性脂質ベース組成物（例えば、米国特許番号6,756,054；及び、米国特許公開番号20050234232を参照のこと）、カチオン性リボソーム（例えば、米国特許公開番号20030229040、20020160038、及び、20020012998、米国特許番号5,908,635、ならびに、PCT公開番号WO01/72283を参照のこと）、アニオン性リボソーム（例えば、米国特許公開番号20030026831を参照のこと）、pH応答性リボソーム（例えば、米国特許公開番号20020192274、及び、AU2003210303を参照のこと）、抗体被覆リボソーム（例えば、米国特許公開番号20030108597、及び、PCT公開番号WO00/50008を参照のこと）、細胞型特異的リボソーム（例えば、米国特許公開番号20030198664を参照のこと）、核酸及びペプチドを含有するリボソーム（例えば、米国特許番号6,207,456を参照のこと）、放出可能親水性ポリマーから誘導体化した脂質を含有するリボソーム（例えば、米国特許公開番号20030031704を参照のこと）、脂質包括核酸（例えば、PCT公開番号WO03/057190及びWO03/059322を参照のこと）、脂質封入核酸（例えば、米国特許公開番号20030129221、及び、米国特許番号5,756,122を参照のこと）、その他のリボソーム組成物（例えば、米国特許公開番号20030035829及び20030072794、ならびに、米国特許番号6,200,599を参照のこと）、リボソーム及びエマルションの安定混合物（例えば、EP1304160を参照のこと）、エマルション組成物（例えば、米国特許番号6,747,014を参照のこと）、及び、核酸マイクロエマルション（例えば、米国特許公開番号20050037086を参照のこと）が挙げられる。

20

30

#### 【0171】

用いるのに好適なポリマーベース担体系の例としては、カチオン性ポリマー-核酸複合体（すなわち、ポリプレックス）が挙げられるがこれらに限定されない。ポリプレックスを形成するためには通常、核酸（例えば、表Aに記載のsiRNA分子などのsiRNA分子）と、直鎖状、分枝鎖状、星状または樹枝状のポリマー構造を有するカチオン性ポリマーとで複合体を形成させるが、カチオン性ポリマーは、細胞表面においてアニオン性プロテオグリカンと相互作用してエンドサイトーシスにより細胞内に侵入可能な正に帯電した粒子の内部に核酸を凝縮させる。一部の実施形態では、ポリプレックスは、ポリエチレンイミン（PEI）（例えば、米国特許番号6,013,240を参照のこと、Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA)からIn vivo jet PEI（商標）として市販されている（直鎖形態のPEI））、ポリプロピレンイミン（PPI）、

40

50

ポリビニルピロリドン (PVP)、ポリ-L-リジン (PLL)、ジエチルアミノエチル (DEAE)-デキストラン、ポリ(-アミノエステル) (PAE) ポリマー (例えば、Lynn et al., J. Am. Chem. Soc., 123: 8155-8156 (2001)) を参照のこと)、キトサン、ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー (例えば、Kukowska-Latallo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 4897-4902 (1996)) を参照のこと)、ポルフィリン (例えば、米国特許番号 6,620,805 を参照のこと)、ポリビニルエーテル (例えば、米国特許公開番号 20040156909 を参照のこと)、多環式アミジニウム (例えば、米国特許公開番号 20030220289 を参照のこと)、第一級アミン基、イミン基、グアニジン基及び/またはイミダゾール基を含むその他のポリマー (例えば、米国特許番号 6,013,240、PCT 公開番号 WO/9602655、PCT 公開番号 WO95/21931、Zhang et al., J. Control Release, 100: 165-180 (2004); 及び、Tiera et al., Curr. Gene Ther., 6: 59-71 (2006)) を参照のこと)、及びこれらの混合物などのカチオン性ポリマーと、複合体を形成する核酸 (例えば、表 A に記載の siRNA 分子などの siRNA 分子) を含む。その他の実施形態では、ポリプレックスは、米国特許公開番号 20060211643、20050222064、20030125281 及び 20030185890、ならびに、PCT 公開番号 WO03/066069 に記載のカチオン性ポリマー-核酸複合体、米国特許公開番号 20040071654 に記載の生分解性ポリ(-アミノエステル)ポリマー-核酸複合体、米国特許公開番号 20040142475 に記載のポリマーマトリックスを含有するマイクロ粒子、特許公報公開番号 20030157030 に記載のその他のマイクロ粒子組成物、米国特許公開番号 20050123600 に記載の凝縮核酸複合体、及び、AU2002358514 及び PCT 公開番号 WO02/096551 に記載のナノカプセル組成物及びマイクロカプセル組成物を含む。

#### 【0172】

特定の例においては、siRNA は、シクロデキストリンまたはそのポリマーと複合体を形成してもよい。シクロデキストリンベース担体系の非限定例としては、米国特許公開番号 20040087024 に記載のシクロデキストリン修飾ポリマー-核酸複合体、米国特許番号 6,509,323、6,884,789 及び 7,091,192 に記載の直鎖状シクロデキストリンコポリマー-核酸複合体、及び、米国特許番号 7,018,609 に記載のシクロデキストリンポリマー錯化剤-核酸複合体が挙げられる。特定のその他の例においては、siRNA は、ペプチドまたはポリペプチドと複合体を形成してもよい。タンパク質ベース担体系の一例としては、PCT 公開番号 WO95/21931 に記載のカチオン性オリゴペプチド-核酸複合体が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0173】

##### 脂質粒子の調製

連続混合法、直接希釈プロセス、及び、インライン希釈プロセスを含むがこれらに限定されない当該技術分野において周知の任意の方法を用いて、核酸-脂質粒子 (核酸 (例えば、表 A に記載の siRNA)) が粒子の脂質部分の内部に包括され、分解から保護される) を生成してもよい。

#### 【0174】

特定の実施形態では、カチオン性脂質は、式 I ~ III の脂質またはそれらの塩を、単独で、または、その他のカチオン性脂質と混合させて含んでもよい。その他の実施形態では、非カチオン性脂質は、卵スフィンゴミエリン (ESM)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-ホスファチジルコリン (POPC)、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン (DPPC)、モノメチル-ホスファチジルエタノールアミン、ジメチル-ホスファチジルエタノールアミン、14:0 PE (1,2-ジミリスチル-ホスファチジルエタノールアミン (DMPE))、16:0 PE (1,2-ジパルミトイ

ル - ホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、18:0 PE (1, 2 - ジステアロイル - ホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、18:1 PE (1, 2 - ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、18:1 トランスPE (1, 2 - ジエラドイル - ホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、18:0 ~ 18:1 PE (1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、16:0 ~ 18:1 PE (1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ポリエチレングリコールベースポリマー (例えば、PEG 2000、PEG 5000、PEG 修飾ジアシルグリセロール、または、PEG 修飾ジアルキルオキシプロピル)、コレステロール、その誘導体、またはこれらの組み合わせである。

10

#### 【0175】

特定の実施形態では、連続混合法、例えば、siRNAを含む水溶液を第1のリザーバ内に提供すること、有機脂質溶液を第2のリザーバ内に提供すること (有機脂質溶液中に存在する脂質は、有機溶媒 (例えば、エタノールなどの低級アルコール) 中に溶解する)、及び、有機脂質溶液が水溶液と混ざるのとほぼ同時に、siRNAを脂質ベシクル内に封入する脂質ベシクル (例えば、リポソーム) が生成されるように、水溶液を有機脂質溶液と混合すること、を含むプロセスを用いて、核酸 - 脂質粒子を調製する。このプロセス及びこのプロセスを実施するための装置については、米国特許公開番号20040142025に詳細が記載されている (その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。

20

#### 【0176】

脂質及び緩衝液を混合環境 (例えば、混合槽など) へと連続的に導入する操作を行うことにより、脂質溶液が緩衝液中に連続的に希釈されるようになり、その結果、混合とほぼ同時に脂質ベシクルが生成される。本明細書で使用する場合、語句「脂質溶液を緩衝液中に連続的に希釈する」 (及び変形形態) は通常、ベシクルの生成をもたらすのに十分な力を有する水和プロセスにおいて、脂質溶液が十分速やかに希釈されることを意味する。核酸を含む水溶液を有機脂質溶液と混合することによって、緩衝液 (すなわち、水溶液) の存在下、有機脂質溶液が連続的に段階的に希釈されて、核酸 - 脂質粒子が生成される。

#### 【0177】

連続混合法を用いて生成された核酸 - 脂質粒子は通常、約30 nm ~ 約150 nm、約40 nm ~ 約150 nm、約50 nm ~ 約150 nm、約60 nm ~ 約130 nm、約70 nm ~ 約110 nm、約70 nm ~ 約100 nm、約80 nm ~ 約100 nm、約90 nm ~ 約100 nm、約70 ~ 約90 nm、約80 nm ~ 約90 nm、約70 nm ~ 約80 nm、約120 nm未満、110 nm未満、100 nm未満、90 nm未満もしくは80 nm未満、または、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もしくは150 nm (またはその任意の端数もしくはその中の範囲) のサイズを有する。このように生成された粒子は凝集せず、均一な粒径となるよう任意選択的にサイジングされる。

30

40

#### 【0178】

別の実施形態では、核酸 - 脂質粒子は、脂質ベシクル (例えば、リポソーム) 溶液を生成して、その脂質ベシクル溶液を、調節した量の希釈緩衝液を入れた回収容器へと直ちに直接導入することを含む、直接希釈プロセスを用いて調製される。好ましい態様では、回収容器は、回収容器の内容物を攪拌して希釈を促進させるように構成された、1つまたは複数の部品を備える。一態様では、回収容器内に存在する希釈緩衝液の量は、そこへ導入する脂質ベシクル溶液の容積とほぼ同等である。非限定例として、等容積の希釈緩衝液を入れた回収容器内へと導入する際、45%エタノール中の脂質ベシクル溶液は、有利により小さい粒子を生じさせる。

#### 【0179】

50



更に別の実施形態では、希釈緩衝液を入れた第3のリザーバが第2の混合領域と流動的に連結したインライン希釈プロセスを用いて、核酸-脂質粒子を調製する。この実施形態では、第1の混合領域内で生成された脂質ベシクル（例えば、リボソーム）溶液は、第2の混合領域内の希釈緩衝液と直ちに直接混合される。好ましい態様では、第2の混合領域は、脂質ベシクル溶液及び希釈緩衝液の流れが、対向する180°の流れで合流するように調整されたT型コネクタを備えているが、浅い角度、例えば、約27°～約180°（例えば、約90°）となるコネクタを用いてもよい。ポンプ機構を用いて、第2の混合領域へと緩衝液を流量制御可能に供給する。一態様では、第2の混合領域へと供給する希釈緩衝液の流量は、第1の混合領域からそこへと導入する脂質ベシクル溶液の流量とほぼ同等に調節される。この実施形態では、有利に、第2の混合領域内で脂質ベシクル溶液と混合させる希釈緩衝液の流れをより調節すること、及び、またその結果として、第2の混合プロセス中、緩衝液中における脂質ベシクル溶液の濃度をより調節することが、可能となる。希釈緩衝液流量をこのように調節することによって、低濃度での小粒径生成が有利に可能となる。

10

#### 【0180】

これらのプロセスならびにこれら直接希釈プロセス及びインライン希釈プロセスを実施するための装置については、米国特許公開番号20070042031に詳細が記載されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0181】

直接希釈プロセス及びインライン希釈プロセスを用いて生成された核酸-脂質粒子は通常、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、約120nm未満、110nm未満、100nm未満、90nm未満もしくは80nm未満、または、約30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nmもしくは150nm（またはその任意の端数もしくはその中の範囲）のサイズを有する。このように生成された粒子は凝集せず、均一な粒径となるよう任意選択的にサイジングされる。

20

30

#### 【0182】

リボソームをサイジングするのに利用可能な方法のいずれかを用いて、脂質粒子をサイジングしてもよい。所望のサイズ範囲及び比較的狭い粒径分布とするために、サイジングを実施してもよい。

#### 【0183】

粒子を所望のサイズへとサイジングするためのいくつかの手法が利用可能である。リボソームに用いられ本粒子にも同様に応用可能な1つのサイジング法については、米国特許番号4,737,323に記載されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。浴超音波処理またはプローブ超音波処理のいずれかで粒子懸濁液を超音波処理することによって、約50nm未満のサイズの粒子へと、サイズを段階的に小さくさせる。ホモジナイゼーションとは、せん断エネルギーに頼り大きな粒子から小さな粒子へと細分化させる別の方法である。通常のホモジナイゼーション工程では、設定した粒径（一般的に約60～約80nm）が観察されるまで、標準的なエマルションホモジナイザー内に粒子を再循環させる。両方の方法において、通常のレーザービーム粒径識別装置またはQELSを用いて、粒径分布をモニターしてもよい。

40

#### 【0184】

小孔ポリカーボネート膜または非対称セラミック膜を通して粒子を押し出すこともまた、粒径を比較的明確な粒径分布へと小さくさせるための効果的な方法である。通常は、所望の粒径分布となるまで、1回または複数回、膜を通して懸濁液を循環させる。続けて、孔のより小さな膜を通して粒子を押し出し、段階的に粒径を小さくしてもよい。

50

## 【0185】

一部の実施形態では、例えば、米国特許出願番号09/744,103に記載のとおり、粒子中に存在する核酸（例えば、siRNA分子）を予備濃縮する（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

## 【0186】

その他の実施形態では、方法は、本組成物を用いた細胞のリポフェクションを達成するのに有用な非脂質ポリカチオンを加えることを更に含んでもよい。好適な非脂質ポリカチオンの例としては、ヘキサジメトリンブロミド（Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USAから商標名POLYBRENE（登録商標）で販売されている）またはその他ヘキサジメトリンの塩が挙げられる。その他の適切なポリカチオンとしては、例えば、ポリ-L-オルニチン、ポリ-L-アルギニン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ポリアリルアミン及びポリエチレンイミンの塩が挙げられる。これらの塩の添加は、粒子が生成された後が好ましい。

## 【0187】

一部の実施形態では、生成した核酸-脂質粒子における核酸（例えば、siRNA）：脂質比率（重量/重量比率）は、約0.01~約0.2、約0.05~約0.2、約0.02~約0.1、約0.03~約0.1、または、約0.01~約0.08の範囲で変動する。出発物質（入力）の比率もまた、この範囲内に収まる。その他の実施形態では、粒子製剤に、10mgの総脂質あたり約400μgの核酸を用いるか、または、約0.01~約0.08、より好ましくは、約0.04の核酸：脂質重量比率（50μgの核酸あたり1.25mgの総脂質に相当）を用いる。その他の好ましい実施形態では、粒子は、約0.08の核酸：脂質重量比率を有する。

## 【0188】

その他の実施形態では、生成した核酸-脂質粒子における脂質：核酸（例えば、siRNA）比率（重量/重量比率）は、約1（1：1）~約100（100：1）、約5（5：1）~約100（100：1）、約1（1：1）~約50（50：1）、約2（2：1）~約50（50：1）、約3（3：1）~約50（50：1）、約4（4：1）~約50（50：1）、約5（5：1）~約50（50：1）、約1（1：1）~約25（25：1）、約2（2：1）~約25（25：1）、約3（3：1）~約25（25：1）、約4（4：1）~約25（25：1）、約5（5：1）~約25（25：1）、約5（5：1）~約20（20：1）、約5（5：1）~約15（15：1）、約5（5：1）~約10（10：1）、もしくは、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）もしくは25（25：1）、またはその任意の端数もしくはその中の範囲で変動する。出発物質（入力）の比率もまた、この範囲内に収まる。

## 【0189】

前述したように、コンジュゲート脂質は、CPLを更に含んでもよい。脂質粒子-CPL（CPL含有脂質粒子）を調製するための様々な一般的な方法について、本明細書で説明する。2つの一般的な手法としては、「挿入後」手法、すなわち、例えば、予備生成した脂質粒子へのCPLの挿入、及び、「標準」手法（例えば、脂質粒子の生成工程中、脂質混合物中にCPLを含有させる）が挙げられる。挿入後手法により、主に脂質粒子二重層膜の外面にCPLを有する脂質粒子がもたらされる一方、標準手法は、内面及び外面の両方にCPLを有する脂質粒子をもたらし。方法は、リン脂質から調製されたベシクル（コレステロールを含有していてもよい）に特に有用であり、PEG-脂質を含有するベシクル（PEG-DAA及びPEG-DAGなど）にもまた有用である。脂質粒子-CPLの調製方法については、例えば、米国特許番号5,705,385、6,586,410、5,981,501、6,534,484及び6,852,334、米国特許公開

番号 20020072121、ならびに、PCT 公開番号 WO00/62813 において教示されている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0190】

##### 脂質粒子の投与

脂質粒子（例えば、核酸 - 脂質粒子）は、それらと混合または接触させたほぼ全ての細胞型に吸着され得る。一旦吸着されると、粒子は、細胞の一部にエンドサイトーシスされるか、細胞膜と脂質を交換するか、または、細胞と融合するかのいずれかとなり得る。粒子の siRNA 部分の移行または取り込みは、これら経路のいずれか 1 つを介して起こり得る。詳細には、融合が起こる際、粒子の膜が細胞膜内に取り込まれて、粒子の内容物が細胞内液と混ざる。

10

#### 【0191】

脂質粒子（例えば、核酸 - 脂質粒子）を、単独で、または、投与経路及び標準的な薬学的手法に従い選択した、薬学的に許容される担体（例えば、生理食塩水またはリン酸緩衝液）との混合物として、のいずれかで投与してもよい。一般的に、標準的な緩衝生理食塩水（例えば、135 ~ 150 mM の NaCl）を薬学的に許容される担体として用いる。その他の適切な担体としては、例えば、水、緩衝水、0.4 % 生理食塩水、0.3 % グリシンなどが挙げられ、また、安定性を高めるための糖タンパク質（例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど）も挙げられる。別の好適な担体については、例えば、REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mac k Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) に記載されている。本明細書で使用する場合、「担体」としては、全ての溶媒、分散媒、賦形剤、コーティング剤、希釈剤、抗菌剤及び抗カビ剤、等張化剤及び吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどが挙げられる。語句「薬学的に許容される」とは、ヒトに投与した際に、アレルギー反応または同様の有害反応を引き起こさない分子要素及び組成物のことを意味する。

20

#### 【0192】

薬学的に許容される担体は通常、脂質粒子の生成後に添加される。それゆえ、脂質粒子が生成された後に、粒子を、標準的な緩衝生理食塩水などの薬学的に許容される担体中に希釈してもよい。

30

#### 【0193】

医薬品製剤中における粒子の濃度は、広い範囲で、すなわち、約 0.05 重量 % 未満から、通常は（または少なくとも）約 2 ~ 5 重量 %、約 10 ~ 90 重量 % ほどまでと様々であってもよく、また、選択する個々の投与方法に従い、主に液量、粘度などにに基づき選択される。例えば、粒子濃度を上昇させて、治療に関連する液体量を低下させてもよい。このことは、アテローム性動脈硬化症に関連したうつ血性心不全または重篤な高血圧症を有する患者において、特に望ましい場合がある。あるいは、炎症性脂質からなる粒子を低濃度まで希釈して、投与部位の炎症を抑えてもよい。

#### 【0194】

通常によく知られた滅菌法を用いて、医薬組成物を滅菌してもよい。使用用に水溶剤を包装してもよく、または、無菌条件下で水溶剤を濾過してから凍結乾燥してもよく、その凍結乾燥製剤は、投与前に滅菌水溶液と混合する。組成物は、pH 調整剤及び pH 緩衝剤、等張化剤など、生理学的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容される補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び塩化カルシウムを含有していてもよい。加えて、粒子懸濁液は、保管時におけるフリーラジカル損傷及び脂質過酸化損傷から脂質を保護する、脂質保護剤を含んでいてもよい。 - トコフェロールなどの親油性フリーラジカル停止剤、及び、フェリオキサミンなどの水溶性の鉄特異的キレート剤が好適である。

40

#### 【0195】

##### インピボ投与

50

インビボ治療のための全身送達、例えば、循環など身体システムを介した、遠く離れた標的細胞への本明細書に記載の *siRNA* 分子（表 A に記載の *siRNA* など）の送達は、PCT 公開番号 WO 05 / 007196、WO 05 / 121348、WO 05 / 120152 及び WO 04 / 002453 に記載されるもののような核酸 - 脂質粒子を用いて、行われている（その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる）。

#### 【0196】

インビボ投与において、当該技術分野において周知の任意の方法、例えば、注射、経口投与、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）、経皮投与または直腸投与により、投与を行ってもよい。単一用量または分割用量を用いて、投与を行ってもよい。非経口で、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内で、医薬組成物を投与してもよい。一部の実施形態では、医薬組成物は、ボラス注入により静脈内投与または腹腔内投与される（例えば、米国特許番号 5,286,634 を参照のこと）。細胞内の核酸送達についてはまた、Straubinger et al., Methods Enzymol., 101:512 (1983); Mannino et al., Biotechniques, 6:682 (1988); Nicolau et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 6:239 (1989); 及び、Behr, Acc. Chem. Res., 26:274 (1993) において考察されている。脂質ベース医薬品を投与するための更なるその他の方法については、例えば、米国特許番号 3,993,754、4,145,410、4,235,871、4,224,179、4,522,803、及び、4,588,578 に記載されている。疾患部位に直接注射することにより、または、疾患部位から遠く離れた部位に注射することにより、脂質粒子を投与してもよい（例えば、Culver, HUMAN GENE THERAPY, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, pp. 70 - 71 (1994) を参照のこと）。上記参照文献の開示内容は、あらゆる目的においてその内容全体が参照として本明細書に組み込まれる。

#### 【0197】

脂質粒子を静脈内投与する実施形態では、粒子の総注射用量の少なくとも約 5%、10%、15%、20% または 25% が、注射後約 8、12、24、36 または 48 時間において、血漿中に存在する。その他の実施形態では、脂質粒子の総注射用量の約 20% 超、30% 超、40% 超、及び、約 60%、約 70% または約 80% ほどが、注射後約 8、12、24、36 または 48 時間において、血漿中に存在する。特定の例においては、多数の粒子のうち約 10% 超が、投与後約 1 時間において、哺乳動物の血漿中に存在する。特定のその他の例においては、脂質粒子の存在は、粒子の投与後少なくとも約 1 時間において検出可能である。一部の実施形態では、*siRNA* 分子の存在は、投与後約 8、12、24、36、48、60、72 または 96 時間において、細胞内で検出可能である。その他の実施形態では、*siRNA* 分子による標的配列（ウイルス配列または宿主配列など）の発現の下方制御は、投与後約 8、12、24、36、48、60、72 または 96 時間において検出可能である。更にその他の実施形態では、*siRNA* 分子による標的配列（ウイルス配列または宿主配列など）の発現の下方制御は、感染細胞及び / または感染可能細胞において優先的に生じる。更なる実施形態では、投与部位の近位部位または遠位部位の細胞内における *siRNA* 分子の存在または効果は、投与後約 12、24、48、72 または 96 時間において、または、投与後約 6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26 または 28 日において検出可能である。別の実施形態では、脂質粒子は、非経口投与または腹腔内投与される。

#### 【0198】

組成物を、単独でまたはその他の好適な構成成分と組み合わせて、吸入（例えば、鼻腔内または気管内）で投与するエアゾール製剤に調製してもよい（すなわち、エアゾール製剤を「霧状」にしてもよい）（Brigham et al., Am. J. Sci., 298:278 (1989) を参照のこと）。加圧された許容される噴射剤（例えば、ジク

ロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など) 中に、エアゾール製剤を入れてもよい。

【0199】

特定の実施形態では、経鼻スプレー、吸入、及び/または、その他のエアゾール送達媒体を用いて、医薬組成物を送達してもよい。経鼻エアゾールスプレーを用いた、核酸組成物を直接肺へと送達するための方法については、例えば、米国特許番号 5,756,353 及び 5,804,212 に記載されている。同様に、経鼻微粒子樹脂及びリソホスファチジル-グリセロール化合物を用いた薬物の送達(米国特許 5,725,871)もまた、医薬技術分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリックス形態による、経粘膜の薬物送達については、米国特許番号 5,780,045 に記載されている。上記特許の開示内容は、あらゆる目的においてその内容全体が参照として本明細書に組み込まれる。

10

【0200】

例えば、関節内(関節の内部)経路、静脈内経路、筋肉内経路、皮膚内経路、腹腔内経路及び皮下経路などによる非経口投与に好適な製剤は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、及び、製剤を目的のレシピエントの血液と等張とする溶質を含有し得る水性及び非水性の等張性滅菌注射用液剤、ならびに、沈殿防止剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び防腐剤を含有し得る水性及び非水性の滅菌懸濁剤を含む。

【0201】

通常、静脈内投与する場合、脂質粒子製剤は、好適な医薬品担体を用いて製剤化される。好適な製剤については、例えば、REMYINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) に記載されている。様々な水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどを用いてもよく、また、安定性を高めるための糖タンパク質(例えば、アルブミン、リボタンパク質、グロブリンなど)を挙げてもよい。一般的に、標準的な緩衝生理食塩水(135~150mMのNaCl)を薬学的に許容される担体として用いるが、その他の好適な担体でも十分である。通常のリボソーム滅菌法(例えば、濾過)を用いて、これらの組成物を滅菌してもよい。組成物は、pH調整剤及びpH緩衝剤、等張化剤、湿潤剤など、生理学的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容される補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含有していてもよい。上記の手法を用いてこれらの組成物を滅菌してもよく、あるいは、これらの組成物を滅菌条件下で調製してもよい。使用用に、得られた水溶剤を包装してもよく、または、無菌条件下で水溶剤を濾過してから凍結乾燥してもよく、その凍結乾燥製剤は、投与前に滅菌水溶液と混合する。

20

30

【0202】

特定の用途では、経口投与により、本明細書で開示した脂質粒子を個体へと送達してもよい。粒子を賦形剤と混合させて、経口摂取可能な錠剤、バツカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、丸剤、ロゼンジ剤、エリキシル剤、含嗽剤、懸濁剤、経口スプレー、シロップ剤、カシェ剤などの形状で用いてもよい(例えば、米国特許番号 5,641,515、5,580,579 及び 5,792,451 を参照のこと)(その開示全体は、あらゆる目的において参照として本明細書に組み込まれる)。これらの経口剤形はまた、以下の、結合剤、ゼラチン、添加剤、滑沢剤及び/または風味剤を含有していてもよい。単位投与剤形がカプセル剤である場合、上記の原料に加えて、液体担体を含有していてもよい。コーティング剤として、または別の場合、投与単位の物理的形状を調節するために、様々なその他の原料を提供してもよい。当然、任意の単位投与剤形を調製するのに用いる任意の原料は、用いる量において、薬学的に純粋かつ実質的に非毒性でなければならない。

40

【0203】

通常、これらの経口製剤は、当然、粒子の百分率は様々であってもよく、都合よく、総配合物の重量または容積の約1%または2%~約60%もしくは70%またはそれ以上であってもよいが、少なくとも約0.1%またはそれ以上の脂質粒子を含有していてもよい

50

。当然、化合物の任意の単位用量で好適な投与量が得られるように、それぞれの治療的に有効な組成物における粒子の量を調製してもよい。溶解度、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命などの因子に加え、このような医薬品製剤を調製するためのその他薬理学的な考察について、当業者は予期するであろうし、それゆえ、様々な用量及び治療レジメンが望ましい場合がある。

#### 【0204】

経口投与に好適な製剤は、(a)液剤(希釈剤(例えば、水、生理食塩水またはPEG 400)中に懸濁させた有効量の包装 siRNA 分子(例えば、表Aに記載の siRNA 分子)など)、(b)カプセル剤、サッシェ剤または錠剤(それぞれが、所定量の siRNA 分子を、液体、固体、顆粒またはゼラチンとして含有)、(c)適切な液体中の懸濁剤、及び、(d)好適なエマルション剤からなってもよい。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、コーンスターチ、ポテトスターチ、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状の二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ならびに、その他の添加剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、風味剤、染料、崩壊剤、及び、薬学的に相溶性のある担体のうちの1種または複数種を含んでいてもよい。ロゼンジ剤形態は、風味剤(例えば、スクロース)中の siRNA 分子に加え、不活性基剤(例えば、ゼラチン及びグリセリンのエマルション剤、ゲル剤、または、スクロース及びアカシアのエマルション剤、ゲル剤など)中の治療用核酸を含むパステル剤( siRNA 分子に加え、当該技術分野において周知の担体を含有)を含んでいてもよい。

10

20

#### 【0205】

それらの使用に関する別の例においては、広範囲の局所投与剤形中に脂質粒子を混合させてもよい。例えば、核酸-脂質粒子を含有する懸濁液を、ゲル剤、油剤、エマルション剤、局所クリーム剤、パスタ剤、軟膏剤、ローション剤、発泡剤、ムース剤などとして製剤化して、投与してもよい。

#### 【0206】

投与する粒子の量は、 siRNA 分子：脂質の比率、用いる個々の siRNA、治療する HBV 株、患者の年齢、体重及び症状、ならびに、臨床医の判断に応じて決まるが、一般的には、体重1キログラムあたり約0.01~約50mg、好ましくは、約0.1~約5mg/kg(体重)、または、投与(例えば、注射)あたり約 $10^8 \sim 10^{10}$ 個の粒子である。

30

#### 【0207】

1m~15m(表Aを参照のこと)と名付けた siRNA の群から選択される2種類の異なる siRNA における、全ての可能な「2種」混合物について、以下に記載する。用語「混合物」とは、混ぜ合わせた siRNA 分子が同一組成の物質中に共に存在することを意味する(例えば、同一溶液中に共に溶解すること、同一脂質粒子中に共に存在すること、または、同一脂質粒子医薬品製剤中に共に存在すること(医薬品製剤中のそれぞれの脂質粒子は、 siRNA 混合物のそれぞれ異なる siRNA を含んでいてもいなくてもよいが))。混ぜ合わせた siRNA 分子は通常、互いに共有結合していない。

40

#### 【0208】

個々の siRNA はそれぞれ、表Aに示すように、1m~15mの名称で区別されている。混合物中のそれぞれの siRNA 番号は、ダッシュ( )で区切られており、例えば、表記「1m 2m」は、 siRNA 番号1m及び siRNA 番号2mの混合物を表す。ダッシュは、混合物中の異なる siRNA 分子が互いに共有結合しているということを意味しない。異なる siRNA 混合物は、セミコロンで区切られている。混合物中における siRNA 番号の順番は重要ではない。例えば、混合物1m 2mは混合物2m 1mと同等である。なぜなら、これら表記の両方は、 siRNA 番号1m及び siRNA 番号2mからなる同一の混合物を示しているからである。

#### 【0209】

siRNA 2種及び3種混合物は、例えば、ヒトのHBV感染症及び/またはHDV感

50

染症を治療するのに有用であり、また、HBV感染症及び/またはHDV感染症に関連する少なくとも1つの症状を改善するのに有用である。

【0210】

特定の実施形態では、siRNAは、核酸-脂質粒子を介して投与される。

【0211】

特定の実施形態では、脂質粒子内に封入したsiRNAのカクテルの使用を含む方法に関して、異なるsiRNA分子は、同一の脂質粒子内に同時封入される。

【0212】

特定の実施形態では、脂質粒子内に封入したsiRNAのカクテルの使用を含む方法に関して、カクテル内に存在するそれぞれのタイプのsiRNA種は、それ独自の粒子内に封入されている。

10

【0213】

特定の実施形態では、脂質粒子内に封入したsiRNAのカクテルの使用を含む方法に関して、いくつかのsiRNA種が同一粒子内に同時封入される一方で、別のsiRNA種は異なる粒子内に封入される。

【0214】

2種またはそれ以上の薬剤の配合及び投与

薬剤を単一製剤へと共に製剤化してもよいこと、または、薬剤を別々に製剤化してもよいこと、またそれゆえ、同時にまたは連続的に、別々に投与してもよいことが理解されるであろう。一実施形態では、薬剤を連続的に（例えば、別々の時点で）投与する場合、それらの生物学的作用がオーバーラップする（すなわち、それぞれの薬剤が、単一の任意の期間に生物学的作用を生じさせる）ように、薬剤を投与してもよい。

20

【0215】

選択した薬剤に応じた任意の許容される投与経路用に薬剤を製剤化してもよく、また、選択した薬剤に応じた任意の許容される投与経路を使用して薬剤を投与してもよい。例えば、好適な経路としては、経口、舌下、頬側、局所、経皮、非経口、皮下、腹腔内、肺内及び経鼻、必要に応じ、局所療法、病巣内投与が挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、本明細書中で特定した低分子薬剤を経口投与してもよい。別の実施形態では、注射（例えば、静脈などの血管内に）または皮下で、オリゴヌクレオチドを投与してもよい。一部の実施形態では、それを必要とする対象は、1種または複数種の薬剤を経口投与され（例えば、丸剤で）、また、注射または皮下で、1種または複数種のオリゴヌクレオチドを投与される。

30

【0216】

通常、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴヌクレオチドは、例えば、脂質ナノ粒子製剤で静脈内投与されるが、本発明は、オリゴヌクレオチドを含む静脈内製剤、または、オリゴヌクレオチドを静脈内投与する治療方法に限定されない。

【0217】

周囲温度、適切なpH及び所望の純度で、生理学的に許容される担体（すなわち、採用する用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性の担体）と混合することによって、薬剤を個別に製剤化してもよい。製剤のpHは主に、化合物の個々の使用及び濃度によって決まるが、通常、約3～約8のどこかの範囲であってもよい。凍結乾燥製剤または水溶剤でも許容されるが、薬剤は通常、固体組成物で保存される。

40

【0218】

良好な医学的手法に合った方法で、薬剤を含む組成物を製剤化し、投薬量を決め、投与してもよい。この状況において検討される因子としては、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者における臨床症状、疾患の原因、投与部位、投与方法、投与スケジュール、及び、医師に周知のその他因子が挙げられる。

【0219】

薬剤は、任意の簡便な投与形態で、例えば、錠剤、散剤、カプセル剤、液剤、分散液剤、懸濁剤、シロップ剤、噴霧剤、坐剤、ゲル剤、エマルジョン剤、貼付剤などで投与され

50

てもよい。このような組成物は、医薬製剤に通常用いる構成成分、例えば、希釈剤、担体、pH調整剤、甘味剤、増量剤、及び、更なる活性剤を含有していてもよい。非経口投与が望まれる場合、組成物は、滅菌であり、また、注射または注入に好適な溶液形態または懸濁液形態となるであろう。

#### 【0220】

好適な担体及び添加剤は当業者にとって周知であり、例えば、Ansel, Howard C., et al., Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R., et al. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; 及び、Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005に詳細が記載されている。製剤はまた、1種または複数種の緩衝剤、安定化剤、界面活性剤、湿潤剤、滑沢剤、乳化剤、沈殿防止剤、防腐剤、酸化防止剤、不透明化剤、流動促進剤、加工助剤、着色剤、甘味剤、着香剤、風味剤、希釈剤、及び、薬剤に上品な外観をもたらすか、または、医薬品（すなわち、薬剤）の製造に役立つその他周知の添加剤を含んでいてもよい。

10

20

#### 【0221】

薬剤は通常、少なくとも所望の生物学的作用に達する濃度で投与される。それゆえ、効果的な投与レジメンでは、少なくとも、所望の生物学的作用または生物学的有効量に達する最低量を投与するが、用量は、生物学的作用の利点が許容できない副作用を伴う量を上回るほど高い必要はない。したがって、効果的な投与レジメンでは、最大耐量（「MTD」）以下を投与する。最大耐量は、許容される比率の用量制限毒性（「DLT」）をもたらす最高用量として定義される。許容できない比率のDLTを引き起こす用量は、非耐容であるとみなされる。通常、特定のスケジュールにおけるMTDは、第1相臨床試験中に設定される。これら第1相試験は通常、げっ歯類における重度の中毒量（ $\text{mg}/\text{m}^2$  基準）の1/10（「STD10」）である安全な開始用量で始め、3人のコホートに患者を増やし、最も高い漸増ステップが最も低い相対増分（例えば、100%、65%、50%、40%、及び、30%～35%以降で増える用量）を有するというフィボナッチ変法に従い、用量を漸増させることによって、患者に対して実施される。3人の患者のコホートにおいて、非耐量に達するまで用量漸増を継続する。許容される比率のDLTを生じさせる投与濃度よりも1段階低い濃度がMTDとみなされる。

30

#### 【0222】

投与する薬剤の量は、用いる特定の薬剤、治療するHBV株、患者の年齢、体重及び症状、ならびに、臨床医の判断に応じて決まるが、一般的には、1日あたり約0.2～2.0グラムである。

#### 【0223】

##### キット

一実施形態では、キットを提供する。キットは、混合物を含む容器を含んでいてもよい。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル瓶、シリンジ、プリスターバックなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど様々な材料で形成されていてもよい。容器は、症状を治療するのに有効な混合物を収容してもよく、また、滅菌アクセスポート（例えば、容器は、皮下注射針で貫通可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアル瓶であってもよい）を有していてもよい。

40

#### 【0224】

キットは、容器表面上または容器に付随した、ラベルまたは添付文書を更に含んでいてもよい。用語「添付文書」とは、通常は治療薬の市販パッケージ内に含まれる取扱説明書を意味するために用いられ、このような治療薬の使用に関する表示、用法、用量、投与、

50



禁忌及び／または警告についての情報が含まれる。一実施形態では、ラベルまたは添付文書は、治療薬を用いてB型肝炎などのウイルス感染症を治療可能であることを示す。

【0225】

特定の実施形態では、キットは、治療薬の固体経口形態（例えば、錠剤またはカプセル剤など）を運搬するのに好適である。このようなキットは、多数の単位用量を含んでいることが好ましい。このようなキットは、キットの使用目的順に合わせた用量を示すカードを含んでいてもよい。このようなキットの一例は、「プリスターパック」である。プリスターパックは、包装業界において周知であり、医薬品の単位投与剤形を包装するために広範に使用されている。必要に応じ、記憶の補助になるもの（例えば、数字、文字またはその他の印の形態）を提供してもよく、または、用量を投与し得る治療スケジュールの日程を示すカレンダー文書と共にそれらを提供してもよい。

10

【0226】

別の実施形態によれば、キットは、(a)第1の薬剤をその中に収容した第1の容器、及び、(b)第2の薬剤をその中に収容した第2の容器を含んでいてもよい。代替または別の場合、キットは、薬学的に許容される緩衝液、例えば、注射用静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液及びブドウ糖輸液などを含む第3の容器を更に含んでいてもよい。キットは、市販及びユーザーの観点から望ましいその他の材料（例えば、その他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む）を更に含んでいてもよい。

【0227】

キットは、治療薬の投与に関する説明書を更に含んでいてもよい。例えば、キットは、治療薬を、それを必要とする患者に同時、連続的または別々に投与するための説明書を更に含んでいてもよい。

20

【0228】

特定のその他実施形態では、キットは、分離したボトルまたは分離したホイルパッケージなど、個々の組成物を収容するための容器を含んでいてもよいが、個々の組成物はまた、単一の分離していない容器内に収容されていてもよい。特定の実施形態では、キットは、個々の治療薬の投与に関する説明書を含む。キット形態は、個々の治療薬を異なる投薬形態（例えば、経口及び非経口）で投与する際に、個々の治療薬を異なる投与間隔で投与する際に、または、混合物における個々の治療薬の処方医による滴定が望ましい場合に、特に有利である。

30

【0229】

一実施形態では、本発明は、化合物3、化合物4、エンテカビル、ラミブジン及びSIRNA-NPからなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を提供する。

【0230】

一実施形態では、本発明の方法は、相乗有効量のi)共有結合閉環状DNAの形成阻害剤、及び、ii)ヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を除外する。

【0231】

一実施形態では、本発明の医薬組成物は、i)共有結合閉環状DNAの形成阻害剤、及び、ii)唯一の活性B型肝炎治療薬としてのヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体を含む組成物を除外する。

40

【0232】

一実施形態では、本発明のキットは、i)共有結合閉環状DNAの形成阻害剤、及び、ii)唯一のB型肝炎薬としてのヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体を含むキットを除外する。

【0233】

一実施形態では、本発明の方法は、i)B型肝炎ウイルスを標的とする1種または複数種のsiRNA、及び、ii)逆転写酵素阻害剤を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を除外する。

50

## 【 0 2 3 4 】

一実施形態では、本発明の医薬組成物は、i) B型肝炎ウイルスを標的とする1種または複数種のsiRNA、及び、ii) 唯一の活性B型肝炎治療薬としての逆転写酵素阻害剤を含む組成物を除外する。

## 【 0 2 3 5 】

一実施形態では、本発明のキットは、i) B型肝炎ウイルスを標的とする1種または複数種のsiRNA、及び、ii) 唯一のB型肝炎薬としての逆転写酵素阻害剤を含むキットを除外する。

## 【 0 2 3 6 】

一実施形態では、本発明は、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、及び、
- e) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を提供する。

## 【 0 2 3 7 】

一実施形態では、本発明は、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、及び、
- e) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも2種の薬剤を含むキットを提供する。

## 【 0 2 3 8 】

一実施形態では、本発明は、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、ならびに、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、及び、
- e) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも1種の別の薬剤を動物に投与することを含む、動物のB型肝炎を治療するための方法を提供する。

## 【 0 2 3 9 】

一実施形態では、本発明は、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、ならびに、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、
- d) sAg分泌阻害剤、及び、
- e) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも1種の別の薬剤を含む医薬組成物を提供する。

## 【 0 2 4 0 】

一実施形態では、本発明は、B型肝炎ゲノムを標的とするオリゴマーヌクレオチド、ならびに、

- a) 逆転写酵素阻害剤、
- b) カプシド阻害剤、
- c) cccDNA形成阻害剤、

- d) s A g 分泌阻害剤、及び、  
e) 免疫刺激剤

からなる群から選択される少なくとも１種の別の薬剤を含むキットを提供する。

【０２４１】

治療薬混合物がＢ型肝炎を治療する能力については、当業者に周知の薬理学モデルを用いて測定してもよい。

【０２４２】

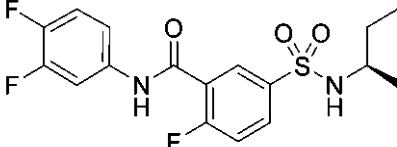
ここから以下の非限定例を挙げながら、本発明について説明する。

【実施例】

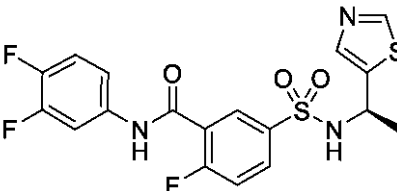
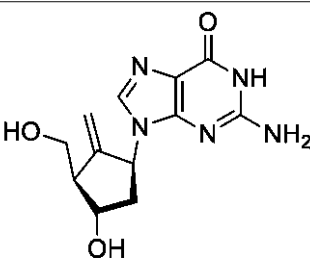
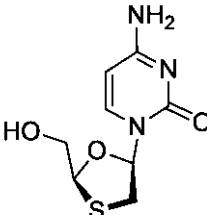
【０２４３】

以下の化合物について、実施例で言及する。化合物３～４は、周知の手順を用いて調製可能である。国際特許出願公開番号ＷＯ２０１４／１０６０１９及びＷＯ２０１３／００６３９４もまた、化合物３～４を調製するために使用可能な合成方法について記載している。

【化１６－１】

化合物番号 または名称	構造
3	

【化１６－２】

4	
エンテカビル	
ラミブジン	

【０２４４】

実施例１

Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）のマウスモデルを用いて、免疫刺激剤及びＨＢＶ標的化 s i R N A の抗 ＨＢＶ 効果を評価した（独立した治療薬として、互いを混合しての両方で）。

【０２４５】

H B V s i R N Aを送達するために、以下の脂質ナノ粒子 ( L N P ) 製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語 D S P C とは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

【化 1 7】

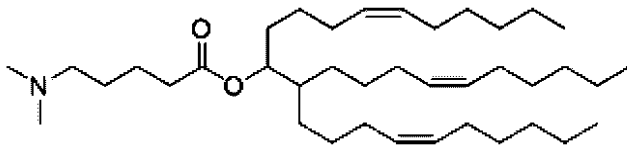
PEG ( 2 0 0 0 ) - C - DMA	カチオン性脂質	コレステロール	D S P C
1 . 1	5 5 . 0	3 3 . 0	1 1 . 0

【 0 2 4 6】

カチオン性脂質は、以下の構造 ( 1 3 ) を有していた。

10

【化 1 8】



【 0 2 4 7】

H B V ゲノムを標的とする 3 種類の s i R N A の混合物を用いた。3 種類の s i R N A の配列を、以下に示す。

【化 1 9 - 1】

20

センス配列 ( 5 ´ - 3 ´ )	アンチセンス配列 ( 5 ´ - 3 ´ )
<u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U U	U G A A G C G A A G U g C A C A C g G U U

【化 1 9 - 2】

<u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U U	C A C U A g U A A A C U g A g C C A G 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 C C G C A g U A U G g A U C G g C U U
小文字 = 2 ´ - O - メチル修飾 下線 = アンロックド核酸塩基類似体 ( U N A ) 部分	

30

【 0 2 4 8】

2 7 日目に、1 0 マイクログラムのプラスミド p A A V / H B V 1 . 2 ( D r . P e i - J e r C h e n から入手 ( 当初は、H u a n g , L R e t a l . , P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s , 2 0 0 6 , 1 0 3 ( 4 7 ) : 1 7 8 6 2 - 1 7 8 6 7 ) に記載 ) を、C 3 H / H e N マウスにハイドロダイナミクス法で投与した ( H D I ; 尾静脈内に 1 . 3 m L を急速注入 ) 。このプラスミドは、H B V ゲノムの 1 . 2 倍過剰に長い複製を有し、その他の H B V 産物間で H B V 表面抗原 ( H B s A g ) を発現している。酵素免疫アッセイを用いて、マウスにおける血清 H B s A g 発現をモニターした。血清 H B s A g レベルに基づき、a ) 全ての動物が H B s A g を発現することが確認されるように、及び、b ) 治療開始前の H B s A g 群における平均値が互いに類似となるように、動物を群へと分類した ( 無作為化した ) 。

40

【 0 2 4 9】

免疫刺激剤を用いて、以下のように動物を治療した。0 日目に、2 0 マイクログラムの高分子量ポリイノシン : ポリシチジル酸 ( ポリ ( I : C ) ) を H D I で投与した。脂質ナノ粒子 ( L N P ) に封入した H B V 標的化 s i R N A を用いて、以下のように動物を治療

50

した。0日目、7日目及び14日目のそれぞれにおいて、1mg/kg siRNAに相当する量の試験薬を静脈内投与した。陰性対照群には、このHBVマウスモデルにおいてHBsAg発現レベルが完全には安定していないマウスが含まれており、個々の動物における血清HBsAgの絶対濃度は通常、経時的に低下した。治療薬に特異的な効果を明らかにするために、治療群を陰性対照動物と比較した。

#### 【0250】

0日目（治療前）、3日目、7日目、14日目及び21日目に少量の血液を採取して、それらの血清HBsAg含有量を解析することにより、治療薬の効果を測定した。定量が可能なアッセイ範囲内の数値を得るために、試料を必要に応じて希釈した。定量下限値（LLOQ）未満内に含まれる個々の数値を、LLOQの2分の1と設定した。0日目における治療前のベースライン値に対する個々の動物の百分率として表される、治療群の平均（n = 4または5；±標準誤差）血清HBsAg濃度を表1に示す。

#### 【0251】

データは、HBV siRNA及びポリ（I：C）の混合物に応答してHBsAgが低下する度合いに加え、低下効果の持続期間を示している。2種の治療薬を混合することにより、一方の治療薬単独の場合と比較して、より優れた効果が得られた。

表1．3種のHBV siRNA及び免疫刺激剤 ポリ（I：C）による、HBV感染症マウスモデルの血清HBsAgにおける単独及び混合の治療効果

#### 【表1 - 1】

	0日目	3日目	7日目	14日目	21日目
--	-----	-----	-----	------	------

#### 【表1 - 2】

陰性対照	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+ポリ（I：C）	100±0	0.5±0.2	0.4±0.2	0.3±0.2	0.4±0.2
ポリ（I：C）	100±0	6.1±1.1	3.5±1.1	3.9±1.4	4.7±2.3

#### 【0252】

##### 実施例2

B型肝炎ウイルス（HBV）のマウスモデルを用いて、HBV封入低分子阻害剤（化合物3）及びHBV標的化siRNAの抗HBV効果を評価した（独立した治療薬として、互いを混合しての両方で）。

#### 【0253】

HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子（LNP）製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語DSPCとは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

#### 【化20】

PEG（2000） -C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

#### 【0254】

カチオン性脂質は、以下の構造（7）を有していた。

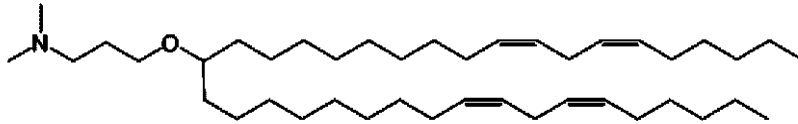
10

20

30

40

## 【化 2 1】



## 【0 2 5 5】

HBVゲノムを標的とする3種類のsiRNAの混合物を用いた。3種類のsiRNAの配列を、以下に示す。

## 【化 2 2】

センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')
<u>CCGU</u> g u G C A C U u C G C u u C A <u>UU</u>	U G A A G C G A A G U g C A C A C g G <u>UU</u>
<u>C u g g</u> C U C A G U U U A C u A g U G <u>UU</u>	C A C U A g U A A A C U g A g C C A G <u>UU</u>
<u>G C C g</u> A u C C A U A C u g C G g A A <u>UU</u>	U U C C G C A g U A U G g A U C G g C <u>UU</u>
小文字 = 2'-O-メチル修飾 下線 = アンロックド核酸塩基類似体 (UNA) 部分	

## 【0 2 5 6】

7日目に、10マイクログラムのプラスミドpHBV1.3 (Guidotti, L., et al., Journal of Virology, 1995, 69(10): 6158-6169のとおり)を、NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/Jマウスにハイドロダイナミクス法で投与した(HDI; 尾静脈内に1.6mLを急速注入)。このプラスミドは、HBVゲノムの1.3倍過剰に長い複製を有し、発現時、その他のHBV産物間のHBV DNAを含むB型肝炎ウイルス粒子を産生する。定量PCRアッセイ(Tanaka, Y., et al., Journal of Medical Virology, 2004, 72: 223-229に記載のプライマー配列/プローブ配列)を用い、様々な治療薬における抗HBV効果の測定値として、マウスにおける血清HBV DNA濃度を総抽出DNAから測定した。

## 【0 2 5 7】

化合物3を用いて、以下のように動物を治療した。0日目から開始して、50mg/kgまたは100mg/kg用量の化合物3を、0日目~7日目に毎日2回の頻度、合計14回の用量で、動物に経口投与した。投与するために、化合物3を共溶媒製剤中に溶解させた。陰性対照動物に、共溶媒製剤単独、または、生理食塩水のいずれかを投与した。脂質ナノ粒子(LNP)に封入したHBV標的化siRNAを用いて、以下のように動物を治療した。0日目に、0.1mg/kg siRNAに相当する量の試験薬を静脈内投与した。このHBVマウスモデルにおけるHBV発現レベルは完全には安定ではなく、治療薬に特異的な効果を明らかにするため、ここで、治療群を陰性対照動物と比較する。

## 【0 2 5 8】

0日目(治療前)、4日目及び7日目に血液を採取して、それらの血清HBV DNA含有量を解析することにより、これら治療薬の効果を測定した。0日目における治療前のベースライン値に対する個々の動物の百分率として表される、治療群の平均(n=7または8; ±標準誤差)血清HBV DNA濃度を表2に示す。

## 【0 2 5 9】

データは、化合物3及びHBV siRNAの混合物に応答して血清HBV DNAが低下する度合いに加え、低下効果の持続期間を示している。2種の治療薬を混合することにより、一方の治療薬単独の場合と比較して、より優れた効果が得られた。

表 2 . 化合物 3 及び 3 種の H B V s i R N A による、H B V 感染症マウスモデルの血清 H B V D N A における単独及び混合の治療効果

【表 2 - 1】

治療 1 (経口)	治療 2 (I V)	0 日目	4 日目	7 日目
生理食塩水	(無)	1 0 0 ± 0	6 9 ± 1 6	7 0 ± 1 4
溶媒製剤	(無)	1 0 0 ± 0	5 6 ± 1 5	4 7 ± 9
化合物 3、 5 0 m g / k g	(無)	1 0 0 ± 0	1 3 ± 4	3 3 ± 9
化合物 3、 1 0 0 m g / k g	(無)	1 0 0 ± 0	8 . 6 ± 1 . 5	1 2 ± 5
(無)	H B V s i R N A 0 . 1 m g / k g	1 0 0 ± 0	9 . 4 ± 5 . 3	5 . 6 ± 1 . 2
化合物 3、 5 0 m g / k g	H B V s i R N A 0 . 1 m g / k g	1 0 0 ± 0	1 . 9 ± 0 . 5	1 . 9 ± 0 . 4
化合物 3、	H B V s i R N A	1 0 0 ± 0	0 . 7 7 ±	0 . 8 8 ±

10

【表 2 - 2】

1 0 0 m g / k g	0 . 1 m g / k g		0 . 1 5	0 . 2 8
-----------------	-----------------	--	---------	---------

20

## 【 0 2 6 0 】

### 実施例 3

B 型肝炎ウイルス (H B V) のマウスモデルを用いて、H B V 封入低分子阻害剤 (化合物 3) の抗 H B V 効果を評価した (独立した治療薬として、承認済み化合物エンテカビル (E T V) を混合しての両方で)。

## 【 0 2 6 1 】

7 日目に、1 0 マイクログラムのプラスミド p H B V 1 . 3 (G u i d o t t i , L . , e t a l . , J o u r n a l o f V i r o l o g y , 1 9 9 5 , 6 9 ( 1 0 ) : 6 1 5 8 - 6 1 6 9 のとおり) を、N O D . C B 1 7 - P r k d c <sup>s c i d</sup> / J マウスにハイドロダイナミクス法で投与した (H D I ; 尾静脈内に 1 . 6 m L を急速注入)。このプラスミドは、H B V ゲノムの 1 . 3 倍過剰に長い複製を有し、発現時、その他の H B V 産物間の H B V D N A を含む B 型肝炎ウイルス粒子を産生する。定量 P C R アッセイ (T a n a k a , Y . , e t a l . , J o u r n a l o f M e d i c a l V i r o l o g y , 2 0 0 4 , 7 2 : 2 2 3 - 2 2 9 に記載のプライマー配列 / プロープ配列) を用い、様々な治療薬における抗 H B V 効果の測定値として、マウスにおける血清 H B V D N A 濃度を総抽出 D N A から測定した。

30

## 【 0 2 6 2 】

化合物 3 を用いて、以下のように動物を治療した。0 日目から開始して、1 0 0 m g / k g 用量の化合物 3 を、0 日目 ~ 7 日目に毎日 2 回の頻度、合計 1 4 回の用量で、動物に経口投与した。投与するために、化合物 3 を共溶媒製剤中に溶解させた。陰性対照動物に、共溶媒製剤単独、または、生理食塩水のいずれかを投与した。E T V を用いて、以下のように動物を治療した。0 日目から開始して、1 0 0 n g / k g 用量または 3 0 0 n g / k g 用量のいずれかの用量の E T V を、0 日目 ~ 6 日目に毎日 1 回の頻度、合計 7 回の用量で、動物に経口投与した。投与するために、E T V を D M S O 中に 2 m g / m L となるように溶解させてから、生理食塩水中に希釈した。この H B V マウスモデルにおける H B V 発現レベルは完全には安定ではなく、治療薬に特異的な効果を明らかにするため、ここで、治療群を陰性対照動物と比較する。

40

50

## 【0263】

0日目（治療前）、4日目及び7日目に血液を採取して、それらの血清HBV DNA含有量を解析することにより、これら治療薬の効果を測定した。群の平均値を計算するために、定量下限値（LLOQ）未満のCt値を有する試料を、LLOQの2分の1と設定した。0日目における治療前のベースライン値に対する個々の動物の百分率として表される、治療群の平均（ $n = 5 \sim 8$ ； $\pm$ 標準誤差）血清HBV DNA濃度を表3に示す。

## 【0264】

データは、化合物3及びETVの混合物に応答して血清HBV DNAが低下する度合いに加え、低下効果の持続期間を示している。2種の治療薬を混合することにより、一方の治療薬単独の場合と比較して、より優れた効果が得られた。

表3．化合物3及びETVによる、HBV感染症マウスモデルの血清HBV DNAにおける単独及び混合の治療効果

## 【表3-1】

治療1	治療2	0日目	4日目	7日目
-----	-----	-----	-----	-----

## 【表3-2】

生理食塩水	(無)	100 $\pm$ 0	67 $\pm$ 18	22 $\pm$ 8
溶媒製剤	(無)	100 $\pm$ 0	41 $\pm$ 7	14 $\pm$ 3
化合物3、 100mg/kg	(無)	100 $\pm$ 0	9.3 $\pm$ 2.5	1.2 $\pm$ 0.3
(無)	ETV 100ng/kg	100 $\pm$ 0	21 $\pm$ 5	3.5 $\pm$ 0.7
(無)	ETV、300ng/kg	100 $\pm$ 0	1.6 $\pm$ 0.3	0.88 $\pm$ 0.31
化合物3、 100mg/kg	ETV 100ng/kg	100 $\pm$ 0	1.4 $\pm$ 0.4	0.48 $\pm$ 0.18
化合物3、 100mg/kg	ETV、300ng/kg	100 $\pm$ 0	0.70 $\pm$ 0.16	0.32 $\pm$ 0.07

## 【0265】

実施例4～6

インビトロ混合物試験の目的：

HBV細胞培養モデル系を用いて、HBV封入低分子阻害剤（化合物3）、エンテカビル（ETV）（HBVポリメラーゼ逆転写酵素阻害剤）、及び、SIRNA-NP（全てのウイルスmRNA転写物及びウイルス抗原の強力なノックダウンを促進することを目的とするsiRNA）からなる2種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【0266】

SIRNA-NPの組成物：

SIRNA-NPは、HBVゲノムを標的とする3種類のsiRNAの混合物の脂質ナノ粒子製剤である。本明細書で報告する試験では、HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子（LNPs）製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語DSPCとは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

## 【化23】

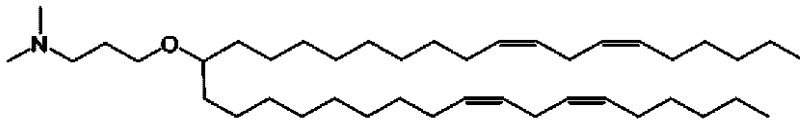
PEG(20000)-C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9



## 【0267】

カチオン性脂質は、以下の構造（7）を有していた。

## 【化24】



## 【0268】

3種類のsiRNAの配列を、以下に示す。

## 【化25-1】

センス配列（5' - 3'）	アンチセンス配列（5' - 3'）
r C r C m G r U m G m U r G r C r A r C r U m U r C m G r C m U m U r C r A r U r U	r U r G r A r A m G r C m G r A r A r G m U m G r C r A m C r A m C m G r G r U r U

## 【化25-2】

r C m U m G m G r C m U r C r A r G m U r U m U r A m C m U r A m G m U m G r U r U	r C r A r C r U r A m G m U r A r A r A m C r U m G r A m G r C m C r A r G r U r U
r A m C r C m U r C m U r G m C r C m U r A m A r U m C r A r U r C r U r C r U r U	r G r A r G r A r U r G m A r U m U r A r G r G m C r A m G r A m G r G r U r U r U
r N = 塩基NのRNA	
m N = 塩基Nの2' O-メチル修飾	

## 【0269】

インビトロ混合物試験プロトコル：

P r i c h a r d 及び S h i p m a n の方法（P r i c h a r d M N , a n d S h i p m a n C J r . , A n t i v i r a l R e s e a r c h , 1 9 9 0 , 1 4 ( 4 - 5 ) , 1 8 1 - 2 0 5 ; 及び、P r i c h a r d M N , e t . a l . , M a c S y n e r g y I I ）を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。C a m p a g n a e t a l . ( C a m p a g n a e t . a l . , J . V i r o l o g y , 2 0 1 3 , 8 7 ( 1 2 ) , 6 9 3 1 - 6 9 4 2 ) に記載のとおり、A M L 1 2 - H B V 1 0 細胞株を分化させた。H B V ゲノムを安定的にトランスフェクトされ、H B V p r e g e n o m i c R N A を発現してH B V r c D N A （弛緩型開環状DNA）合成をテトラサイクリン制御様式で補助できるのは、マウス肝細胞細胞株である。A M L 1 2 - H B V 1 0 細胞を、9 6 ウェルの組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、1 0 % ウシ胎児血清 + 1 % ペニシリン - ストレプトマイシンを補足したD M E M / F 1 2 培地（テトラサイクリン非含有）中に播種し、加湿インキュベータ内、3 7 °C、5 % C O 2 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を新鮮な培地へと移してから、阻害剤A及び阻害剤Bを用い、それらの対応するE C 5 0 値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、3 7 °C、5 % C O 2 下で4 8 時間の間インキュベートした。阻害剤を、1 0 0 % D M S O 中（E T V 及び化合物3）または増殖培地中（S I R N A - N P ）のいずれかで希釈し、アッセイ中の最終D M S O 濃度を 0 . 5 % とした。それぞれの濃度の阻害剤Aをそれぞれの濃度の阻害剤Bと混合させるようなチェッカー盤様式で、2 種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、r c D N A 産生阻害におけるそれら混合物の効果を測定した。

48時間のインキュベーション後、HBV特異的カスタムプローブセット及び製造業者の取扱説明書を備えたbDNAアッセイ(Affymetrix)を用いて、阻害剤治療したウェル中に存在するrcDNAレベルを測定した。それぞれのウェルから生成したRLUデータを、未治療対照ウェルの%阻害として計算し、MacSynergy IIプログラムを用いて解析し、Prichard及びShipmanが定めた以下のような判定ガイドライン、95%CIにおける相乗容積 $< 25 \mu\text{M}^2\%$ (対数容積 $< 2$ ) = おそらく有意ではない;  $25 \sim 50 \mu\text{M}^2\%$ (対数容積 $> 2$ かつ $< 5$ ) = 小さいが有意、 $50 \sim 100 \mu\text{M}^2\%$ (対数容積 $> 5$ かつ $< 9$ ) = 中程度、はインビボで重要となり得る;  $100 \mu\text{M}^2\%$ 超(対数容積 $> 9$ ) = 強い相乗作用、おそらくインビボで重要;  $1000 \mu\text{M}^2\%$ に近い容積(対数容積 $> 90$ ) = 異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。同時に、製造業者の取扱説明書に従いcell-titer glo試薬(Promega)を用いて細胞生存能の測定値としてのATP含有量を測定するのに使用した複製プレートを用いて、細胞生存能に対する阻害剤混合物の効果を評価した。

10

#### 【0270】

実施例4：化合物3及びエンテカビルのインビトロ混合物：

化合物3(2倍希釈系列及び9点滴定における、 $2.5 \mu\text{M} \sim 0.01 \mu\text{M}$ の濃度範囲)をエンテカビル(3倍希釈系列及び5点滴定における、 $0.075 \mu\text{M} \sim 0.001 \mu\text{M}$ の濃度範囲)と混合して試験した。化合物3またはエンテカビルによる治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表1に記載している。化合物3及びエンテカビルの $\text{EC}_{50}$ 値については、表4に記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用(表1)から予想される値と比較すると、混合物が相加的であることが判明した(表4)。

20

#### 【0271】

実施例5：化合物3及びSIRNA-NPのインビトロ混合物：

化合物3(2倍希釈系列及び9点滴定における、 $2.5 \mu\text{M} \sim 0.01 \mu\text{M}$ の濃度範囲)をSIRNA-NP(3倍希釈系列及び5点滴定における、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.006 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲)と混合して試験した。化合物3またはSIRNA-NPによる治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表2に記載している。化合物3及びSIRNA-NPの $\text{EC}_{50}$ 値については、表4に記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用(表2)から予想される値と比較すると、混合物が相加的であることが判明した(表4)。

30

#### 【0272】

実施例6：エンテカビル及びSIRNA-NPのインビトロ混合物：

エンテカビル(3倍希釈系列及び5点滴定における、 $0.075 \mu\text{M} \sim 0.001 \mu\text{M}$ の濃度範囲)をSIRNA-NP(2倍希釈系列及び9点滴定における、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.002 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲)と混合して試験した。エンテカビルまたはSIRNA-NPによる治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表3に記載している。エンテカビル及びSIRNA-NPの $\text{EC}_{50}$ 値については、表4に記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用(表3)から予想される値と比較すると、混合物が相加的であることが判明した(表4)。

40

表1：エンテカビル(ETV)及び化合物3のインビトロ混合物：

【表 1 - 3】

	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	0	0	0	0	1	3	6	2	5	r c D N
[薬物	1	2	3	7	5	1	2	5	0	A の平均 化合物 3 ( $\mu$
]	0	0	0	9	8	6	3	5	0	%阻害 M)

10

20

30

40

[illegible]

40

【表 1 - 6】

7 5	4	3	4	6	3	3	2	5	6	7			
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	3	5	4	2	8	4	5	0	5	5			
	2		8	2	6	4	4	6	9	5			
	6	6	6	6	6	7	8	9	9				
	3	2	3	5	2	6	9	2	5	9			
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6			
0 . 0	2	0	4	9	5	3	3	9	1	.			10
2 5	5	8	8	6	8	1	3	3	2	5			
	4	4	4	5	4	6				9			
	8	6	8	1	7	6	8		9	5			
	.	.	.	.	.	.	4		3	.			
0 . 0	0	3	3	8	0	4	.	9	.	0			
0 8	1	5	3	5	7	8	9	0	1	5			
	1	1	1	2	1	4	7	8	8	9			
	8	6	9	4	7	7	6	4	9	2			20
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
0 . 0	7	1	2	7	2	5	3	3	2	2			
0 3	1	2	1	1	4	9	9	6	1	5			
	2	1	2	2	2	4	7	8		9			
	1	9	2	7	0	9	7	4	8	2			
	.	.	.	.	.	.	.	.	9	.			
0 . 0	6	1	1	4	2	4	2	9	.	5			
0 1	3	3	2	1	1	7	4	2	6	3			
		—			—	3	7	8	8	9			
		3	0	7	1	5	0	0	6	0			30
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
		1	6	3	8	5	9	7	7	4			
0	0	9	2	8	1	3	6	6	3	7			
[薬物]		0	0	0	0	0	0	0					
		.	.	.	.	.	.	.	1				
		0	0	0	0	1	3	6	.	2			
		1	2	3	7	5	1	2	2	.			
	0	0	0	9	8	6	3	5	5	5			
E T V ( $\mu$ M)													
0 . 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
											相乗作用 プロット (99. 9%) ボンフェ ローニ調 整 96%		
											相乗作用 0		

40

10

20

表 2 : 化合物 3 及び S I R N A - N P のインビトロ混合物

【表 2 - 3】

[薬物]	0 0 0 0 0 0 0 1 0 . . . . . . . 2 0 0 1 0 0 0 1 3 6 2 . 0 2 3 7 5 1 2 5 5 0 9 8 6 3 5 0										r c D N A の 化合 平均 % 物 3 阻害
S I R N A - N P $\mu$ g / m L											$\mu$ M
0 . 5	9		9	9	9	9	9	9	9	9	
	6	9	5	5	6	5	6	6	7	6	
	. . 0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	2	1	4	3	8	3	1	0	8	.	
	5		5	5	3	8	5	2	8	9	
0 . 1 6 7	9		9	9	9	9	9	9	9	9	
	2	9	0	1	2	9	4	5	9	6	
	. . 7	.	.	.	0	.	.	5	.	.	
	3	4	2	3	9	4	2	7	5	6	
	8		6	5	9	1	8	7	8	3	
0 . 0 5 6	6		7	7	8	8	9	9	9	9	
	8	6	6	5	2	1	3	0	2	4	
	. . 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	5	9	9	2	6	5	2	6	8	9	
	9		9	1	6	7	9	1	4	9	



10

20

30

40

【表 2 - 5】

0.006	4	9	8	2						
	2	1	1	1	4	0	3	3		
	5	18	6	5	3	.	.	.	.	
	.	4	.	.	.	3	7	0	5	
	7	7	9	1	5	2	3	1	8	
	9		2	9	2					
			2	3	2	1	5	5	2	
		16	9	2	7	8	2	.	.	
	0	0	1	.	.	.	.	4	8	.
		4	6	3	2	6	9	7	3	5
			7	4	8	2	4			
[薬物]		0	0	0	0	0	0	1	2	
	0	0	1	0	0	1	3	6	.	.
		0	2	3	7	5	1	2	2	5
			0	9	8	6	3	5		
S I R N A-NP $\mu\text{g}/\text{mL}$										
		9	9	9		9	9	9	9	9
		6	96	5	5	9	7	8	9	9
	0.5	.	1	.	.	.	.	.	.	.
		2	8	4	6	7	6	4	2	5
		5		8	1		4	8	4	5
		9		9	9	9	9	9	9	9
	0.167	2	92	0	1	3	5	6	8	9
		.	2	.	.	.	.	.	.	.
		3	3	8	0	9	2	9	4	0
0.056		8		1	9	1	1	1	7	9
		6		6	6	7	8	8	9	9
		8	67	2	3	4	0	7	3	6
		.	9	.	.	.	.	.	.	.
		5	7	1	2	8	2	2	6	2
		9		4	7	9	5	4	7	7
		2		1	1	4	5	7	8	9
	0.019	9	27	4	7	3	5	1	5	1
		.	7	.	.	.	.	.	.	.
		1	8	6	1	3	4	2	7	5
0.000		8		3	8	9	6	4	4	9
		1	13	—	0	3	4	6	8	8

相 加 的 化 合 物 3  
阻 害  
 $\mu\text{M}$

10

20

30

40

【表 2 - 6】

6	4	.	2	2	.	2	6	5	2	9	1	
	.	4	.	5			.	.	.	.	.	
	9		5				4	4	8	8	2	
	2		6				9	5	6	9	1	
			—	—								
			2	1	2	3	5	7	8	8		
		— 1	0	6	0	7	9	9	8	9		
0	0	.	9	.	.	.	.	.	.	.		
		8	.	.	0	1	3	8	1	6		
			5	9	7	1	9	6	2	7		
			4	5								
[薬物]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		相乗作用プロット (99.9%)
	0	0	1	0	0	0	1	3	6	.	5	ボンフエローニ調整
	0	0	2	3	7	5	1	2	5			96%
			0	9	8	6	3	5				
S I R N A - N P												
$\mu\text{g} / \text{mL}$												
0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		相乗作用対数容積
0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		2.14
7			2									0.31
			.									
0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6			3	0	0	0	0	0	0	0		
			5									
			3									
			1									
0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		拮抗作用
9												0
								0				
								.				
0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		対数容積
6								1				0
								7				
								5				
								7				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

10

20

30

40

## 【表 2 - 7】



表 3 : エンテカビル及び S I R N A - N P のインビトロ混合物

【表 3 - 3】

[薬物]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	r c D N A の平均 %阻害
	0	2	4	8	6	2	3	5	0	
E T V μ M										S I R N A - N P      μ g / m L
0 . 0 7 5	7	7	7	8	8	9	9	9		
	7	7	5	9	5	6	2	5	9	6
	4	.	.	.	.	.	.	.	6	.
	.	5	4	0	1	5	7	0	.	6
	9	2	2	2	6	9	3	9	6	6
0 . 0 2 5	6	6	6	7	8	9	9	9	9	
	6	4	5	8	5	0	0	3	5	6
	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	5	9	9	3	8	1	8	5	7
	1	9	5	2	1	7	2	4	4	2
0 . 0 0 8	3	4	4	5	7	7	8	9		9
	7	2	8	4	0	5	5	2	9	6
	.	.	.	.	.	.	.	.	5	.
	8	6	0	2	8	2	2	6	.	1
	8	7	8	7	7	6	6	3	6	2
0 . 0 0 3	3	2	3	3	4	6	8		9	9
	7	5	1	3	8	8	1		4	6
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	8	0	1	5	3	4	8	9	6	0
	1	5	5	5	2	5	6	1	3	8
0 . 0 0 1	1			2	3	6	7	9	9	9
	9	1	1	2	3	1	7	0	3	5
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	0	4	5	4	4	8	0	3	9	1
	6	9	7	1	1	8	3	7	3	4
0	—	—	2	3	4	7			9	9
	8	7	0	2	6	2	8	3	5	
	.	.	.	.	.	.	7	.	.	
	9	8	8	4	0	9	.	3	0	
	0	5	6	9	3	5	4	4	1	2

10

20

30

40

【表 3 - 4】

[薬物]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	標準偏差 (%)
	.	.	.	.	.	.	.	.	0	
	0	0	0	0	0	0	1	.	0	
	0	0	0	1	3	6	2	2	.	
ETV μM	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
0.075	5	2	2	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	4	5	5	4	9	2	3
	4	5	4	3	6	9	2	2	9	5
	8	8	2	5	1	3	0	1	1	1
0.025	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	2	6	6	2	8	1	7	3	7	2
	4	9	7	8	1	9	9	9	2	8
	5	9	4	3	7	2	0	2	0	0
0.008	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	4	2	6	1	4	5	2	3	5	9
	3	1	4	9	8	2	9	3	9	5
	1	1								
0.003	8	1	4	2	7	2	1		0	
	.	.	.	.	.	.	.	1	.	0
	1	0	0	9	3	9	8	.	7	.
	1	6	6	7	2	7	9	3	3	7
0.001	9	1	8	9	7	3	3	1	0	1
	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.
	3	.	1	3	8	9	3	4	8	1
	5	3	3	2	2	6	2	3	1	6
0	1		1	2						
	7	8	3	6	5	5	1	1	1	
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	5	7	8	8	5	0	5	0	3	
[薬物]	0	2	7	7	7	9	5	6	6	3
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	.	.	.	.	.	.	.	.	0	
	0	0	0	0	0	0	1	.	0	
ETV	0	0	0	1	3	6	2	2	.	
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
[薬物]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	.	.	.	.	.	.	.	.	0	
	0	0	0	0	0	0	1	.	0	
	0	0	0	1	3	6	2	2	.	
ETV	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5
	0	2	4	8	6	2	3	5	5	5

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

30

表 4 : bDNA アッセイを用いた rDNA 定量を伴う AML12 - HBV10 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約 :



【表 4 - 1】

阻害剤 A	阻害剤 B	阻害剤		相乗容積 (μ M <sup>2</sup> %) *	相乗数 対容積	拮抗容積 (μ M <sup>2</sup> %) *	拮抗対数容積	判定
		阻害剤 A E C <sub>50</sub> (μ M)	阻害剤 B E C <sub>50</sub> (μ M または μ g / mL)					
化合物 3	エンテカビル (ETV)	0.231	0.012	0	0	-1.29	-0.19	相加的
化合物 3	SIRNA-NP*	0.250	0.032	2.14	0.31	0	0	相加的

10

【表 4 - 2】

エンテカビル (ETV)	SIRNA-NP*	0.012	0.031	1.59	0.23	-7.48	-1.07	相加的
--------------	-----------	-------	-------	------	------	-------	-------	-----

20

\* 99.9%信頼区間

\*\* μ g / mL

## 【0273】

実施例 7 ~ 9

30

インビトロ混合物試験の目的:

HBV DNA複製プロセス、cccDNA形成プロセス及びcccDNA発現プロセス、ならびに、安定性に関する、2種化合物混合物を用いた混合物治療の効果を測定することである。化合物3及び化合物4(2種HBV封入低分子阻害剤)、エンテカビル(ETV)及びラミブジン(3TC)(2種FDA承認済みHBVポリメラーゼ逆転写酵素阻害剤)、ならびに、SIRNA-NP(脂質ナノ粒子(LNP)で製剤化されたウイルスmRNA及びウイルス抗原発現のsiRNA阻害剤)について検証した。試験は、HBV細胞培養モデル系を用いて、混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることを目的とした。

## 【0274】

40

LNP製剤:

SIRNA-NPは、HBVゲノムを標的とする3種類のsiRNAの混合物の脂質ナノ粒子製剤である。本明細書で報告する試験では、HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子(LNP)製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語DSPCとは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

## 【化26】

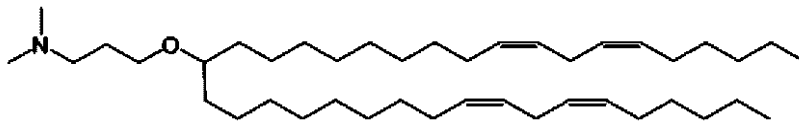
PEG(2000)-C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

50

## 【 0 2 7 5 】

カチオン性脂質は、以下の構造（ 7 ）を有していた。

## 【 化 2 7 】



## 【 0 2 7 6 】

s i R N A

3 種類 の s i R N A の配列を、以下に示す。

## 【 化 2 8 - 1 】

センス配列（ 5 ´ - 3 ´ ）	アンチセンス配列（ 5 ´ - 3 ´ ）
r C r C m G r U m G m U r G r C r A r C r U m U r C m G r C m U m U r C r A r U r U	r U r G r A r A m G r C m G r A r A r G m U m G r C r A m C r A m C m G r G r U r U
r C m U m G m G r C m U r C r A r G m U r U m U r A m C m U r A m G m U m G r U r U	r C r A r C r U r A m G m U r A r A r A m C r U m G r A m G r C m C r A r G r U r U

## 【 化 2 8 - 2 】

r A m C r C m U r C m U r G m C r C m U r A m A r U m C r A r U r C r U r C r U r U	r G r A r G r A r U r G m A r U m U r A r G r G m C r A m G r A m G r G r U r U r U
r N = 塩基NのRNA	
m N = 塩基Nの2´ O - メチル修飾	

## 【 0 2 7 7 】

インビトロ混合物試験プロトコル：

C a i e t a l ( A n t i m i c r o b i a l A g e n t s C h e m o t h e r a p y , 2 0 1 2 . V o l 5 6 ( 8 ) : 4 2 7 7 - 8 8 ) に記載されているアッセイ系の調整を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。これまでに開発されている H e p D E 1 9 細胞培養系 ( G u o e t a l . J . V i r o l o g y ( 2 0 0 7 ) 8 1 ( 2 2 ) : 1 2 4 7 2 - 1 2 4 8 4 ) は、H B V DNA 複製及び c c c D N A 形成をテトラサイクリン ( T e t ) 制御様式で補助し、c c c D N A の産生及び維持に依存する検出可能なレポーター分子を産生する。

## 【 0 2 7 8 】

H e p D E 1 9 細胞培養系において、レポーターは、プレコアRNA 及びその関連タンパク質産物、分泌 H B V 「 e 抗原」 ( H B e A g ) である。H e p D E 1 9 細胞において、プレコアRNA 及び H B e A g は c c c D N A 環状鑄型のみから産生される。その理由としては、H B e A g の O R F 及びその 5 ´ RNA リーダーが、一体化したウイルスゲノムの相対する両末端に離れて位置しており、c c c D N A の形成に続いて起こるに過ぎないからである。H e p D E 1 9 細胞培養系に基づいたアッセイは、活性を測定するには効果的ではあるが、H B e A g E L I S A が、H e p D E 1 9 細胞内において主に c c c D N A に依存した方法で発現するコア抗原 ( H B c A g ) である、ウイルス H B e A g ホモログと交差反応するため、ハイスループットスクリーニングの結果が複雑になる場合がある。この複雑化を克服するために、H B V 複製、c c c D N A 転写及び H B e A g 分泌に

として重要ないかなるシスエレメントも破壊することなく、DESHAe82細胞の導入遺伝子内におけるHB e AgのN末端コード配列中にインフレーションHAエピトープタグを含む、代替的な細胞培養系（本明細書ではDESHAe82細胞培養系と呼び、PCT/E P / 2 0 1 5 / 0 6 8 3 8に記載されている）が開発されている。

#### 【0279】

捕捉抗体として機能するHA抗体及び検出抗体として機能するHB e Agを用いてHAタグを付加したHB e Agを検出するための化学発光ELISAアッセイ（CLIA）（HB c Ag由来の汚染シグナルを排除する）が開発されている。HA-HB e Ag CLIAアッセイと結合したDESHAe82細胞株は、高レベルのcccDNA合成ならびにHA-HB e Ag産生及び分泌、ならびに、低いノイズで高い特異的読み出しシグナルを発揮する。加えて、DE19細胞内またはDESHAe82細胞内のいずれかにおけるプレコアRNAの検出に特化した定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）用のプロトコルが開発されており、翻訳されてHB e AgまたはHA-HB e Agを産生するcccDNA依存性mRNA（プレコアRNA）の検出としても用いられている。

#### 【0280】

化合物混合物を試験するために、DESHAe82細胞またはDE19細胞（例に記載のしたとおり）を、96ウェルの組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、10%ウシ胎児血清+1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補足したDMEM/F12培地（Tet含有）中に播種し、加湿インキュベータ内、37、5%CO<sub>2</sub>下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を新鮮な培地（Tet非含有）へと移してから、阻害剤A及び阻害剤Bを用い、それらの対応するEC<sub>50</sub>値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、37、5%CO<sub>2</sub>下で48時間の間インキュベートした。阻害剤を、100%DMSO中（ETV、3TC、化合物3及び化合物4）または増殖培地中（SIRNA-NP）のいずれかで希釈し、アッセイ中の最終DMSO濃度を0.5%とした。それぞれの試験濃度の阻害剤Aをそれぞれの試験濃度の阻害剤Bと混合させるようなチェッカー盤様式で、2種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、cccDNA形成阻害及びcccDNA発現阻害におけるそれら混合物の効果を測定した。それぞれのプレートの複数のウェル内に、未治療陰性対照試料（0.5% DMSOまたは培地のみ）を含有させた。9日間のインキュベーションの後、培地を除去し、細胞をRNA抽出に供してから、cccDNA依存性プレコアmRNAレベルを測定した。製造業者の取扱説明書に従い（吸引マニホールド処理、緩衝液RA4による2回以上の追加洗浄）、96ウェル式総RNA単離キット（MACHEREY-NAGEL, Cat. 740466.4）を用いて、総細胞RNAを抽出した。RNA試料をRNAaseフリー水中に溶出させた。cccDNA依存性プレコアRNAを特異的に検出するプライマー及び条件を用いたRoche LightCycler 480及びRNA Master Hydrolysis probe（カタログ番号 04991885001, Roche）で、定量的リアルタイムRT-PCRを実施した。GAPDH mRNAレベルについてもまた、標準的な方法を用いて検出し、プレコアRNAレベルを正規化するために用いた。プレコアRNAレベル阻害、及びその結果であるcccDNA発現阻害を、未治療対照ウェルの%阻害として計算し、MacSynergy IIプログラム（Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. Vol 14 (4-5): 181-205; Prichard MN, Aseeltine KR, 及び Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992）を利用したPrichard-Shipman混合物モデルを用いて解析し、Prichard及びShipmanが定めた以下のような判定ガイドライン、95%CIにおける相乗容積<25µM<sup>2</sup>%（対数容積<2）=おそらく有意ではない；25~50µM<sup>2</sup>%（対数容積>2かつ<5）=小さいが有意、50~100µM<sup>2</sup>%（対数容積>5かつ<9）=中程度、はインビボで重要となり得る；100µM<sup>2</sup>%超（対数容積>9）=強い相乗作用、おそらくインビボで重要；1000µM<sup>2</sup>%に近い容積（対数容積>90）=異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合

10

20

30

40

50

物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。

【0281】

同時に、細胞生存能及び細胞増殖に対する阻害剤混合物の効果について、2つの方法、1)試験ウェルの直接顕微鏡観察、及び、2)10~20%の細胞密度で播種した複製プレートを用いて、4日後、製造業者の取扱説明書に従いCell-Titer Glo試験薬(Promega)を用いて細胞内ATP含有量を定量すること、により評価した。細胞生存能及び細胞密度を、未治療陰性対照ウェルの百分率として計算した。

【0282】

実施例7：化合物3及びエンテカビルのインビトロ混合物：

化合物3(half-log希釈系列及び6点滴定における、10 $\mu$ M~0.0316 $\mu$ Mの濃度範囲)をエンテカビル(half-log、3.16倍希釈系列及び6点滴定における、0.010 $\mu$ M~0.00003 $\mu$ Mの濃度範囲)と混合して試験した。この混合物の抗ウイルス活性については表7aに示し、相乗容積及び拮抗容積については表7bに記載している。Prichard及びShipmanに従った相乗容積及び拮抗容積の測定値の2点の複製による混合物の結果及び判定については、表9dに記載している。このアッセイ系において、この混合物は、プレコアRNA発現の相乗的阻害をもたらした。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡で観察されなかった。

表7a：化合物3及びエンテカビルの混合物の抗ウイルス活性：

陰性対照と比較した平均パーセント阻害(データポイントあたりn=2試料)

【表 7 a】

E T V , $\mu$ M	0 . 0 1	8 6 . 9 4 0	9 7 . 0 1 0	9 7 . 4 9 0	9 5 . 9 0 0	9 7 . 1 2 0	9 8 . 2 4 0	9 9 . 2 2 0
	0.0032	8 1 . 5 1 0	6 1 . 7 3 0	6 9 . 5 1 0	6 2 . 5 7 0	9 8 . 5 5 0	9 7 . 8 2 0	9 7 . 6 9 0
	0 . 0 0 1	7 3 . 3 2 0	7 7 . 6 0 0	8 6 . 9 9 0	6 6 . 7 0 0	9 4 . 4 9 0	8 9 . 5 9 0	9 1 . 7 1 0
	0 . 0 0 0 3	6 9 . 0 9 0	7 8 . 2 9 0	5 8 . 7 3 0	5 5 . 1 6 0	9 2 . 3 6 0	9 1 . 2 9 0	9 3 . 1 1 0
	0 . 0 0 0 1	− 8 . 9 9 0	3 9 . 4 6 0	5 5 . 7 0 0	4 4 . 4 3 0	4 5 . 6 8 0	7 3 . 4 2 0	9 1 . 5 8 0
	3E-05	− 1 3 3 . 2 2 0	− 3 1 3 . 9 6 0	2 0 . 8 7 0	4 9 . 9 3 0	8 . 7 4 0	6 8 . 5 9 0	7 2 . 5 9 0
	0	0 . 0 0 0	− 2 6 . 2 8 0	− 8 6 . 9 2 0	3 6 . 2 4 0	6 7 . 1 2 0	9 0 . 6 0 0	8 4 . 3 4 0
		0	0 . 0 3 2	0 . 1 0 0	0 . 3 1 7	1 . 0 0 1	3 . 1 6 5	1 0
化合物	化合物 3, $\mu$ M							

10

20

30

表 7 b . 化合物 3 及びエンテカビル の 混合物 における M a c S y n e r g y 容 積 計 算 :  
9 9 . 9 9 % 信 頼 レベル における 「 相 加 的 を 超 え る 」 阻 害 レベル

【表 7 b】

E T V , $\mu$ M	0 . 0 1	0	3 . 7 5 8 6 4	1 3 . 8 0 4 1	1 . 8 6 0 4 8	0	0	0 . 7 4 3 4 4
	0 . 0 0 3 2	0	0	0	0	0 . 8 7 8 2 6	0	0
	0 . 0 0 1	0	9 . 0 5 2 1 2	2 7 . 6 4 5 2	0	0	0	0
	0 . 0 0 0 3	0	0 . 4 0 4 2 6	6 . 0 1 1 7 1	0	0	0	0
	0 . 0 0 0 1	0	7 5 . 9 0 5 2	1 2 5 . 9 8 3	0	0	0	0
	3 E - 0 5	0	0	3 2 2 . 7 0 5	9 0 . 4 0 2 5	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0 . 0 3 2	0 . 1 0 0	0 . 3 1 7	1 . 0 0 1	3 . 1 6 5	1 0
化合物	化合物 3, $\mu$ M							

10

20

【 0 2 8 3 】

実施例 8 : 化合物 4 及びエンテカビルのインビトロ混合物 :

化合物 4 ( h a l f - l o g 希釈系列及び 6 点滴定における、 $10 \mu$  M ~  $0.0316 \mu$  M の濃度範囲 ) をエンテカビル ( h a l f - l o g 、 3 . 1 6 倍希釈系列及び 6 点滴定における、 $0.010 \mu$  M ~  $0.00003 \mu$  M の濃度範囲 ) と混合して試験した。この混合物の抗ウイルス活性については表 8 a に示し、相乗容積及び拮抗容積については表 8 b に記載している。P r i c h a r d 及び S h i p m a n に従った相乗容積及び拮抗容積の測定値の 2 点の複製による混合物の結果及び判定については、表 9 d に記載している。このアッセイ系において、この混合物は、プレコア RNA 発現の相乗的阻害をもたらした。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡で観察されなかった。

30

表 8 a . 化合物 4 及びエンテカビルの混合物の抗ウイルス活性 :

陰性対照と比較した平均パーセント阻害 ( データポイントあたり  $n = 2$  試料 )

【表 8 a - 1】

E T V , $\mu$ M	0 . 0 1	9 6	9 2 . 0 3	8 9 . 0 4	9 8 . 0 2	9 7 . 1 6	9 7 . 1 8	9 6 . 4 6
	0 . 0 0 3 2	9 5 . 3 1	9 3 . 9 6	9 3 . 1 1	8 9 . 3 4	9 1 . 8 1	9 7 . 7	9 7 . 7 4
	0 . 0 0	8 0 .	9 4 .	9 4 .	9 5 .	9 8 .	9 8	9 8 .

40

【表 8 a - 2】

[illegible]

表 8 b . 化合物 4 及びエンテカビルとの混合物における M a c S y n e r g y 容積計算 :  
99.99%信頼区間における「相加的を超える」阻害レベル

【表 8 b】

E T V, $\mu$ M	0 . 0 1	0	— 1 . 9 9	— 9 . 6 3	— 1 . 7 7	— 2 . 6	— 2 . 7 4	— 3 . 4 4
	0 . 0 0 3 2	0	0 . 9 7	— 5 . 3 3	— 1 0 . 4 1	— 7 . 9	— 2 . 2	— 2 . 1 4
	0 . 0 0 1	0	2 3 . 4	0 . 6 2	— 3 . 4 9	— 0 . 1 9	— 1 . 4 5	— 0 . 8 3
	0 . 0 0 0 3	0	8 6 . 7 8	1 2 . 5 1	0 . 9 8	1 . 5 6	— 1 . 0 3	— 3 . 2 3
	0 . 0 0 0 1	0	3 1 . 5 5	1 0 . 5	— 1 . 4 6	— 8 . 4 9	— 0 . 3 7	— 3 . 8 2
	3 E — 0 5	0	4 4 . 4 6	2 . 5 7	4 . 1 1	5 . 7 6	— 0 . 2 9	— 1 . 6 3
	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0 . 0 3 2	0 . 1 0 0	0 . 3 1 7	1 . 0 0 1	3 . 1 6 5	1 0
化合物	化合物 4, $\mu$ M							

## 【 0 2 8 4 】

実施例 9：化合物 3 及び S I R N A - N P のインビトロ混合物：

化合物 3 ( h a l f - l o g 希釈系列及び 6 点滴定における、 $10\mu\text{M} \sim 0.0316\mu\text{M}$  の濃度範囲) を S I R N A - N P ( h a l f - l o g、3.16 倍希釈系列及び 6 点滴定における、 $0.10\mu\text{M} \sim 0.000\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲) と混合して試験した。この混合物の抗ウイルス活性については表 9 a に示し、相乗容積及び拮抗容積については表 9 b に記載している。P r i c h a r d 及び S h i p m a n に従った相乗容積及び拮抗容積の測定値の 4 点の複製による混合物の結果及び判定については、表 9 d に記載している。このアッセイ系において、この混合物は、プレコア RNA 発現の相乗的阻害をもたらした。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡または C e l l - T i t e r G l o アッセイで観察されなかった (表 9 c)。

表 9 a . 化合物 3 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性：

陰性対照と比較した平均パーセント阻害 ( データポイントあたり  $n = 4$  試料 )

## 【表 9 a】

化合物 3, $\mu$ M	10. 000	76. 180	76. 580	93. 330	97 . 1 70	94 . 6 70	97. 120	98. 640
	3.1 65	73. 120	93. 950	95. 500	97 . 7 30	98 . 1 20	99. 160	98. 620
	1.0 01	88. 510	95. 740	97. 340	97 . 8 80	98 . 6 20	99. 410	98. 150
	0.3 17	77. 070	96. 440	93. 720	98 . 3 40	98 . 3 90	99. 260	97. 820
	0.1 00	71. 330	87. 960	91. 490	87 . 1 10	97 . 7 00	97. 790	95. 920
	0.0 32	35. 570	-56 . 28 0	64. 870	86 . 0 80	90 . 9 20	86. 330	89. 560
	0	0.0 00	3.9 30	-46 . 46 0	35 . 7 30	87 . 3 70	72. 720	99. 230
		0	0.0 003	0.0 01	0. 00 3	0. 01 0	0.0 32	0.1 00
化合物	S I R N A - N P ( $\mu\text{g/ml}$ )							

表 9 b . 化合物 3 及び S I R N A - N P の混合物における M a c S y n e r g y 容積計算：

99.99% 信頼レベルにおける「相加的を超える」阻害レベル



【表 9 b - 1】

化合物 3	1 0	0 .	0 .	1 3	4 .	0 .	0 . 0	- 0 . 0
, $\mu$ M	. 0	0 0	0 0	. 8	9 7	0 0	0 0	6 1
	0 0	0	0	0 5	7	0		

【表 9 b - 2】

	3 .	0 .	2 .	2 8	9 .	0 .	4 . 7	0 . 0 0
	1 6	0 0	5 5	. 3	5 8	0 0	7 9	0
	5	0	8	2 1	0	0		
	1 .	0 .	1 .	1 0	1 .	0 .	0 . 6	0 . 0 0
	0 0	0 0	4 1	. 2	9 6	0 0	9 7	0
	1	0	6	5 4	9	0		
	0 .	0 .	1 1	1 2	9 .	0 .	3 . 6	0 . 0 0
	3 1	0 0	. 9	. 9	9 2	0 0	7 7	0
	7	0	5 4	8 4	1	0		
	0 .	0 .	0 .	1 .	0 .	0 .	3 . 4	0 . 0 0
	1 0	0 0	0 0	9 8	0 0	0 0	3 8	0
	0	0	0	5	0	0		
	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 . 0	0 . 0 0
	0 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0
	2	0	0	0	0	0		
	0	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 . 0	0 . 0 0
		0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0
		0	0	0	0	0		
		0	0 .	0 .	0 .	0 .	0 . 0	0 . 1 0
			0 0	0 0	0 0	0 1	3 2	0
			0 3	1	3	0		
化合物	S I R N A - N P ( $\mu$ g / m L )							

10

20

30

表 9 c . 化合物 3 及び S I R N A - N P の混合物の細胞傷害性 :  
 対照と比較した細胞生存能の平均パーセント

【表 9 c】

化合物 3 , $\mu\text{M}$	1 0 . 0 0 0	1 1 0 . 5	1 1 2 . 6	1 2 0 . 6	1 2 4 . 0	1 1 5 . 0	8 9 . 1
	3 . 1 6 5	1 0 5 . 9	1 1 6 . 1	1 1 9 . 5	1 2 0 . 6	1 1 7 . 3	9 5 . 1
	1 . 0 0 1	1 0 9 . 0	1 1 8 . 6	1 1 5 . 9	1 1 4 . 9	1 1 6 . 3	9 1 . 5
	0 . 3 1 7	1 1 0 . 0	1 1 1 . 8	1 1 9 . 7	1 1 7 . 2	1 0 9 . 7	9 0 . 3
	0 . 1 0 0	9 9 . 3	1 0 7 . 2	1 1 5 . 1	1 1 9 . 5	1 1 9 . 9	9 3 . 5
	0 . 0 3 2	9 9 . 3	1 0 7 . 7	1 2 2 . 6	1 2 7 . 1	1 2 3 . 0	8 5 . 9
化合物		0 . 0 0 0 3	0 . 0 0 1	0 . 0 0 3	0 . 0 1 0	0 . 0 3 2	0 . 1 0 0

10

表 9 d . qR T - P C Rを用いた c c c D N A誘導プレコア R N A定量を伴う D E S H A e 8 2細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約

20

【表 9 d】

阻害剤 A (化合物 番号)	阻害剤 B	相乗容 積 ( $\mu\text{M}^2\%$ )	相乗対 数容積	拮抗作用 ( $\mu\text{M}^2\%$ )	拮抗対数 容積	判定
3	エンテカ ビル (E T V)	6 7 9 . 1 5	1 6 9 . 5 8	0	0	相乗作用
4	エンテカ ビル (E T V)	2 2 5 . 7 7	5 6 . 4 4	- 7 6 . 4 3	- 1 9 . 1 1	相乗作用
3	S I R N A - N P	1 2 2 . 3 1	3 0 . 5 4	- 0 . 0 6	- 0 . 0 1	相乗作用

30

## 【 0 2 8 5 】

## 実施例 1 0

この実施例の目的は、化合物 3 ( H B V封入低分子阻害剤 ) 及び S I R N A - N P ( H B V 標的化 s i R N A封入脂質ナノ粒子製剤 ) に加え、確立された H B V 標準治療治療薬、エンテカビル ( E T V )、H B V D N Aポリメラーゼ活性を阻害するヌクレオシド (ヌクレオチド) 類似体 ( de M a n R A e t a l . , H e p a t o l o g y , 3 4 ( 3 ) , 5 7 8 - 8 2 ( 2 0 0 1 ) ) 及び P E G 化インターフェロン - 2 a ( p e g I N F - 2 a ) ( 1 型インターフェロン受容体を活性化させることによりウイルスの伝播を制限する ) ( M a r c e l l i n e t a l . , N E n g l J M e d . , 5 1 ( 1 2 ) , 1 2 0 6 - 1 7 ( 2 0 0 4 ) ) を含む、様々な混合物治療薬の抗 H B V 活性を比較することであった。これら混合物の力価を、化合物 3、S I R N A - N P 及び E T V を単独で含む単剤治療薬に加え、化合物 3 の溶媒を含む陰性対照治療条件と比較した。

40

50

## 【0286】

この作業は、慢性B型肝炎ウイルス（HBV）感染が定着したヒト化肝臓キメラマウスモデルで行った（Tsuge et al., Hepatology, 42(5), 1046-54(2005)）。0日目を開始する治療フェーズに先立ち、動物におけるHBV感染症持続レベルを確認した。試験薬用量は以下の通りであった。化合物3、経口100mg/kgを1日2回；SIRNA-NP、静脈内3mg/kgを1週間おきに；ETV、経口1.2μg/kgを毎日；pegIFN-2a、皮下30μg/kgを週に2回。

## 【0287】

Bio-Rad Laboratories製のGS HBsAg EIA 3.0酵素結合免疫吸着アッセイキットを用いて製造業者の取扱説明書に従い、血清HBsAgレベルを基準として、抗HBV効果を評価し、また、定量PCRアッセイ（Tanaka et al., Journal of Medical Virology, 72, 223-229(2004)に記載のプライマー配列/プローブ配列）を用いて、総抽出DNAから血清HBV DNAレベルを測定した。

## 【0288】

より高い抗ウイルス活性（例えば、単剤治療薬を基準とした血清HBV DNAレベルのより強い抑制のような）が得られる2種混合物治療薬及び3種混合物治療薬について検証した。詳細には、28日目において、血清HBV DNAレベルは、ETV、化合物3またはSIRNA-LNPの単剤治療薬で観察された $1.0 \sim 1.5 \log_{10}$ の低下と比較して、化合物3及びSIRNA-LNPの混合物または化合物3及びpegIFN-2aの混合物での治療後に $2.5 \log_{10}$ だけ、また、化合物3及びETVの混合物での治療後に $2 \log_{10}$ だけ低下した。28日目において、化合物3、SIRNA-NP及びETVを含有する、または、化合物3、SIRNA-NP及びpegINF-2aを含有する3種混合物治療薬は、2種混合物治療薬と比較して、HBV DNAレベルに対するわずかに優れた効果を示した。SIRNA-NPのB型肝炎タンパク質（抗原）産生阻害能は（例えば、血清HBsAgレベルに基づく）維持されていた（その他の抗ウイルス治療薬と併用して同時投与した際）。

表10a：血清HBV DNAレベルに対する混合物治療薬及び単剤治療薬の効果

10

20

【表 10 a - 1】

群 番 号	治療	血清HBV DNA (複製/mL ± SEM)				
		0日目	7日目	14日目	21日目	28日目
1	化合物3 の溶媒対 照	1.50 E+08 ± 1 .82E +07	1.65 E+08 ± 2. 78E+ 07	1.45 E+08 ± 1. 50E+ 07	2.13E +08 ± 3.0 1E+07	2.13E +08 ± 2.6 3E+07
2	化合物3	1.70 E+08 ± 2. 16E+ 07	1.33 E+07 ± 1. 85E+ 06	1.28 E+07 ± 1. 78E+ 06	1.02E +07 ± 4.2 4E+06	1.17E +07 ± 5.2 0E+06
3	S I R N A-NP	1.88 E+08 ± 4. 52E+ 07	5.18 E+06 ± 1 .50E +06	6.40 E+06 ± 9. 67E+ 05	2.24E +06 ± 5. 51E+0 5	6.86E +06 ± 2.2 6E+06
4	化合物3 + S I R N A - NP	1.56 E+08 ± 2 .25E +07	8.64 E+06 ± 2. 48E+ 06	2.02 E+06 ± 5. 08E+ 05	4.36E +05 ± 1. 18E+0 5	3.64E +05 ± 1.0 0E+05
5	化合物3 + S I R N A - NP + E T V	1.66 E+08 ± 1 .33E +07	6.82 E+06 ± 1. 64E+ 06	1.57 E+06 ± 2. 19E+ 05	3.70E +05 ± 8.9 6E+04	1.68E +05 ± 4.0 0E+04

10

20

30

【表 1 0 a - 2】

6	化合物 3 + S I R N A - N P + p e g I F N $\alpha - 2 a$	2 . 4 2 E + 0 8 $\pm 5$ . 7 0 E + 0 7	7 . 7 5 E + 0 6 $\pm 2 .$ 0 3 E + 0 6	1 . 7 9 E + 0 6 $\pm 4 .$ 5 3 E + 0 5	5 . 4 8 E + 0 5 $\pm 1 . 1$ 2 E + 0 5	2 . 9 0 E + 0 5 $\pm 2 .$ 5 2 E + 0 4
7	化合物 3 + E T V	1 . 9 6 E + 0 8 $\pm 2$ . 4 6 E + 0 7	1 . 7 0 E + 0 7 $\pm 4 .$ 1 3 E + 0 6	5 . 2 2 E + 0 6 $\pm 1 .$ 0 6 E + 0 6	2 . 3 4 E + 0 6 $\pm 4 . 0$ 6 E + 0 5	1 . 8 0 E + 0 6 $\pm 3 .$ 6 7 E + 0 5
8	化合物 3 + p e g I F N $\alpha - 2 a$	1 . 6 7 E + 0 8 $\pm 2 .$ 5 4 E + 0 7	8 . 5 0 E + 0 6 $\pm 1$ . 6 4 E + 0 6	1 . 3 9 E + 0 6 $\pm 3$ . 7 1 E + 0 5	4 . 9 8 E + 0 5 $\pm 1 . 2$ 5 E + 0 5	3 . 0 1 E + 0 5 $\pm 8 . 1$ 1 E + 0 4
9	E T V	1 . 4 8 E + 0 8 $\pm 1 .$ 1 8 E + 0 7	2 . 3 5 E + 0 7 $\pm 2 .$ 4 7 E + 0 6	1 . 3 8 E + 0 7 $\pm 1$ . 6 5 E + 0 6	1 . 3 5 E + 0 7 $\pm 6 . 4$ 5 E + 0 5	9 . 3 3 E + 0 6 $\pm 3 . 2$ 0 E + 0 5

10

20

表 1 0 b : 血清 H B s A g レベルに対する混合物治療薬及び単剤治療薬の効果

【表 10b - 1】

群番号	治療	血清HBsAg (IU/mL ± SEM)	
		0日目	21日目
1	化合物3の溶媒対照	2761 ± 388	40 ± 338 65
2	化合物3	2965 ± 616	41 ± 355 58
3	SIRNA-NP	3352 ± 812	44 ± 11
4	化合物3 + SIRNA-NP	3436 ± 498	58 ± 8
5	化合物3 + SIRNA-NP + ETV	2795 ± 09 <sup>3</sup>	96 ± 24
6	化合物3 + SIRNA	3965 ± 734	37 ± 4

10

20

【表 10b - 2】

	A-NP + peg IFN $\alpha$ -2a		
7	化合物3 + ETV	3965 ± 779	58 ± 1490 22
8	化合物3 + peg IFN $\alpha$ -2a	3154 ± 521	36 ± 683 21
9	ETV	2649 ± 282	29 ± 629 75

30

## 【0289】

40

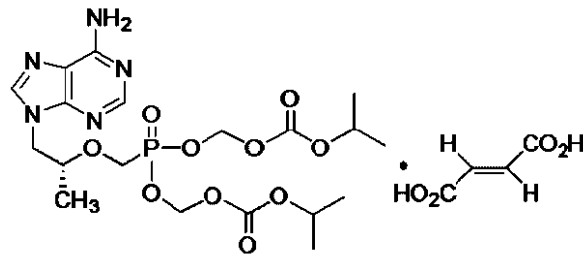
## 実施例 11

インビトロ混合物試験の目的：

HBV細胞培養モデル系を用いて、HBV封入低分子阻害剤（化合物3）及びテノホビル（TDF）、HBVポリメラーゼヌクレオシド類似体阻害剤からなる2種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【化 29】

テノホビルジソプロキシル  
フマレート (TDF)



## 【0290】

10

インビトロ混合物試験プロトコル：

Prichard 及び Shipman の方法 (Prichard MN, and Shipman C Jr., Antiviral Research, 1990, 14 (4-5), 181-205; 及び、Prichard MN, et al., MacSynergy II) を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。HepDE19 細胞培養系は、HBV DNA 複製及び cccDNA 形成をテトラサイクリン (Tet) 制御様式で補助し、HBV rcDNA、ならびに、cccDNA の産生及び維持に依存する検出可能なレポーター分子 (Guo et al 2007, J. Virol 81:12472-12484) を産生する、HepG2 (ヒト肝臓癌) 由来の細胞株である。HepDE19 (50,000 個の細胞/ウェル) を、96 ウェルのコラーゲンコート組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、10% ウシ胎児血清、1% ペニシリン・ストレプトマイシン及び 1 µg/ml テトラサイクリンを補足した DMEM/F12 培地中に播種し、加湿インキュベータ内、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を、テトラサイクリンを含む新鮮な培地へと移してから、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 4 時間インキュベートした。その後、細胞を、テトラサイクリンを含む新鮮な培地へと移してから、阻害剤 A 及び阻害剤 B を使い、それらの対応する EC<sub>50</sub> 値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 7 日間の間インキュベートした。阻害剤 テノホビル (TDF) 及び化合物 3 を 100% DMSO 中で希釈し、アッセイ中の最終 DMSO 濃度を 0.5% とした。それぞれの濃度の阻害剤 A をそれぞれの濃度の阻害剤 B と混合させるようなチェッカー盤様式で、2 種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、rcDNA 産生阻害におけるそれら混合物の効果を測定した。化合物混合物を用いた 7 日間の細胞インキュベーション後、HBV 特異的カスタムプローブセット及び製造業者の取扱説明書を備えた QuantiGene 2.0 bDNA アッセイキット (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて、阻害剤治療したウェル中に存在する rcDNA レベルを測定した。Victor 蛍光プレートリーダー (PerkinElmer Model 1420 Multilabel counter) を用いてプレートを読み、それぞれのウェルから生成した相対発光量 (RLU) データを、未治療対照ウェルの % 阻害として計算し、MacSynergy II プログラムを用いて解析し、Prichard 及び Shipman が定めた以下のような判定ガイドライン、95% CI における相乗容積 < 25 µM<sup>2</sup> % (対数容積 < 2) = おそらく有意ではない; 25 ~ 50 µM<sup>2</sup> % (対数容積 > 2 かつ < 5) = 小さいが有意、50 ~ 100 µM<sup>2</sup> % (対数容積 > 5 かつ < 9) = 中程度、はインビボで重要となり得る; 100 µM<sup>2</sup> % 超 (対数容積 > 9) = 強い相乗作用、おそらくインビボで重要; 1000 µM<sup>2</sup> % に近い容積 (対数容積 > 90) = 異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。Microsoft Excel の XL-Fit モジュールを用いて単剤化合物治療細胞の RLU データを解析し、4 パラメータカーブフィッティングアルゴリズムを用いて EC<sub>50</sub> 値を測定した。同時に、製造業者の取扱説明書に従い cell-titer glo 試薬 (CTG; Promega Corporation, Madison, WI) を用いて細胞生存能の測定値としての ATP 含有量を測定するための複製プレート (5,

20

30

40

50

000個の細胞/ウェルの密度で播種し4日間インキュベート)を用いて、細胞生存能に対する化合物の効果を評価した。

【0291】

化合物3及びテノホビル(TDF)のインビトロ混合物:

化合物3(3倍希釈系列及び5点滴定における、 $3\mu\text{M} \sim 0.037\mu\text{M}$ の濃度範囲)をテノホビル(2倍希釈系列及び9点滴定における、 $1\mu\text{M} \sim 0.004\mu\text{M}$ の濃度範囲)と混合して試験した。化合物3またはTDFによる治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表11aに記載している。この試験で測定した化合物3及びTDFの $\text{EC}_{50}$ 値については、表11bに記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、それぞれの化合物における個々の寄与を基準として上記濃度範囲における相加的相互作用(表11b)から予想される値と比較すると、混合物が相加的であることが判明した(表11a及び表11b)。

表11a、b DNAアッセイを用いたrcDNA定量を伴うHepDE19細胞培養モデルによる、化合物3及びTDFの混合物における抗ウイルス活性:

陰性対照と比較した平均パーセント阻害(データポイントあたり $n = 4$ 試料)





【表 1 1 a - 2】

0. 1 1 1	9 6 9 0 4 7 9 3 7 9 1 8 . 0 . 9 . 0 . 3 . 1 . 1 2 4 3 7 1 4 7 4 7 4 1 0 5 5 4 7 3 3 9 3 . 3 . 1 9 . . 8 . 0 . 3 1 2 9 8 9 4 7 1 0 8 8 1 1 1 9 2 3 1 1 0 0 . . 6 5 . . 8 5 7 . 3 . 8 7 8 3 1 4 8 1 . 3 4 6	2 5 8. 5. 1. . 2 3 8 3 9 3 4 1 1 8. 2. . 7 7 0 9 3. 2 1
[薬物]	0 0 0 0 0 0 0 1 0 3 0 6 1 2 2 5 5 0 0 0 4 8 6 1 3 5 0 0 0	相 加 的 阻 害 T D F M M
化合物 3 MM	9 2 8 9 8 9 9 0 9 5 9 5 9 7 9 8 9 9 9 9 . 6 . 2 . 7 . 8 . 3 . 4 . 4 . 8 . 3 . 6 9 5 8 2 8 . 4 4 5 6 7 7 5 7 6 7 8 8 9 8 9 9 4 9 7 9 8 9 9 8 3 . 1 . 3 . 7 . 3 . 3 . 0 . 3 . 5 . 2 . 1 5 8 8 1 6 9 3 1 4 3 4 3 . 8 . 1 7 5 8 5 8 7 7 8 9 9 4 9 7 . 5 8 2 5 8 . 8 . 6 . 8 . 1 . 6 . 2 . 0 9 — 1 — 1 — 8 7 6 8 6 9 3 — 5 2 1 1 0 8 . 4 . 5 . 4 7 . 2 . 7 . 2 0 . . 1 . 2 9 8 5 3 2 . 4 4 8 5 4 1 6 3 — 1 — 1 — 1 — 3 — 3 4 2 7 4 8 5 9 2 — 6 4 0 2 8 0 5 . 5 . 0 . 7 . 1 . 6 . 6 0. 3 3 3 . 7 . 8 . 6 7 6 5 3 1 5 7 2 3 3 2 — 4 — 3 — 2 3 6 3 7 6 5 8 4 9 1 9 5 0 0 7 . 9 . 5 . . 7 . 0 . 0 . 2 . 2 . 5 0 4 7 7 5 9 4 5 3 . 2 1 1	30 40
		相 乗 作 用 プ ロ ット ( 9 F

10

20

30

40

【表 1 1 a - 3】

													9 . 9 %)						
[薬物]	0	0	0	0	0	1	0	3	0	6	1	2	2	5	5	0	0	0	M M
		4		8		6		1		3		5		0		0		0	
化合物 3																			ボ ン フ 9 エ ロ ー 6 ニ調整 %
MM																			
3	0		0		0		2	0		0		0		0		0		0	相 乗 作 用
							7	4											1 2 . 0 7 1 . 7 3
1	0		0		0		5	8		7	8		0		0		0		対 数 容 積
							5	5		1	2								7 3
0 . 3 3 3	0		0		0					0		0		0		0		0	
0 . 1 1 1	0		0		0					0		0		0		0		0	拮 抗 作 用
0 . 0 3 7	0		0		0					0		0		0		0		0	0
0	0		0		0					0		0		0		0		0	

10

20

30

表 1 1 b : bDNA アッセイを用いた rDNA 定量を伴う HepDE19 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約 :

【表 1 1 b】

阻害剤 A	阻害剤 B	阻 害 剤 A EC <sub>50</sub> (M)	阻 害 剤 B EC <sub>50</sub> (M)	相乗容積 (μM <sup>2</sup> %) *	相乗 対数 容積	拮抗容 積 (μM <sup>2</sup> %) *	拮 抗 対 数 容 積	判 定
CMPD 3	TDF	0.454	0.088	12.07	1. 73	0	0	相 加 的

40

\* 99.9%信頼区間

【0292】

## 実施例 12

インビトロ混合物試験の目的 :

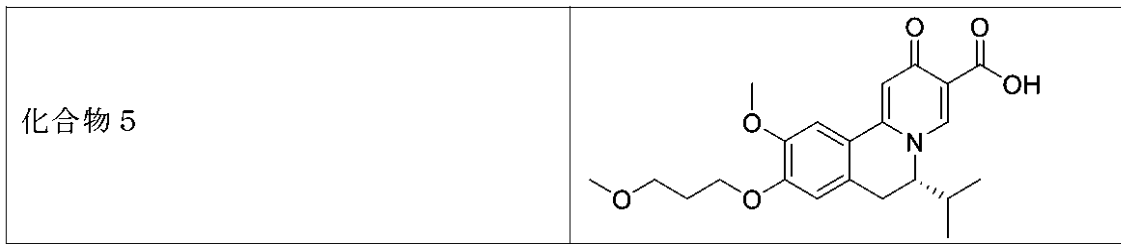
混合物治療薬における 2 種の化合物が、B 型肝炎ウイルス (HBV) をトランスフェクトした細胞培養物に対して相乗的效果、拮抗的效果または相加的效果をもたらすかどうかを明らかにすることである。化合物、化合物 5 は B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 分泌の

50

低分子阻害剤であり、SIRNA-NPは脂質ナノ粒子(LNP)封入RNAi阻害剤(ウイルスmRNA及びウイルス抗原発現を標的とする)である。このインビトロ試験では、HBV細胞培養系を用いて混合物治療薬の効果を測定した。

低分子の化学構造：

【化30】



10

【0293】

LNP製剤：

SIRNA-NPは、HBVゲノムを標的とする3種類のsiRNAの混合物の脂質ナノ粒子製剤である。本明細書で報告する試験では、HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子(LNP)産物を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。ジステアロイルホスファチジルコリンはDSPCと略される。

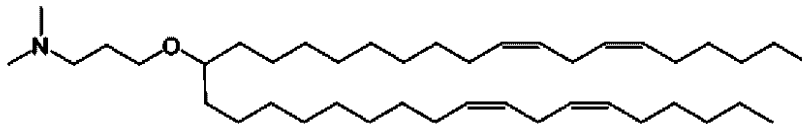
【化31】

PEG (2000) -C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

20

カチオン性脂質は、以下の構造を有していた。

【化32】



30

【0294】

siRNA

3種類のsiRNAの配列を、以下に示す。

【化33】

	センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrAr rCrUmUrCmGrCmUmUrC rArUrU	rUrGrArAmGrCmGrAr rArGmUmGrCrAmCrAr mCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArG mUrUmUrAmCmUrAmGmU mGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrAr rArAmCrUmGrAmGrC mCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrC mUrAmArUmCrArUrCrU rCrUrU	rGrArGrArUrGmArU mUrArGrGmCrAmGrAr mGrGrUrUrU
rN = 塩基NのRNA		
mN = 塩基Nの2' O-メチル修飾		

40

50

## 【0295】

インビトロ混合物試験プロトコル：

P r i c h a r d 及び S h i p m a n の方法 ( P r i c h a r d M N , a n d S h i p m a n C J r . , A n t i v i r a l R e s e a r c h , 1 9 9 0 , 1 4 ( 4 - 5 ) , 1 8 1 - 2 0 5 ; 及び、P r i c h a r d M N , e t . a l . , M a c S y n e r g y I I ) を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。H e p G 2 . 2 . 1 5 細胞培養系は、これまで S e l l s e t a l . ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A , 1 9 8 7 . V o l 8 4 : 1 0 0 5 - 1 0 0 9 ) が説明しているように、a d w 2 - サブタイプ H B V ゲノムを安定的にトランスフェクトしたヒト肝芽腫 H e p G 2 細胞に由来する細胞株である。H e p G 2 . 2 . 1 5 細胞は、デーソ様ウイルス粒子を分泌し、H B V D N A を産生し、ウイルスタンパク質、B 型肝炎 e 抗原 ( H B e A g ) 及び B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g ) もまた産生する。

10

## 【0296】

化合物混合物を試験するために、H e p G 2 . 2 . 1 5 ( 3 0 , 0 0 0 個の細胞 / ウェル ) を、9 6 ウェル組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、1 % ペニシリン - ストレプトマイシン、2 0  $\mu$  g / m L のジェネティシン ( G 4 1 8 ) 、1 0 % ウシ胎児血清を補足した R P M I + L - グルタミン培地中に播種し、加湿インキュベータ内、3 7  $^{\circ}$  C 、5 % C O <sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞に新鮮な培地を補充してから、1 0 0 % D M S O 中に溶解させた化合物 5 を、0 . 1  $\mu$  M ~ 0 . 0 0 0 0 1 5  $\mu$  M の濃度範囲で添加した。S I R N A - N P を 1 0 0 % R P M I 培地中に溶解させてから、2 . 5 n M ~ 0 . 0 2 5 n M の濃度範囲で細胞へと加えた。マイクロタイター細胞プレートを、6 日間の間、加湿インキュベータ内、3 7  $^{\circ}$  C 、5 % C O <sub>2</sub> 下でインキュベートした。系列希釈は、それぞれの化合物の E C <sub>50</sub> 値に対応した濃度範囲とし、アッセイの最終 D M S O 濃度は 0 . 5 % とした。チェッカー盤様式による化合物の混合物試験に加えて、化合物 5 及び S I R N A - N P の両方についてもまた単独で試験した。

20

## 【0297】

それぞれのプレートの複数のウェル内に、未治療陽性対照試料 ( 培地中 0 . 5 % D M S O ) を含有させた。6 日間のインキュベーション後、H B s A g 化学発光イムノアッセイ ( C L I A ) ( A u t o b i o D i a g n o s t i c s , C a t N o . C L 0 3 1 0 - 2 ) に用いるために、治療細胞から培地を除去した。H B s A g の標準曲線を生成して、H B s A g 定量レベルがアッセイの検出限界内であることを確認した。残る阻害剤治療細胞の細胞傷害性については、製造業者の取扱説明書に従い C e l l - T i t e r G l o 試薬 ( P r o m e g a ) を用いて細胞内のアデノシン三リン酸 ( A T P ) を測定することにより、また、阻害剤治療期間中にわたる細胞の顕微鏡解析を行うことにより評価した。細胞生存能を、未治療陽性対照ウェルの百分率として計算した。

30

## 【0298】

E n V i s i o n マルチモードプレートリーダー ( P e r k i n E l m e r M o d e l 2 1 0 4 ) を用いてプレートを読んだ。それぞれのウェルから生成した相対発光量 ( R L U ) データを用いて、H B s A g レベルを、未治療陽性対照ウェルのパーセント阻害として計算し、M a c S y n e r g y I I プログラム ( P r i c h a r d M N , S h i p m a n C J r . , A n t i v i r a l R e s e a r c h , 1 9 9 0 . V o l 1 4 ( 4 - 5 ) : 1 8 1 - 2 0 5 ; P r i c h a r d M N , A s e l t i n e K R , 及び S h i p m a n , C . M a c S y n e r g y I I . U n i v e r s i t y o f M i c h i g a n 1 9 9 2 ) を利用した P r i c h a r d - S h i p m a n 混合物モデルを用いて解析し、P r i c h a r d 及び S h i p m a n が定めた以下のような判定ガイドライン、9 5 % C I における相乗容積 < 2 5  $\mu$  M <sup>2</sup> % ( 対数容積 < 2 ) = おそらく有意ではない ; 2 5 ~ 5 0  $\mu$  M <sup>2</sup> % ( 対数容積 > 2 かつ < 5 ) = 小さいが有意、5 0 ~ 1 0 0  $\mu$  M <sup>2</sup> % ( 対数容積 > 5 かつ < 9 ) = 中程度、はインビボで重要となり得る ; 1 0 0  $\mu$  M <sup>2</sup> % 超 ( 対数容積 > 9 ) = 強い相乗作用、おそらくインビボで重要 ; 1 0 0 0  $\mu$  M <sup>2</sup> % に近い容積 ( 対数容積 > 9 0 ) = 異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗

40

50

的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。Microsoft ExcelのXL-Fitモジュールを用いて単剤化合物治療細胞のRLUデータを解析し、4パラメータカーブフィッティングアルゴリズムを用いてEC<sub>50</sub>値を測定した。

#### 【0299】

化合物5(half-log、3.16倍希釈系列及び8点滴定における、0.1μM~0.000015μMの濃度範囲)をSIRNA-NP(half-log、3.16倍希釈系列及び6点滴定における、2.5nM~0.025nMの濃度範囲)と混合して試験した。4回の技術的反復からなるそれぞれのアッセイを3回行うことで、混合物の結果を完了させた。Prichard及びShipmanに従った相乗容積及び拮抗容積の測定値ならびに判定については、表12eに記載している。この混合物の抗ウイルス活性については表12a1、表12a2及び表12a3に記載し、相乗容積及び拮抗容積については表12b1、表12b2及び表12b3に記載している。この混合物の相加的阻害活性については表12d1、表12d2及び表12d3に記載している。このアッセイ系において、混合物は、HBsAg分泌の相加的阻害をもたらした。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡またはCell-Titer Gloアッセイで観察されなかった(表12c1、表12c2及び表12c3)。

#### 試験1

表12a1. 化合物5及びSIRNA-NPの混合物の抗ウイルス活性：

陰性対照と比較した平均パーセント阻害(データポイントあたりn=4試料)

#### 【表12a1-1】

SIRNA-NP, μM 平均%阻害	0.0	86	85			89	90	90	89	91	86
	0.025	.5	.6	87.	88.	.6	.4	.8	.6	.4	.5
		2	9	32	31	3	2	6	7	2	2
	0.0	77	77			85	87	88	89	90	77
	0.007	.5	.9	78.	80.	.3	.6	.9	.2	.3	.5
	9	4	3	77	65	8	1	7	9	3	4
	0.0	58	51			71	78	82	85	85	58
平均%阻害	0.02	.3	.6	58.	66.	.5	.6	.9	.3	.2	.3
	5	3	5	01	99	4	8	9	1	3	3
	7.9	32	31			67	74	81	85		32
	E-0	.2	.0	41.	56.	.6	.9	.2	.8		.2
	5	8	8	8	24	6	8	2	8	85	8
平均%阻害	2.5	23	23			60	70	78	80	82	23
	E-0	.1	.8	29.	46.	.9	.1	.4	.9	.5	.1
	5	1	1	3	54	2	8	5	4	3	1
平均%阻害	0	10	15	25.	37.	55	66	75	80	79	10
		.2	.0	37	06	.5	.4	.9	.8	.6	.2

【表 1 2 a 1 - 2】

		6	9			3	3	4	6	9	6
		0	1 . 0 0 E - 0 6	3 . 1 6 E - 0 6	1 . 0 E - 0 5	3 . 1 7 E - 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6	0 . 0 0 1	0 . 0 0 3 1 6	0 . 1
化 合 物	化合物 5, $\mu$ M										

10

表 1 2 b 1 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の M a c S y n e r g y 容積計算 :  
9 9 . 9 9 % 信 頼 区 間 ( ボ ン フ ェ ロ ー ニ 調 整 9 6 % )

【表 1 2 b 1】

S I R N A - N P, $\mu$ M	0 . 0 0 2 5								- 0 . 4 9 2		
相乗作 用 0 対数容 積 0	0 . 0 0 0 7 9	0	0	0	0	0	0	7		0	0
拮抗作 用 - 3 . 6 9	0 . 0 0 0 2 5										
対数容 積 - 0 . 9 2	7 . 9 E - 0 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9
	2 . 5 E - 0 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1 . 0 0 E - 0 6	3 . 1 6 E - 0 6	1 . 0 E - 0 5	3 . 1 7 E - 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6 0 1	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 3 1 6	0 . 1
化合物	化合物 5, $\mu$ M										

20

30

40

表 1 2 c 1 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の細胞傷害性 :  
対照と比較した細胞生存能の平均パーセント

50

【表 1 2 c 1】

S I R N A - N P , $\mu$ M	0 . 0 0 2 5	1 0 3	9 7	1 0 2	1 0 2	1 0 0	1 0 1	1 0 5	1 0 9	1 0 7	1 2 3
平均%細胞生存能	0 . 0 0 0 7 9	1 0 3	9 2	9 9	9 6	1 0 5	1 0 6	1 0 1	1 0 9	1 0 1	9 8
	0 . 0 0 0 2 5	1 0 1	4 7	1 2 2	1 0 7	5 9	1 0 9	1 0 0	1 1 5	1 0 4	1 0 4
	7 . 9 E - 0 5	1 0 4	1 2 8	1 2 0	1 0 9	1 5 2	1 0 7	1 0 9	1 0 6	9 5	1 0 1
	2 . 5 E - 0 5	9 5	1 0 0	1 1 1	1 0 7	9 5	9 6	1 0 0	1 0 2	9 8	1 1 5
	0 0	1 0 0	1 1 3	1 0 9	9 9	1 0 0	9 2	1 1 1	1 1 2	1 1 0	1 3 6
		0	1 . 0 0 E - 0 6	3 . 1 6 E - 0 6	1 . 0 E - 0 5	3 . 1 7 E - 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6	0 . 0 0 1	0 . 0 0 3 1 6	0 . 1
化合物	化合物 5, $\mu$ M										

10

20

30

表 1 2 d 1 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性 :  
陰性対照と比較した相加的パーセント阻害 ( データポイントあたり n = 4 試料 )



【表 1 2 d 1 - 1】

S I R	0 .	8 3				8 9	9 2		9 6	9 6	9 6
N A -	0 0	. 8	8 5 .	8 6	8 7 .	. 8	. 8	9 4 .	. 1	. 9	. 7
N P ,	2 5	6	5 2	. 3	9 5	4	2	5 8	2	1	2
$\mu$ M	0 .										
相 加 的	0 0	7 3		7 7			8 8		9 3	9 5	9 4
% 阻 害	0 7	. 9	7 6 .	. 8	8 0 .	8 3	. 4	9 1 .	. 7	. 0	. 7
	9	5	6 2	8	5 6	. 6	2	2 6	3	1	1
	0 .										
	0 0	4 9		5 7		6 8	7 7		8 7	9 0	8 9
	0 2	. 3	5 4 .	. 0	6 2 .	. 1	. 4	8 3 .	. 8	. 3	. 7
	5	8	5 7	2	2 2	4	9	0 1	2	1	2
	7 .	2 3		3 5		5 2	6 6			8 5	8 4
	9 E	. 9	3 1 .	. 4	4 3 .	. 1	. 1	7 4 .	8 1	. 4	. 5
- 0	5	7 5	3	2 4	3	8	4 7	. 7	4	5	

10

【表 1 2 d 1 - 2】

	5										
	2 .										
	5 E	1 2		2 5		4 4	6 0		7 8	8 3	8 2
	- 0	. 1	2 1 .	. 3	3 4 .	. 6	. 9	7 0 .	. 8	. 1	. 1
	5	2	1 4	8	4 2	9	2	5	6	8	5
	0			1 5		3 7	5 5		7 5	8 0	7 9
			1 0 .	. 0	2 5 .	. 0	. 5	6 6 .	. 9	. 8	. 6
		0	2 6	9	3 7	6	3	4 3	4	6	9
		0	1 . 0	3 .	1 . 0	3 .	0 .	0 . 0	0 .	0 .	0 .
			0 E -	1 6	E - 0	1 7	0 0	0 0 3	0 0	0 0	1
			0 6	E -	5	E -	0 1	1 6	1	3 1	
				0 6		0 5				6	
化合物	化合物 5, $\mu$ M										

20

30

## 試験 2

表 1 2 a 2 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性 :

陰性対照と比較した平均パーセント阻害 ( データポイントあたり n = 4 試料 )

10

20

30

30

[illegible]

【表 1 2 b 2 - 2】

-NP, $\mu$ M 相 乗 作 用 0 対 数 容 積 0 拮 抗 作 用 - 3 . 6 2 対 数 容 積 - 0 . 9	0 0 2 5										
	0 . 0 0 0 7 9	0	0	0	0	0	0	0	0	— 3 . 6 0	
	0 . 0 0 0 2 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7 . 9 E — 0 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 . 5 E — 0 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1 . 0 0 E — 0 6	3 . 1 6 E — 0 6	1 . 0 E — 0 5	3 . 1 7 E — 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6	0 . 0 1	0 . 0 3 1 6	0 . 1
化合物	化合物 5 , $\mu$ M										

10

20

30

表 1 2 c 2 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の細胞傷害性 :  
 対照と比較した細胞生存能の平均パーセント

【表 1 2 c 2 - 1】

S I R N A - N P , $\mu$ M 平 均 % 細 胞 生 存 能	0 . 0	8									1 0
	0 2 5	8	9 0	7 4	7 6	8 2	7 7	7 4	7 5	9 0	8
	0 . 0										
	0 0 7	7									1 1
	9	7	7 2	6 7	6 8	6 5	6 7	6 8	6 5	7 1	0
	0 . 0										
平 均 % 細 胞 生 存 能	0 0 2	7									1 1
	5	9	7 5	6 6	7 3	7 1	6 7	6 4	6 3	7 4	4
	7 . 9										
	E - 0	8									1 1
	5	8	7 5	7 3	7 6	5 5	6 8	6 8	6 4	7 9	6
平 均 % 細 胞 生 存 能	2 . 5	9									1 1
	E - 0	0	8 4	6 8	7 4	6 9	7 1	6 6	6 6	8 0	0

10

【表 1 2 c 2 - 2】

	5										
	0	1									
		0			1 1			1 0	1 0	1 1	1 3
		0	9 4	9 2	3	9 0	9 8	9	8	2	3
化 合 物		0	1 . 0	3 . 1	1 .	3 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .
			0 E -	6 E -	0 E	1 7	0 0	0 0	0 0	0 0	1
			0 6	0 6	- 0	E -	0 1	0 3	1	3 1	
					5	0 5		1 6		6	
化 合 物	化合物 5 , $\mu$ M										

20

30

表 1 2 d 2 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性 :  
陰性対照と比較した相加的パーセント阻害 ( データポイントあたり n = 4 試料 )

【表 1 2 d 2】

S I R N A - N P , $\mu$ M 相 加 的 % 阻 害	0 .				8 4	8 7		9 3	9 5	9 6	
	0 0	7 7	7 9 .	8 2 .	. 7	. 4	8 8 .	. 1	. 4	. 2	9 6 .
	2 5	. 7	0 8	6 4	2	3	8 9	3	5	8	0 7
	0 .										
	0 0	6 9			7 8	8 2		9 0	9 3	9 4	
	0 7	. 0	7 0 .	7 5 .	. 8	. 5	8 4 .	. 4	. 6	. 8	9 4 .
	9	6	9 8	9 1	1	5	5 9	7	9	4	5 4
	0 .										
	0 0	4 3			6 1	6 8		8 2	8 8	9 0	
	0 2	. 8	4 7 .	5 6 .	. 5	. 3	7 2 .	. 7	. 5	. 6	9 0 .
5	4	3 2	2 8	3	3	0 3	1	4	3	0 9	
	7 .										
	9 E				3 8	4 9		7 2	8 1	8 4	
	- 0	9 .	1 5 .	2 9 .	. 2	. 1	5 5 .	. 2	. 5	. 9	8 4 .
	5	8 2	4 1	7 9	3	5	0 8	3	9	6	0 9
	2 .										
	5 E	2 3			4 7	5 6			8 4	8 7	
	- 0	. 0	2 7 .	4 0 .	. 2	. 5	6 1 .	7 6	. 2	. 1	8 6 .
	5	2	7 9	0 7	7	9	6 6	. 3	9	6	4 2
	0			2 2 .	3 1	. 6	5 0 .	. 2	. 5	. 3	8 2 .
化 合 物		0	6 . 2	1 5	. 5	1	1 9	1	9	2	3 6
		0	1 . 0	3 . 1	1 .	3 .	0 . 0	0 .	0 .	0 .	0 . 1
			0 E -	6 E -	0 E	1 7	0 0 1	0 0	0 0	0 0	
			0 6	0 6	- 0	E -		0 3	1	3 1	
					5	0 5		1 6		6	
化合物 5, $\mu$ M											

10

20

30

## 試験 3

表 1 2 a 3 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性 :  
陰性対照と比較した平均パーセント阻害 ( データポイントあたり n = 4 試料 )

【表 1 2 a 3】

S I	0 .	8 9		9 3		9 5			9 8		
R N	0 0	. 7	9 2 .	. 2	9 4	. 5	9 6 .	9 8 .	. 8		9 8 .
A -	2 5	4	0 7	5	. 5	2	9 2	1 9	7	9 9	5 9
N P	0 .										
, μ	0 0	7 6		8 4	8 7	8 9			9 7	9 7	
M	0 7	. 4	8 1 .	. 5	. 3	. 7	9 2 .	9 5 .	. 4	. 7	9 6 .
	9	8	8 1	2	8	3	9 4	8 6	2	1	7 7
平均	0 .										
% 阻	0 0	5 2		6 8		7 9			9 4	9 5	
害	0 2	. 4	6 3 .	. 7	7 4	. 2	8 5 .	9 1 .	. 7	. 3	9 3 .
	5	6	2 4	1	. 5	4	7 3	6 3	8	7	4 7
	7 .										
	9 E	3 3		5 6	6 4	7 0			9 2	9 3	
- 0	. 5	4 8 .	. 2	. 3	. 9	8 0 .	8 8 .	. 6	. 5	9 0 .	
5	2	6	4	4	7	0 5	2 9	9	2	8 7	
	2 .										
	5 E	1 9		4 6	5 6	6 4			9 1	9 2	
- 0	. 2	3 7 .	. 8	. 6	. 7	7 5 .	8 5 .	. 1	. 1	8 8 .	
5	6	5 7	6	9	5	7 7	7 8	3	4	9 1	
	0			3 4	4 6	5 6			8 9	9 0	
			2 2 .	. 1	. 3	. 3	6 9 .	8 2 .	. 0	. 2	8 6 .
		0	6 8	8	6	4	9 9	3 9	1	6	2 6
		0	1 . 0	3 .	1 .	3 .	0 . 0	0 . 0	0 .	0 .	0 . 1
			0 E -	1 6	0 E	1 7	0 0 1	0 0 3	0 0	0 0	
			0 6	E -	- 0	E -		1 6	1	3 1	
				0 6	5	0 5				6	
化 合 物	化合物 5, μ M										

10

20

30

表 1 2 b 3 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の M a c S y n e r g y 容積計算 :  
 9 9 . 9 9 % 信 頼 区 間 ( ボ ン フ ェ ロ ー ニ 調 整 9 6 % )

【表 1 2 b 3 - 1】

S I R N	0 . 0										
A - N P	0 2 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
,	0 . 0										
$\mu$ M	0 0 7										
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
相 乗 作 用	0 . 0										
0	0 0 2										
対 数 容 積	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	7 . 9										
	E - 0										
拮 抗 作 用	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

【表 1 2 b 3 - 2】

0	2 . 5										
対 数 容 積	E - 0										
0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1 . 0 0	3 . 1 6	1 . 0	3 . 1 7	0	0 .	0	0	0
			E - 0 6	E - 0 6	E - 0	E - 0 5	.	0 0	.	.	.
					5		0	0 3	0	0	1
							0	1 6	0	0	
							0		1	3	
							1			1	
										6	
化合物	化合物 5, $\mu$ M										

20

30

表 1 2 c 3 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の細胞傷害性 :  
 対照と比較した細胞生存能の平均パーセント

【表 1 2 c 3】

S I R N A - N P , $\mu$ M 平均 % 細胞生 存能	0 . 0 0 2 5		1 1 6	1 1 2	1 2 4	1 1 2	1 2 6	1 2 4	1 2 2	1 2 2	9 5
	0 . 0 0 0 7 9	1 0 3	1 1 5	1 1 2	1 2 3	1 0 9	1 1 8	1 2 5	1 2 7	1 2 6	1 2 4
	0 . 0 0 0 2 5	1 1 5	1 3 5	1 2 9	1 4 0	1 1 9	1 3 5	1 2 9	1 4 8	1 3 6	1 2 2
	7 . 9 E - 0 5	1 1 3	1 2 9	1 3 1	1 3 3	1 3 0	1 3 9	1 3 1	1 3 8	1 4 6	1 3 0
	2 . 5 E - 0 5	1 1 3	1 5 3	1 4 0	1 4 0	1 3 1	1 3 4	1 3 7	1 4 7	1 4 3	1 2 4
	0	1 0 0	1 3 1	1 2 7	1 4 0	1 3 1	1 2 8	1 3 1	1 4 1	1 2 7	9 9
		0	1 . 0 0 E - 0 6	3 . 1 6 E - 0 6	1 . 0 E - 0 5	3 . 1 7 E - 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6	0 . 0 0 1	0 . 0 0 3 1 6	0 . 1
化合物	化合物 5 , $\mu$ M										

10

20

30

表 1 2 d 3 . 化合物 5 及び S I R N A - N P の混合物の抗ウイルス活性 :  
陰性対照と比較した相加的パーセント阻害 ( データポイントあたり n = 4 試料 )



【表 1 2 d 3】

S I R N A — N P , $\mu$ M 相 加 的 % 阻 害	0 . 0 0 2 5	8 9 . 7 4	9 2 . 0 7	9 3 . 2 5	9 4 . . 5	9 5 2	9 6 2	9 8 9	9 8 7		9 8 . 5 9
	0 . 0 0 0 7 9	7 6 . 4 8	8 1 . 8 1	8 4 . 5 2	. 3 8	. 7 3	. 9 4	. 8 6	. 4 2	. 7 1	. 7 7
	0 . 0 0 0 2 5	5 2 . 4 6	6 3 . 2 4	6 8 . 7 1	7 4 . . 5	. 2 4	. 7 3	. 6 3	. 7 8	. 3 7	. 4 7
	7 . 9 E — 0 5	3 3 . 5 2	4 8 . 6	5 6 . 2 4	. 3 4	. 9 7	. 0 5	. 2 9	. 6 9	. 5 2	. 8 7
	2 . 5 E — 0 5	1 9 . 2 6	3 7 . 5 7	4 6 . 8 6	. 6 9	. 7 5	. 7 7	. 7 8	. 1 3	. 1 4	. 9 1
	0		2 2 . 6 8	3 4 . 1 8	. 3 6	. 3 4	. 9 9	. 3 9	. 0 1	. 2 6	. 2 6
		0	1 . 0 0 E — 0 6	3 . 1 6 E — 0 6	1 . 0 E — — 0 5	3 . 1 7 E — 0 5	0 . 0 0 0 1	0 . 0 0 0 3 1 6	0 . 0 0 1	0 . 0 0 3 1 6	0 . 1
化 合 物	化合物 5, $\mu$ M										

表 1 2 e . C L I A を用いた H B s A g 定量を伴う H e p G 2 . 2 . 1 5 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 1 2 e】

試 験 1	化合物 5 E C <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	S I R N A — N P E C <sub>50</sub> (n M)	相 乗 容 積 ( $\mu$ M <sup>2</sup> %)	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 作 用 ( $\mu$ M <sup>2</sup> %)	拮 抗 対 数 容 積	判 定
1	0 . 0 0 2	0 . 0 0 0 2 6	0	0	— 3 . 6 9	— 0 . 9 2	相加的
2	0 . 0 0 5	0 . 0 0 0 3 5	0	0	— 3 . 6 2	— 0 . 9	相加的
3	0 . 0 0 2	0 . 0 0 0 2 0	0	0	0	0	相加的

\* 9 9 . 9 % 信 頼 区 間

【 0 3 0 0 】

## 実施例 1 3

インビトロ混合物試験の目的：

10

20

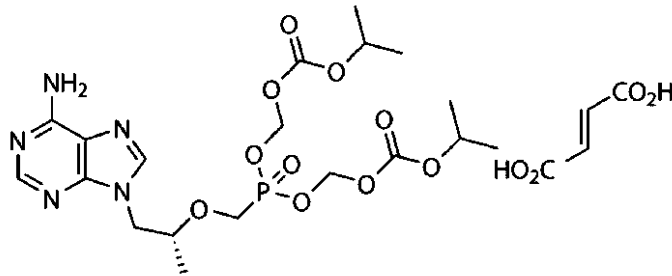
30

40

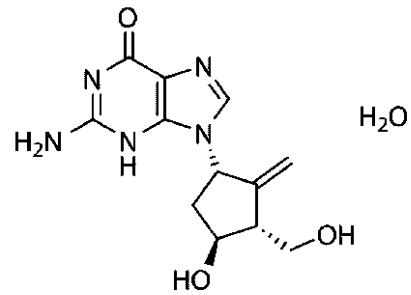
50

この試験の目的は、HBV細胞培養モデル系を用いて、テノホビル（プロドラッグであるテノホビルジソプロキシルフマレート、すなわちTDFの形態、HBVポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤）、またはエンテカビル（エンテカビル水和物、すなわちETVの形態、HBVポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤）、及び、SIRNA-NP（全てのウイルスmRNA転写物及びウイルス抗原の強力なノックダウンを促進することを目的とするsiRNA）からなる2種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

テノホビル及びエンテカビルの化学構造：



テノホビルジソプロキシルフマレート(TDF)



エンテカビル(ETV)水和物

10

20

#### 【0301】

SIRNA-NPの組成：

SIRNA-NPは、HBVゲノムを標的とする3種類のsiRNAの混合物の脂質ナノ粒子製剤である。HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子(LNP)製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語DSPCとはジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味し、またPEGとはPEG2000のことを意味する。

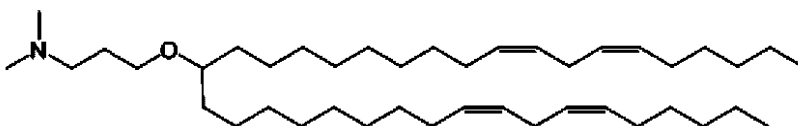
#### 【化35】

PEG (2000) - C - DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

30

カチオン性脂質は、以下の構造を有していた。

#### 【化36】



40

#### 【0302】

3種類のsiRNAの配列を、以下に示す。

## 【化 3 7 - 1】

センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')
r C r C m G r U m G m U r G r C r A r C r U m U r C m G r C m U m U r C r A r U r U	r U r G r A r A m G r C m G r A r A r G m U m G r C r A m C r A m C m G r G r U r U
r C m U m G m G r C m U r C r A r	r C r A r C r U r A m G m U r A r

## 【化 3 7 - 2】

G m U r U m U r A m C m U r A m G m U m G r U r U	A r A m C r U m G r A m G r C m C r A r G r U r U
r A m C r C m U r C m U r G m C r C m U r A m A r U m C r A r U r C r U r C r U r U	r G r A r G r A r U r G m A r U m U r A r G r G m C r A m G r A m G r G r U r U r U
r N = 塩基NのRNA	
m N = 塩基Nの2' O-メチル修飾	

## 【0 3 0 3】

インビトロ混合物試験プロトコル：

P r i c h a r d 及び S h i p m a n の方法 ( P r i c h a r d M N , S h i p m a n C , J r . , A n t i v i r a l R e s , 1 4 , 1 8 1 - 2 0 5 ( 1 9 9 0 ) ) を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。G u o e t a l . ( G u o e t a l . , J V i r o l , 8 1 , 1 2 4 7 2 - 1 2 4 8 4 ( 2 0 0 7 ) ) に記載のとおり、H e p D E 1 9 細胞株を分化させた。H B V ゲノムを安定的にトランスフェクトされ、H B V p r e g e n o m i c R N A を発現して H B V r c D N A ( 弛緩型開環状 D N A ) 合成をテトラサイクリン制御様式で補助できるのは、ヒト肝細胞癌細胞株である。H e p D E 1 9 細胞を、9 6 ウェルの組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、1 0 % ウシ胎児血清 + 1 % ペニシリン - ストレプトマイシンを補足した D M E M / F 1 2 培地 ( テトラサイクリン非含有 ) 中に播種し、加湿インキュベータ内、3 7 °C、5 % C O <sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を新鮮な培地へと移してから、阻害剤 A 及び阻害剤 B を用い、それらの対応する E C <sub>50</sub> 値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、3 7 °C、5 % C O <sub>2</sub> 下で 7 日間の間インキュベートした。阻害剤を、1 0 0 % D M S O 中 ( E T V 及び T D F ) または増殖培地中 ( S I R N A - N P ) のいずれかで希釈し、アッセイ中の最終 D M S O 濃度を 0 . 5 % とした。それぞれの濃度の阻害剤 A をそれぞれの濃度の阻害剤 B と混合させるようなチェッカー盤様式で、2 種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、r c D N A 産生阻害におけるそれら混合物の効果を測定した。4 8 時間のインキュベーション後、H B V 特異的カスタムプローブセット及び製造業者の取扱説明書を備えた b D N A アッセイ ( A f f y m e t r i x ) を用いて、阻害剤治療したウェル中に存在する r c D N A レベルを測定した。それぞれのウェルから生成した R L U データを、未治療対照ウェルの % 阻害として計算し、M a c S y n e r g y I I プログラムを用いて解析し、P r i c h a r d 及び S h i p m a n が定めた以下のような判定ガイドライン、9 5 % C I における相乗容積 < 2 5 μ M <sup>2</sup> % ( 対数容積 < 2 ) = おそらく有意ではない ; 2 5 ~ 5 0 μ M <sup>2</sup> % ( 対数容積 > 2 かつ < 5 ) = 小さいが有意、5 0 ~ 1 0 0 μ M <sup>2</sup> % ( 対数容積 > 5 かつ < 9 ) = 中程度、はインビボで重要となり得る ; 1 0 0 μ M <sup>2</sup> % 超 ( 対数容積 > 9 ) = 強い相乗作用、おそらくインビボで重要 ; 1 0 0 0 μ M <sup>2</sup> % に近い容積 ( 対数容積 > 9 0 ) = 異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。同時に、製造業者の取扱説明書に従い C e l l - T i t e r G l o 試薬 ( P r o m e

g a ) を用いて細胞生存能の測定値としての A T P 含有量を測定するのに使用した複製プレートを用いて、細胞生存能に対する阻害剤混合物の効果を評価した。

【 0 3 0 4 】

結果及び判定：

T D F 及び S I R N A - N P のインビトロ混合物：

T D F ( 2 倍希釈系列及び 1 0 点滴定における、 $1.0 \mu\text{M} \sim 0.004 \mu\text{M}$  の濃度範囲 ) を S I R N A - N P ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、 $25 \text{ ng/mL} \sim 0.309 \text{ ng/mL}$  の濃度範囲 ) と混合して試験した。T D F または S I R N A - N P による治療 ( 単独または混合 ) のいずれかにおいて測定された r c D N A の平均 % 阻害及び 4 点の複製の標準偏差については、表 1 3 a に記載している。T D F 及び S I R N A - N P の  $E C_{50}$  値については、表 1 3 c に記載している。M a c S y n e r g y I I 解析に従い、また P r i c h a r d 及び S h i p m a n ( P r i c h a r d M N . 1 9 9 2 . M a c S y n e r g y I I , U n i v e r s i t y o f M i c h i g a n ) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用 ( 表 1 3 a ) から予想される値と比較すると、混合物が相加的であることが判明した ( 表 1 3 c ) 。

10

【 0 3 0 5 】

エンテカビル及び S I R N A - N P のインビトロ混合物：

エンテカビル ( 2 倍希釈系列及び 1 0 点滴定における、 $4.0 \text{ nM} \sim 0.004 \mu\text{M}$  の濃度範囲 ) を S I R N A - N P ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、 $25 \text{ ng/mL} \sim 0.309 \mu\text{g/mL}$  の濃度範囲 ) と混合して試験した。E T V または S I R N A - N P による治療 ( 単独または混合 ) のいずれかにおいて測定された r c D N A の平均 % 阻害及び 4 点の複製の標準偏差については、表 1 3 b に記載している。E T V 及び S I R N A - N P の  $E C_{50}$  値については、表 1 3 c に記載している。2 種の阻害剤を上記濃度範囲で混合した場合、M a c S y n e r g y I I 解析に従い、また P r i c h a r d 及び S h i p m a n ( 1 9 9 2 ) による上記の判定基準を用いると、その濃度の混合物が相加的であることが判明した。

20

表 1 3 a : テノホビルジボボキシルフマレート及び S I R N A - N P のインビトロ混合物

【 表 1 3 a - 1 】

[薬 物]	5										平均%阻害
	0 0 0 0 1										
	. . . . .										
	0 . 0 . 0 . 0 . 0 1 2 5 0										
	0 0 0 0 0 1 0 3 6 2 5 0 0										
	0	4	8	6	1	3	5	0	0	0	
S I R N A - N P n g ／m L	T D F ( $\mu$ M)										
	9	9	0	9	4	9	3	9	3	9	
	3	.	9	.	4	.	3	.	5	5	
2 5	.	1	8	1	9	.	.	.	.	.	

30

40

[illegible]

40

【表 1 3 a - 3】

	.	7 8	1	3 6	4 4	.	.	.	.	.	
	2					7	5	3	8	7	
	3					7	7	1	8		
	5					1	2	3	3	2	
8.	.					.	.	.	.	.	
3 3	3	4 .	6 .	5 .	3 .	8	8	6	1	0	
3	8	1 5	0 1	3 2	9 7	2	9	1	3	2	
	1										
	3					5		1	1	1	
2.	.			1 4	1 2	.	3	.	.	.	
7 7	1		6 .	. 1	. 4	2	.	9	1	3	
8	2	1 2	2 1	2	2	9	1	2	2	4	
	1										
	6					5	6	2	2		
0.	.		2 9	1 6	2 1	.	.	.	.	1	
9 2	9	9 .	. 3	. 4	. 1	8	3	1	2	.	
6	1	7 3	3	5	4	3	9	6	9	2	
	1					2	1				
	2					5	7	6	5	1	
0.	.	4 3	3 3	1 9	5 2	.	.	.	.	.	
3 0	0	. 0	. 5	. 8	. 1	6	4	6	5	7	
9	4	2	8	9	9	5	7	1	8	9	
						2		1			
						1	1	2	1	0	
			4 4	2 6	5 4	.	5	.	.	.	
		2 3	. 9	. 9	. 1	7	.	8	6	9	
0	0	. 5	6	5	7	2	9	6	4	9	
						0					
						.	0				
		0 .	0 .	0 .	0 .	0	.	0			
		0 0	0 0	0 1	0 3	6	1	.	0		
[薬		3 9	7 8	5 6	1 2	2	2	2	.		
物]	0	0 6	1	3	5	5	5	5	5	1	相加の阻害
S I											
R N											
A -											
N P											
n g											
/ m											
L											
2 5	9	9 3	9 3	9 3	9 4	9	9	9	9	9	

10

20

30

40

T D  
F (μ  
M)

10

20

30

相乗作用プロット  
(99.9%)

ボ ン フ  
エ ロ ー  
ニ調整 96%

相 乘 作 0

【表 1 3 a - 5】

. 0											用
8.											
3 3											対 数 容
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	積 0
2.											
7 7											
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.											
9 2											拮 抗 作
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	用 0
0.											
3 0											対 数 容
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	積 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

10

表 1 3 b : エンテカビル及び S I R N A - N P のインビトロ混合物

20



【表 1 3 b - 1】

[ 薬物 ]	0 0 0 0 1 2 4										平均%阻害
	. . . . .										
	0 . 0 . 0 1 2 5 0 0 0										
	0 1 0 3 6 2 5 0 0 0										
0 6 1 3 5 0 0 0 0 0											
S I R N A - N P n g / m L											ETV (n M)
2 5	9					9	9	9	9	9	
	4	9				3	5	2	5	4	
	.	9	2	9	3	4	.	.	.	.	
	3	.	3	.	8	.	8	2	8	4	
	1	8		6	7	5	1	8	9	8	
8 . 3 3 3	9					9	9	9	9	9	
	0	8				0	2	4	4	5	
	.	9	1	9	1	9	.	.	.	.	
	4	.	4	.	7	.	9	3	0	3	
	1	4		1	9	1	4	3	3	7	
2 . 7 7 8 0 . 9	7	7					8	8	9	9	
	6	5				7	2	6	0	2	
	.	7	4	6	2	.	9	.	.	.	
	7	.	6	.	8	2	.	0	3	7	
	4	1		1	6	3	4	8	6	8	
0 . 9	4	3	9	4	1	5	4	4	6	7	

【表 1 3 b - 2】

2 6	6	.	1	.	3	8	8	9	2	2	2	6	
	.	6		7	.	.	.	.	.	.	.	.	
	8					2	8	9	3	8	8	4	
	4					9	8	4	9	2	1	2	
	2							1	2	5	7	7	
	8					5		9	7	6	3	9	
	.	2	7	1	2	.	8	.	.	.	.	.	
0 . 3	6	.	7	.	1	9	.	1	5	0	1	2	
0 9	8	8		8		3	2	8	5	1	1	3	
						—	—	—	—				
						3	2	2	1	4	5	6	
						0	3	1	0	1	8	9	
		—	4	—	5	.	.	.	.	.	.	.	
		3	.	0	.	2	4	2	2	7	3	9	
0	0	7	2	0	7	6	7	5	4	1	5	9	
						0							
						.	0						
		0	.	0	.	0	.	0					
		0	1	0	3	6	1	.	0				
[ 薬物 ]		5	6	1	2	2	2	2	.				
	0	2	5	5		5	5	5	5	1	2	4	
S I R													
N A —													
N P													
n g /													
m L													
	1							3	4	3	3	1	
	.					3	2	.	.	.	.	.	
	6	6	.	2	.	.	.	8	8	6	1	2	
2 5	7	1	8	6	3	7	4	3	9	5	5	2	
	2					8		1	2	3	1	2	
	.					.	2	.	.	.	.	.	
8 . 3	8	5	.	5	.	6	.	6	1	0	4	4	
3 3	6	0	3	6	5	3	5	8	8	7	4	7	
	1					1							
	2					1	9	4	4	2	2	6	
	.			3	2	.	.	.	.	.	.	.	
2 . 7	2	9	.	.	2	8	3	9	8	2	6	7	
7 8	8	5	5	2		6	1	5	7	5	4	9	
0 . 9	1	2	2	3	5	8	2	1	1	7	4	5	
2 6	7	.	1	.	1	.	5	7	7	.	.	.	

10

20

標準偏差 (%)

E T V  
( n M  
)

30

40

[illegible]

40

【表 1 3 b - 4】

0 . 3 0 9       0	.	2	.	.	.	.	.	.	.	.
	8		7	3	5	4	0	8	0	
	4		5	6	4		1	6	5	
	2			1	1	2	5			
	8			1	3	1	8	7	7	
	.	— 7	7	.	.	.	.	0	8	
	6	— 2	. 0	.	9	5	3	4	.	.
	8	. 5	3	1	4	2	8	3	3	6
				—	—	—	—			
				3	2	2	1	4	5	6
[ 薬 物 ]				0	3	1	0	1	8	9
		— 4	— 5	.	.	.	.	.	.	.
		3	. 0	. 2	4	2	2	7	3	9
	0	0	7 2	0 7	6	7	5	4	1	5 9
S I R N A — N P n g / m L 2 5 . 0 8 . 3 3 3 2 . 7 7 8 0 . 9 2 6 0 . 3 0 9 0				0	0	0	0			
		0	. 0	. 0	1	2	5			
	0	0 2	0 3	6	3	5	0	1	2	4
相乗作用プロッ ト (99.9%) ボンフェ ローニ調 9 6 整 %										
相乗作用 0 対数容積 0  拮抗作用 0 対数容積 0										

表 1 3 c : bDNA アッセイを用いた r cDNA 定量を伴う AML 1 2 - H B V 1 0 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約 :

【表 1 3 c - 1】

		／m L							
		)							
S I R	テ ノ ホ								
N A -	ビル	0 . 9	0 . 0						
NP	( T D	4 7	8 9	0	0	0	0	相加的	
	F , μ								
	M)								
S I R	エ ン テ								
N A -	カ ビ ル	0 . 9	1 . 7	5 . 3	0 .				
NP	( E T	0 6	8 0	7	7 7	0	0	相加的	
	V , n								
	M)								

\* 99.9%信頼区間

【 0 3 0 6 】

### 实施例 14

以下の化合物について、実施例で言及する。化合物 20 は、周知の手順を用いて調製可能である。例えば、化合物 20 は、国際特許出願公開番号 WO 2015113990 に記載のとおり調製することができる。

## 【化 3 8】

化合物の番号または名称	構造
20	

【 0 3 0 7 】

B型肝炎ウイルス（HBV）のマウスモデルを用いて、sAg産生低分子阻害剤及びHBV標的化siRNA（SIRNA-NP）の抗HBV効果を評価した（独立した治療薬として、互いを混合しての両方で）。

【 0 3 0 8 】

HBV siRNAを送達するために、以下の脂質ナノ粒子（LNP）製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語DSPCとは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

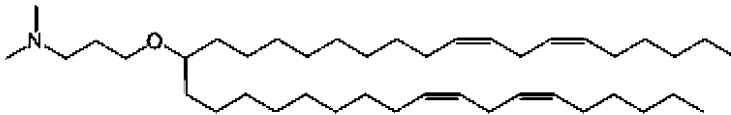
## 【化 3 9】

PEG (2000) -C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	DSPC
1. 6	54. 6	32. 8	9

## 【0309】

カチオン性脂質は、以下の構造を有していた。

## 【化 4 0】



10

AAV1. 2の1E11ウイルスゲノム (Huang, L R et al. Gastroenterology, 2012, 142 (7): 1447 - 50に記載されている) を、C57/B16マウスに尾静脈投与した。このウイルスベクターは、HBVゲノムの1. 2倍過剰に長い複製を有し、HBV産物の中でも特にHBV表面抗原 (HBsAg) を発現している。酵素免疫アッセイを用いて、マウスにおける血清HBsAg発現をモニターした。血清HBsAgレベルに基づき、a) 全ての動物がHBsAgを発現することが確認されるように、及び、b) 治療開始前のHBsAg群における平均値が互いに類似となるように、動物を群へと分類した (無作為化した)。

20

## 【0310】

化合物20を用いて、以下のように動物を治療した。0日目から開始して、3. 0mg / kg用量の化合物20を、0日目～28日目に毎日2回の頻度、合計56回の用量で、動物に経口投与した。投与するために、化合物20を共溶媒製剤中に溶解させた。陰性対照動物に対して、共溶媒製剤単独の投与か、または、いかなる試験薬でも治療しないか、のいずれかを行った。脂質ナノ粒子 (LNP) に封入したHBV標的化siRNAを用いて、以下のように動物を治療した。0日目に、0. 3mg / kg siRNAに相当する量の試験薬を静脈内投与した。それぞれの治療におけるHBsAg発現レベルを、その群における0日目 (投与前) の値と比較した。

30

## 【0311】

0日目 (治療前)、7日目、14日目及び28日目に血液を採取して、それらの血清HBsAg含有量を解析することにより、これら治療薬の効果を測定した。0日目における治療前のベースライン値に対する個々の動物の百分率として表される、治療群の平均 (n = 5 (siHBV及び溶媒の混合物治療薬ではn = 4) ; ±標準誤差) 血清HBsAg濃度を表14に示す。

## 【0312】

データは、化合物20及びHBV siRNAの混合物 (単独及び混合の両方で) に応答して血清HBsAgが低下する度合いを示している。試験を行った全時点において、化合物20及びHBV siRNAの混合物治療薬は、個々の単剤治療薬のいずれかと同等またはそれらより優れた血清HBsAg低下を生じさせた。

40

表14. 化合物20及び3種のHBV siRNAによる、HBV感染症マウスモデルの血清HBV sAgにおける単独及び混合の治療効果

【表 1 4】

治療 1 (経口)	治療 2 (I V)	0 日 目	7 日 目	1 4 日 目	2 1 日 目	2 8 日 目
無	無	1 0 0 ± 0	8 0 ± 1 2	1 0 0 ± 1 8	7 2 ± 1 5	7 2 ± 1 6
溶媒	無	1 0 0 ± 0	3 7 ± 8	6 2 ± 9	1 1 2 ± 6 6	1 2 7 ± 6 7
化合物 2 0	無	1 0 0 ± 0	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
溶媒	H B V <sub>s</sub> i R N A	1 0 0 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	1 9 ± 9	4 5 ± 2 5
化合物 2 0	H B V <sub>s</sub> i R N A	1 0 0 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	5 ± 2	8 ± 2

10

## 【 0 3 1 3 】

実施例 1 5 ~ 2 4

初代ヒト肝細胞試験における原料及び方法

動物

F R G マウスを Y e c u r i s ( T u a l a t i n , O R , U S A ) から購入した。マウスの詳細な情報については、以下の表に記載している。本試験は、W u X i I A C U C ( I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e , I A C U C p r o t o c o l R 2 0 1 6 0 3 1 4 - M o u s e ) により承認済みであった。マウスを新しい環境に 7 日間馴化させた。全身健康、ならびに、生理学的異常及び行動異常に関するあらゆる徴候について、マウスを毎日観察した。

F R G マウスのテクニカルデータ

20

## 【化 4 1】

ケージ ID	マウス ID	ドナー ID	出生日	移植日	出荷前のアルブミン ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	性別	出荷前のBW (g)
1	37094	HHM30017	12/15/2015	01/28/2016	4887	雄	24.9
2	37211	HHM27018	01/03/2016	02/24/2016	4284	雄	23.5
3	37258	HHM27018	01/06/2016	02/24/2016	4282	雄	29.4
4	37611	HHM30017	02/22/2016	04/06/2016	6627	雄	25.3
5	37955	HHM27018	03/31/2016	05/19/2016	5990	雄	25.5
6	37900	HHM27018	03/23/2016	05/04/2016	4802	雄	27.1
7	37976	HHM27018	03/20/2016	05/04/2016	4520	雄	24.7

10

20

30

## 【0314】

## 試験薬

化合物 3、22、23、24 及び 25 は、Arbutus Biopharma から提供された。Peg-インターフェロン-2a (Roche,  $180\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ ) は、WuXi から提供された。TAF、エンテカビル、テノホビル、ラミブジン及び TDF は、DMSO 溶液で WuXi から提供された。化合物に関する情報については、以下の表に記載している。

## 試験薬の情報



## 【化 4 2】

化合物名	バイアル I D	M (重量)	サイズ	供給業者
2 5	0 3 1 N H	4 0 1 . 1 9	3 . 1 m g	A r b u t u s
3	0 3 1 N R	3 8 6 . 4	3 . 8 m g	A r b u t u s
2 2	0 3 1 N P	3 9 8 . 4	2 . 9 m g	A r b u t u s
2 3	0 3 1 N T	3 7 9 . 3	2 . 9 m g	A r b u t u s
2 4	0 3 1 N V	3 9 6 . 8	2 . 6 m g	A r b u t u s
化合物名	供給業者	カタログ 番号	在庫濃度	
P e g インターフ ェロン α - 2 a	R o c h e		1 8 0 μ g / 0 . 5 m l ( 5 0 4 0 0 0 0 I U / m l )	W u X i が 提供
T A F	S e l l e c k C h e m	S 7 8 5 6	1 0 m M	W u X i が 提供
T D F	S h a n g h a i S p h c h e m C o . , L t d .		2 0 m M	W u X i が 提供

## 【 0 3 1 5 】

## ウイルス

H e p G 2 . 2 . 1 5 培養上清から、D 型 H B V を濃縮した。ウイルスの情報については、以下の表に記載している。

## H B V の情報

## 【化 4 3 - 1】

ウイルス I D	ロット #	血清中の H B V 力価 ( G E * / m l )	遺伝子型	ソース
H B V _ 2 . 2 . 1 5	H B V 2 0 1 6 0 4 0 7	2 . 0 0 E + 0 9 G E / m l	D ( G e n e b a n k I D : U 9 5 5 5 1 )	H e p G 2 . 2 . 1 5 上清
H B V _ 2 . 2 . 1 5	B 1 6 1 0 1 1	1 . 9 E + 0 9 G E / m l	D ( G e n e b a n k I D : U 9 5 5 5 1 )	H e p G 2 . 2 . 1 5 上清

## 【化 4 3 - 2】

HBV__2 . 2. 15	B 1 6 1 1 2 9	1. 5 E + 0 9 GE / ml	D (Geneban k ID : U95 5 5 1)	HepG2. 2. 15 上清
-------------------	------------------	-------------------------	---------------------------------------	--------------------

\*GE、HBVゲノム当量

## 【0316】

## 試薬

本試験に用いた主な試薬は、QIAamp 96 DNA Blood Kit (QIAGEN #51161)、FastStart Universal Probe Master (Roche #04914058001)、Cell Counting Kit-8 (CKK-8) (Biolite #35004)、HBeAg ELISA kit (Antu #CL0312)、及び、HBsAg ELISA kit (Antu #CL0310)であった。

## 【0317】

## 機器

本試験に用いた主な機器は、BioTek Synergy 2, SpectraMax (Molecular Devices)、7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI)、及び、Quantistudio 6 Real-Time PCR System (ABI)であった。

## 【0318】

## 初代ヒト肝細胞 (PHH) の採取

マウスに対して肝灌流を行いPHHを単離した。単離肝細胞をパーコールで更に精製した。細胞を培地に再懸濁させてから、96ウェルプレート ( $6 \times 10^4$  個の細胞/ウェル) または48ウェルプレート ( $1.2 \times 10^5$  個の細胞/ウェル) 内に播種した。播種の1日後 (1日目) に、PHHをD型HBVに感染させた。

## 【0319】

## PHHの培養及び治療

2日目、試験化合物を希釈してから細胞培養プレートに加えた。化合物を含有する培地を1日おきに新しいものに交換した。HBV DNA測定及び抗原測定のため、細胞培養上清を8日目に回収した。

## 【0320】

EC<sub>50</sub> 値の測定

化合物を、7種の濃度、3倍希釈で3回試験した。

## 【0321】

## 2種混合物試験

3枚のプレートを用い、2種の化合物を5×5マトリックスで試験した。

## 【0322】

8日目におけるCell Counting Kit-8による細胞傷害アッセイ  
細胞培養プレートから培地を除去してから、CKK8 (Biolite #35004) 希釈標準溶液を細胞に加えた。プレートを37℃でインキュベートしてから、SpectraMaxを用いて、吸光度を450nm波長で測定し、また参照吸光度を650nm波長で測定した。

## 【0323】

## qPCRによる培養上清中HBV DNAの定量

8日目に回収した培養上清中のDNAを、QIAamp 96 DNA Blood Kit (Qiagen - 51161) で単離した。それぞれの試料につき、100µlの培養上清を用いてDNAを抽出した。DNAを100µl、150µlまたは180µl

10

20

30

40

50

の A E で溶出させた。培養上清中の H B V DNA を q P C R で定量した。M a c S y n e r g y ソフトウェアを用いて、混合物の効果を解析した。プライマーについて以下に記載する。

プライマー情報

【化 4 4】

プライマー R	G A C A A A C G G G C A A C A T A C C T T
プライマー F	G T G T C T G C G G C G T T T T A T C A
プローブ	5' F A M C C T C T K C A T C C T G C T G C T A T G C C T C A T C 3' T A M R A

10

【 0 3 2 4】

E L I S A による培養上清中 H B s A g 及び H B e A g の測定

8 日目に回収した培養上清中の H B s A g / H B e A g を、マニュアルに従い H B s A g / H B e A g E L I S A k i t ( A u t o b i o ) で測定した。標準曲線範囲のシグナルを得るために、試料を P B S で希釈した。以下の式を用いて阻害率を計算した。M a c S y n e r g y ソフトウェアを用いて、混合物の効果を解析した。

【数 1】

$$\% \text{阻害 H B s A g} = \left[ \frac{\text{【試料の 1 - H B s A g 量】}}{\text{【DMSO 対照の H B V 量】}} \right] \times 100$$

20

$$\% \text{阻害 H B e A g} = \left[ \frac{\text{【試料の 1 - H B e A g 量】}}{\text{【DMSO 対照の H B V 量】}} \right] \times 100$$

【 0 3 2 5】

S I R N A - N P

S I R N A - N P は、H B V ゲノムを標的とする 3 種類の s i R N A の混合物の脂質ナノ粒子製剤である。H B V s i R N A を送達するために、以下の脂質ナノ粒子 ( L N P ) 製剤を用いた。表に記載した数値はモル百分率である。略語 D S P C とは、ジステアロイルホスファチジルコリンのことを意味する。

【化 4 5】

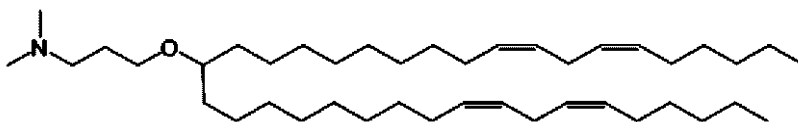
30

PEG-C-DMA	カチオン性脂質	コレステロール	D S P C
1. 6	54. 6	32. 8	10. 9

【 0 3 2 6】

カチオン性脂質は、以下の構造を有していた。

【化 4 6】



40

【 0 3 2 7】

3 種類の s i R N A の配列を、以下に示す。

【化 4 7 - 1】

	センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')
	r C r C m G r U m G m U r G r C r	r U r G r A r A m G r C m G r A r
	A r C r U m U r C m G r C m U m U	A r G m U m G r C r A m C r A m C

## 【化 4 7 - 2】

	r C r A r U r U	m G r G r U r U
	r C m U m G m G r C m U r C r A r G m U r U m U r A m C m U r A m G m U m G r U r U	r C r A r C r U r A m G m U r A r A r A m C r U m G r A m G r C m C r A r G r U r U
	r A m C r C m U r C m U r G m C r C m U r A m A r U m C r A r U r C r U r C r U r U	r G r A r G r A r U r G m A r U m U r A r G r G m C r A m G r A m G r G r U r U r U
	r N = 塩基NのRNA	
	m N = 塩基Nの2' O-メチル修飾	

10

## 【 0 3 2 8】

PEG化インターフェロン 2 a ( I F N 2 a ) の組成  
この薬剤は、商業的供給源から購入した。

## 【化 4 8】

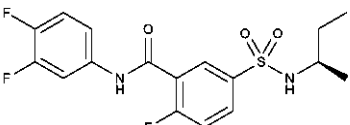
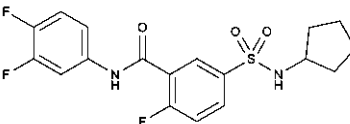
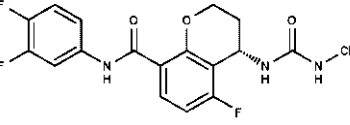
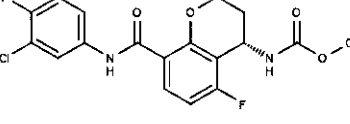
試料 I D	供給業者	サイズ	ロットナン バー	在庫濃度
P e g インターフェ ロン α - 2 a	R o c h e	1 8 0 u g ／ 0 . 5 m l	B 1 3 7 0	5 0 4 0 0 0 0 I U / m L

20

## 【 0 3 2 9】

以下の化合物もまた用いた。

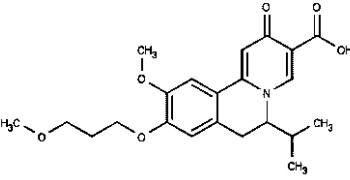
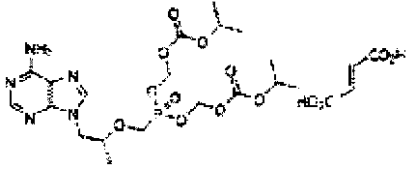
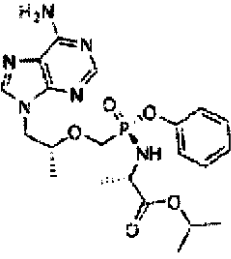
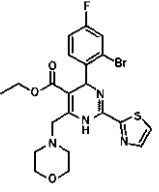
## 【化 4 9 - 1】

化合物の名称または I D ナンバー	構造
3	
2 2	
2 3	
2 4	

30

40

## 【化 4 9 - 2】

25	
テノホビルジソプロキシルフマレート (TDF)	
テノビルアラフェナミド (TAF)	
GLS4 (HAP)	

10

20

## 【0330】

## 実施例 15

## 化合物 24 及び TDF のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の HBV 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 24 (アミノクロマン化学クラスに属する HBV 封入低分子阻害剤) 及びテノビル (プロドラッグであるテノビルジソプロキシルフマレート、すなわち TDF の形態、HBV ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

30

## 【0331】

## 結果及び判定

TDF (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 nM ~ 0.12 nM の濃度範囲) を 24 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、1000 nM ~ 12.36 nM の濃度範囲) と混合して試験した。24 または TDF による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定された HBV DNA、HBsAg 及び HBeAg の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 15a、表 15b 及び表 15c に記載している。TDF 及び 24 の EC<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 15d に記載している (異なるロットの PHH 細胞に若干の違いが認められた)。

40

## 【0332】

MacSynergy II 解析に従い、また Prichard 及び Shipman (1992) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的または相加的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表 15d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡または CCK8 アッセイで観察されなかった。

50

10

20

30

40

10

40

10

30

40



【表 1 5 a - 4】

		5 2	2 3		0 .	1 .	
		. 5	. 4		8 7	6 8	
1 .		0 9	7 0		2 0	3 1	
1 1	0	3	6	0	3	8	
		6 0	3 2	4 1			
		. 5	. 0	. 1		5 .	
0 .		4 1	9 7	3 3		0 9	
3 7	0	5	5	1	0	6 3	
			5 3	1 8	1 1	1 .	
		3 9	. 6	. 3	. 6	1 7	
0 .		. 5	7 9	2 6	9 8	5 1	
1 2	0	3 6	9	3	4	4	
0 .							
0 0	0	0	0	0	0	0	

拮抗作用

0

10

対数容積

0

表 1 5 b : H B s A g に対する化合物 2 4 及び T D F のインビトロ混合物の効果

20

【表 1 5 b - 1】

[ 薬 物 ]	0					1 0	平均%阻害
	.	1 2	3 7	1 1	3 3	0 0	
	0	. 3	. 0	1 .	3 .	. 0	
	0	5	4	1 1	3 3	0	
T D F ( n M )							化合物 2 4
	—						
	6						
	.	— 1	— 4	— 5	— 9	2 2	
1 0 .	6	6 .	. 6	. 1	. 3	. 4	
0 0	5	3 7	5	6	2	5	
	—						
	1						
	.	1 5	1 7	1 0	1 0	3 4	
3 . 3	2	. 8	. 0	. 4	. 4	. 5	
3	8	7	6	2	2	8	
	—						
	3						
	.	1 1	1 1	1 4	1 5	3 3	
1 . 1	5	. 1	. 0	. 5	. 5	. 4	
1	4	7	6	4	4	5	
	—						
0 . 3	3	1 .	7 .	5 .	8 .	3 5	
7	.	9 8	6 1	2 8	0 4	. 4	

10

20

30

	3 2 — 3 . 0 . 1 2 0 . 0 0	— 0 — 1 — 3 2 9 3 8 . . 0 . 0 . 0 . 8 1 0 8 3 9 3 6 — 1 — 2 — 2 — 2 1 2 7 . 1 . 7 . 5 . . 0 0 9 2 6 7 1 6 8 7 1	
[ 薬 物 ]	0 . 0 0	1 2 3 7 1 1 3 3 0 0 . 3 . 0 1 . 3 . . 0 5 4 1 1 3 3 0	標準偏差 (%)
T D F ( n M )			化合物 2 4
	8 . 1 0 . 0 0 8 3 . 3 3 1 5 . 1 . 1 1 1 . 0 . 3 7 1 4 . 0 . 1 2 0 . 0	2 3 2 2 6 1 2 . 1 9 . 5 . 4 . 3 . 4 9 7 8 7 4 8 1 5 . . 5 1 7 4 . 3 . 4 . 1 8 . 2 6 8 1 8 6 7 1 5 . 1 1 0 5 . . 0 6 . 3 . 6 . 1 3 4 5 2 1 7 7 9 2 1 1 . 1 6 1 6 1 2 1 7 3 . 3 . 5 . 3 . 1 6 . 3 5 2 6 3 7 2 1 4 . 1 1 1 7 1 5 . 4 . . 3 . 3 5 . 9 1 4 6 8 2 6 6 7 1 2 3 8 . 2 2 2 2 1 4	

30

40

0	1 . 4 5 3 . 2 . 4 . 7 . 3 5 3 3 6 9	
[ 薬 物 ]	0 1 0 . 1 2 3 7 1 1 3 3 0 0 0 . 3 . 0 1 . 3 . . 0 0 5 4 1 1 3 3 0	相加的阻害
T D F ( n M )	— 6 . — 2 — 2 — 3 — 3 1 0 . 6 5 . 9 . 5 . 4 . 6 . 0 0 5 7 6 7 6 6 2 2 4 1 6 — 1 . — 1 — 2 — 2 — 2 1 0 3 . 3 2 9 . 3 . 8 . 7 . . 8 3 8 4 3 2 3 7 9 4 8 8 — 3 . — 2 — 2 — 3 — 3 1 . 1 5 2 . 5 . 1 . 0 . 8 . 1 4 0 9 9 8 6 6 3 3 9 — 3 . — 2 — 2 — 3 — 3 0 . 3 3 1 . 5 . 1 . 0 . 9 . 7 2 8 3 7 1 3 8 0 5 0 9 — 3 . — 2 — 2 — 3 — 3 0 . 1 3 1 . 5 . 1 . 0 . 9 . 2 1 8 2 7 3 7 0 4 1 — 1 — 2 — 2 — 2 1 2 0 . 0 7 . 1 . 7 . 5 . . 0 0 0 9 2 6 7 1 6 8 7 1	化合物 2 4

40

【表 1 5 b - 4】

[薬物]	1 2 3 7 1 1 3 3						相乗作用プロット (99.9%)
	0	4 6	3 7	1 1	3 3	0 0	
T D F (n M)							ボ ン フ エ ロ ー 9 8 ニ調整 %
1 0 . 0 0	0	0	0	0	0	0	1 6 相 乗 作 6 . 用 4 8
3 . 3 3	0	0	0	1	6	3	対 数 容 3 7 積 . 9
1 . 1 1	0	1	5	9	9	8	
0 . 3 7	0	0	0	0	0	8	拮 抗 作 用 0
0 . 1 2	0	3	1	0	0	3	対 数 容 積 0
0 . 0 0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

表 1 5 c : H B e A g に対する化合物 2 4 及び T D F のインビトロ混合物の効果

【表 1 5 c - 1】

[ 薬 物]	1 0 0 0						平均%阻害
	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	. 0 0	
T D F ( n M)							化 合 物 2 4 (n M)
1	6 .	— 1 .	0 .	0 . 8	— 2 .	2 2 . 9	
0	0 7	4 4	1 3	2	8 3	8	

. 0 0 3 . 3 3 1 . 1 1 0 . 3 7 0 . 1 2 0 . 0 0	1 1 . 6 1 9 . 1 9 9 9 4 2 2 1 2 . 0 7 . 8 . 4 7 . 2 1 4 . 2 9 . 4 4 4 5 1 0 3 5 6 . 1 . 3 7 . 1 0 . 1 6 . 2 7 . 4 2 3 3 4 2 8 4 2 4 3 7 . 7 . 7 1 . 1 0 . 7 . 1 2 2 . 3 0 2 2 7 4 0 6 9 9 - 1 - 2 . 2 . - 1 2 - 1 4 1 3 . 0 0 7 1 8 . 7 4 . 7 4 4	
[ 藥 物 ]	3 7 0 . 1 2 . . 0 1 1 1 3 3 3 1 0 0 0 0 0 3 5 4 . 1 1 . 3 3 . 0 0	標準偏差 (%)
T D F ( n M)		化 合 物 2 4 (n M)
1 0 . 0 0 3 . 3	2 1 9 . 8 . 1 . 1 1 2 . 2 2 . 1 5 . 8 1 4 2 7 0 8 4 5 4 2 3 1 9 . 0 2 1 . . 6 1 8 . 1 7 . 1 7 . 0 8 2 1 1 0 6 8 8 8	

40

3 1 . 1 1 0 . 3 7 0 . 1 2 0 0	1 5 . 3 5 . 0 7 . 1 0 . 1 6 . 1 4 . 4 5 4 6 8 9 9 1 6 . 1 4 1 3 . 7 1 1 . . 9 1 2 . 1 8 . 1 5 . 1 5 0 5 5 3 3 2 1 2 . 1 9 . 9 7 . 4 4 . 1 7 . 1 9 . 1 4 . 2 6 2 9 4 0 1 9 1 1 . 1 9 . 3 6 . 3 3 . 1 8 . 2 5 . 1 8 . 5 4 7 3 2 6 9 6 4 2	
[ 藥 物]	3 7 0 . 1 2 . . 0 1 1 1 3 3 3 1 0 0 0 0 0 3 5 4 . 1 1 . 3 3 . 0 0	相加的阻害
T D F ( n M)		化 合 物 2 4 (n M)
1 0 . 0 0 3 . 3 3 1 . 1 1 0	- 5 6 . 3 . 5 . 9 - 5 . - 7 . 1 8 . 3 0 7 2 5 9 7 8 2 . 1 1 . 6 9 . 2 0 . 0 . 3 - 1 . 2 3 . 1 1 1 3 5 4 2 4 . 1 2 . 0 9 . 6 0 . 0 . 8 - 0 . 2 3 . 5 1 4 6 7 8 3 9 3 1 0 6 . 3 . 6 - 5 - 5 . - 7 . 1 8 . 4	

20

30

40



【表 1 5 c - 4】

.	2 3	9	.	7	7 2	5 9	6	
3				7				
7								
0								
.				- 4				
1	7 .		.	8	- 4 .	- 6 .	1 9 . 1	
2	0 2	4 . 5	8	8 3	6 9	4		
0								
.				- 1				
0		- 2 .	2 .	- 1 2	- 1 4	1 3 . 0		
0	0	7 1	8	. 7 4	. 7 4	4		
[							1	
薬				3 7			0	
物]		1 2 .	.	0	1 1 1	3 3 3	0	
	0	3 4 6	3 7	. 1 1	. 3 3	0		
T								
D								
F								
(								
n								
M)								
1								
0								
.								
0								
0	0	0	0	0	0	0		
3								
.								
3								
3	0	0	0	0	0	0		
1								
.								
1								
1	0	0	0	0	0	0		
0								
.								
3								
7	0	0	0	0	0	0		
0								
.	0	0	0	0	0	0		

相乗作用プロ  
ット (9 9 .  
9 %)

ボンフェ 9  
ローニ調 8  
整 %

相乗作用 0

対数容積 0

拮抗作用 0

対数容積 0

10

20

30

40

【表 1 5 c - 5】

1									
2									
0									
.									
0									
0	0	0	0	0	0	0	0		

10

表 1 5 d : P H H 細胞培養系中における化合物 2 4 及び T D F のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 1 5 d】

H B V アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻 害 剤 B	阻 害 剤 A E C 5 0 ( n M ) #	阻 害 剤 B E C 5 0 ( n M ) #	相 乗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M % ) *	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M % ) *	拮 抗 対 数 容 積	判 定
H B V D N A	T D F	2 4	5 . 1 6	1 8 1 . 6	5 8 6 . 5 4	1 3 3 . 5 2	0	0	相 乗 作 用
H B s A g	T D F	2 4	> 1 0 0	約 1 1 0 4	1 6 6 . 4 8	3 7 . 9	0	0	相 乗 作 用
H B e A g	T D F	2 4	> 1 0 0	1 0 8 7	0	0	0	0	相 加 的

20

\* 9 9 . 9 % 信 頼 区 間

# 前 の 別 の 試 験 で 測 定

30

## 【 0 3 3 3 】

## 実施例 1 6

## 化合物 2 3 及び T D F のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 2 3 (アミノクロマン化学クラスに属する H B V 封入低分子阻害剤) 及びテノホビル (プロドラッグであるテノホビルジソプロキシルフマレート、すなわち T D F の形態、H B V ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

40

## 【 0 3 3 4 】

## 結果及び判定

T D F ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、1 0 . 0 n M ~ 0 . 1 2 n M の濃度範囲 ) を化合物 2 3 ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、2 0 0 0 n M ~ 2 4 . 6 9 n M の濃度範囲 ) と混合して試験した。化合物 2 3 または T D F による治療 ( 単独または混合 ) のいずれかにおいて測定された H B V D N A 、 H B s A g 及び H B e A g の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 1 6 a 、表 1 6 b 及び表 1 6 c に記載している。T D F 及び化合物 2 3 の E C<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 1 6 d に記載している ( 異なるロットの P H H 細胞に若干の違いが認められた ) 。

50

## 【 0 3 3 5 】

Mac Synergy II 解析に従い、また P r i c h a r d 及び S h i p m a n ( 1 9 9 2 ) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的または相加的である（拮抗作用を有さない）ことが判明した（表 1 6 d）。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡または C C K 8 アッセイで観察されなかった。

表 1 6 a : H B V D N A に対する化合物 2 3 及び T D F のインビトロ混合物の効果

【表 1 6 a - 1】

[ 薬 物 ]	0							平均%阻害
	.	2 4	7 4	2 2	6 6	2 0 0		
	0	. 6	. 0	2.	6 .	0 . 0		
	0	9	7	2 2	6 7	0		
T D F ( n M )								化合物 2 3 ( n M )
2 2								
1 0	.	1 5	2 1	5 0				
. 0	0	. 6	. 5	. 3	6 8	8 3 .		
0	3	3	3	1	. 1	4 5		
2 4								
.			2 5	4 2	7 1			
3 .	8	1 1	. 6	. 0	. 1	8 3 .		
3 3	9	. 9	2	3	6	1		
2 4								
.		2 7	2 5	4 9	7 1			
1 .	3	. 4	. 2	. 8	. 3	8 5 .		
1 1	6	1	9	2	4	2 7		
— 4								
.		1 5		2 5	6 6			
0 .	6	. 8	1 0	. 6	. 7	7 9 .		
3 7	4	7	. 9	8	3	5		
—		1 4	1 6	1 7	5 5			
0 .	1	. 5	. 5	. 0	. 5	7 4 .		
1 2	9	7	7	2	5	8		

10

20

30

40

【表 1 6 a - 2】

	.								
	3								
	4								
		- 1	- 3		3 0				
0 .		5 .	6 .	0 .	. 4	6 9 .			
0 0	0	3 3	5 8	7 8	5	9 7			
	0								
	.	2 4	7 4	2 2	6 6	2 0 0			
[ 薬	0	. 6	. 0	2 .	6 .	0 . 0			
物]	0	9	7	2 2	6 7	0			
T D									
F (									
n M									
)									
	1								
	9								
1 0	.	1 2	2 2	1 3	1 0				
. 0	8	. 9	. 3	. 6	. 1	4 . 5			
0	8	3	6	9	7	5			
	2								
	5								
	.	1 3	1 2	2 0					
3 .	4	. 8	. 7	. 9	9 .	3 . 3			
3 3	2	2	6	2	9	8			
	2								
	6								
	.			1 8	1 0				
1 .	8	5 .	8 .	. 6	. 8				
1 1	8	7 2	4	1	5	1			
	2								
	2								
	.	2 4	1 6	2 7					
0 .	4	. 0	. 7	. 5	6 .	2 . 8			
3 7	5	4	1	1	7 2	9			
	3								
	0								
	.		1 4	3 2	1 3				
0 .	5	1 4	. 2	. 6	. 6	7 . 1			
1 2	6	. 7	8	3	7	6			
0 .	2	2 5	4 3	1 9	1 5	7 . 2			

標準偏差 (%)

化合物 2 3  
(n M)

10

20

30

40

【表 1 6 a - 3】

0 0	8	.	5	.	4	.	9	.	5	3	
	.		9		5		5		5		
	2										
	1										
[ 薬 物 ]	0										
	.		2 4	7 4	2 2	6 6	2 0 0				
	0	.	6	.	0	2.	6 .	0 .	0		
	0		9		7	2 2	6 7	0			
T D F ( n M )											
	2										
	2										
	1 0	.		1 0	— 6	2 2	4 5				
	. 0	0	.	0	.	4	.	6	.	7	7 6 .
	0	3		8		9		4		7	5 9
	2										
	4										
	.			1 3	— 2	2 5	4 7				
	3 .	8	.	3	.	5	.	4	.	7	7 7 .
	3 3	9		8		9		8		6	4 4
	2										
	4										
	.			1 2	— 3	2 4	4 7				
	1 .	3	.	7	.	3	.	9	.	3	7 7 .
	1 1	6		6		1		5		9	2 9
	—										
	4										
	.			— 2	— 4	— 3	2 7				
	0 .	6		0 .	2 .	.	8	.	2	6 8 .	
	3 7	4		6 8	9 2	2		2		5 8	
	—										
	1										
	9										
	.			— 3	— 6	— 1					
	0 .	3		7 .	2 .	8 .				6 4 .	
	1 2	4		6 3	9 9	4 1		1 7		1 6	
	0 .			— 1	— 3	0 .		3 0		6 9 .	
	0 0	0		5 .	6 .	7 8	.	4		9 7	

相加的阻害

化合物 2 3  
(n M)

10

20

30

40

【表 1 6 a - 4】

	3 3	5 8	5			
[ 薬 物 ]	2 4	7 4	2 2	6 6		
	. 6	. 0	2 .	6 .	2 0	
	0	9 1	7 4	2 2	6 7	0 0
T D						
F (						
n M						
)						
1 0						
. 0						
0	0	0	0	0	0	0
3 .						
3 3	0	0	0	0	0	0
			0 .			4 .
1 .			9 5			6 8
1 1	0	0	5 6	0	0	9
					1 7	1 .
					. 3	4 0
0 .					9 4	9 0
3 7	0	0	0	0	5	1
			3 2			
		3 .	. 5			
0 .		8 2	6 4			
1 2	0	2 3	5	0	0	0
0 .						
0 0	0	0	0	0	0	0

相乗作用プロット  
(99.9%)  
  
ボンフ  
エラー  
ニ調整 98%  
  
相乗作 60.  
用 83  
対数容 13.  
積 85  
  
拮抗作  
用 0  
  
対数容  
積 0

10

20

30

表 1 6 b : H B s A g に対する化合物 2 3 及び T D F のインビトロ混合物の効果

【表 1 6 b - 1】

[薬物]	0							
	.	2	4	7	2	6	2	0
	0	.	6	.	0	2	.	0
	0	9	7	2	2	6	7	0
T D								
F (								
n M								
)								
1 0	—	—	1	—	1	—	1	
. 0	5	1	.	7	.	0	.	— 5.
0	.	7	6	9	8	5	6	0 7 1 3

平均%阻害

化合物 2 3  
(n M)

	9						
	-						
	0	-	8				
3 .	.	. 3	2 .	5 .	3 .	8 .	1
3 3	9	2	7 4	7 5	0 8	4	
	0						
	.						
1 .	7	6 .	9 .	9 .	9 .	1 3 .	
1 1	9	6 3	8 6	9 6	8 7	5 5	
	-						
	0	1 0					
0 .	.	. 9	6 .	9 .	6 .	1 2 .	
3 7	3	4	5 3	4 8	8 6	8 9	
	3						
	.						
0 .	3	8 .	3 .	3 .	1 .	1 3 .	
1 2	9	1 3	5 9	9 9	9 2	7 8	
		- 1	- 1	- 1	- 4		
0 .		3 .	0 .	1 .	. 4	0 . 4	
0 0	0	8 9	9	6 4	5	8	
[ 藥 物]	0	. 2 4	7 4	2 2	6 6	2 0 0	
	0	. 6	. 0	2 .	6 .	0 . 0	
	0	9	7	2 2	6 7	0	標準偏差 (%)
T D F (n M) )							
	1						化合物 2 3 ( n M)
	1						
1 0	.	1 3			1 2		
. 0	4	. 3	9 .	9 .	. 9		
0	4	2	2 6	9 9	2	6 . 2	
	1						
	6						
	.	1 2					
3 .	1	. 8	5 .	1 .	3 .	5 . 7	
3 3	1	1	0 8	7 1	3 8	9	
1 .	1	5 .	1 0	1 0	3 .	4 . 8	
1 1	9	1 1	. 3	. 3	1 1	5	

20

40



[illegible]

20

40

10

20

表 1 6 c : H B e A g に対する化合物 2 3 及び T D F のインビトロ混合物の効果

【表 1 6 c - 1】

[薬物]	0	2	4	7	2	6	2	0	平均%阻害
------	---	---	---	---	---	---	---	---	-------

]	. 6 4 2 6 0 0	化合物 2 3 (nM)
0 9 . 2 6 . 0		
0 0 . . 0		
7 2 6		
2 7		
T D F (nM)		
	—	
	— 1 —	
	0 5 0 1	
1 0 .	. — 1 . . 1 — 5	
0 0	7 0 . 2 5 . . 4	
	2 5 1 8 4 8 9	
	9 3 2 4	
3 . 3	. — 5 . . .	
3	0 . 0 1 9 0 4 .	
	5 9 2 8 6 2 8	
	1 2 9 0	
1 . 1	. . .	
1	7 7 . 5 7 7 .	
	8 5 9 2 7 7 2 4	
	6 2 6	
0 . 3	. . . 6 1 0	
7	7 4 . 3 3 . . 5	
	4 3 7 1 5 4 1	
	—	
	5 0	
0 . 1	4 . . 6	
2	. 8 . 2 6 . 7 .	
	4 0 9 2 8 5 6 2	
	—	
	— 1 —	
	6 2 7	
0 . 0	— 8 . . . — 1	
0	. 8 3 7 9 . 0	
	0 2 6 1 4 9	
[薬物]	0 2 4 7 2 6 2 0	標準偏差 (%)
]	. . 6 4 2 6 0 0	

40

【表 1 6 c - 3】

	0	9	.	2	6	.	0	
	0		0	.	.	.	0	
			7	2	6			
				2	7			
T D F (n M )								化合物 2 3 (n M)
	1							
	0		6		1			
	.	1 7	.	8	1	1 5		
1 0 .	7	. 8	6	.	.	. 9		
0 0	8	1	1	4	1	8		
			1	1				
	9		3	1	7			
	.	1 9	.	.	.	1 7		
3 . 3	9	. 8	2	5	7	. 1		
3	9	9	1	1	8	3		
	8		8	7	4			
	.		.	.	.			
1 . 1	3	4 .	2	0	6	6 .		
1	3	3 6	3	6	4	3 3		
	1			1	1			
	2		8	5	3			
	.		.	.	.	1 7		
0 . 3	3	9 .	1	0	3	. 7		
7	5	4 1	9	7	5	4		
				1				
	5		2	1	7			
	.		.	.	.			
0 . 1	9	2 .	7	8	2	9 .		
2	4	5 5	2	5	5	8 2		
	1							
	6		6	8	9			
	.		.	.	.			
0 . 0	2	1 .	4	8	4	7 .		
0	7	9 4	9	3	7	3 1		
[薬物 ]	0		7	2	6	2 0		
	.	2 4	4	2	6	0 0		
	0	. 6	.	2	6	. 0		
	0	9	0	.	.	0		相加的阻害

10

20

30

40

【表 1 6 c - 4】

	7 2 6 2 7						
T D F (n M )							化合物 2 3 (n M)
			—	—	—		
	0		5	1	7		
	.	— 8	.	1	.	— 0	
1 0 .	7	.	0 5	.	1	.	3
0 0	2	4	9	9	6	6	
				—			
	9		3	2	1		
	.		.	.	.		
3 . 3	0	1 .	2	5	8	8 .	
3	5	0 3	7	1	3	0 6	
	1						
	2		7	1	5		
	.		.	.	.	1 1	
1 . 1	7	5 .	2	6	8	.	8
1	8	0 9	3	9	5	3	
				—	—		
	6		0	5	0		
	.	— 1	.	.	.		
0 . 3	7	.	4 8	1	6	5 .	
7	4	9	1	1	6	7 2	
			—	—	—		
			1	7	3		
	4	— 4	.	.	.		
0 . 1	.	.	0 6	7	1	3 .	
2	4	3	8	5	9	3 6	
				—			
			—	1	—		
			6	2	7		
		— 8	.	.	.	— 1	
0 . 0	.	8	3	7	9	.	0
0	0	2	6	1	4	9	
[薬物 ]			7 2 6 2 4 4 2 6 . 6 . 2 6 2 0 0 9 1 0 . . 0 0				相乗作用プロッ ト (99.9%)

10

20

30

40



## 化合物 2 3 及び T A F のインビトロ混合物

## インビトロ混合物試験の目的：

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 2 3（アミノクロマン化学クラスに属する H B V 封入低分子阻害剤）及びテノホビル（プロドラッグであるテノホビルアラフェナミド、すなわち T A F の形態、H B V ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤）からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【 0 3 3 7 】

## 結果及び判定

T A F（3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、1 0 . 0 n M ~ 0 . 1 2 n M の濃度範囲）を化合物 2 3（3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、2 0 0 0 n M ~ 2 4 . 6 9 n M の濃度範囲）と混合して試験した。化合物 2 3 または T A F による治療（単独または混合）のいずれかにおいて測定された H B V D N A 及び H B s A g の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 1 7 a 及び表 1 7 b に記載している。T A F 及び化合物 2 3 の E C <sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 1 7 c に記載している（異なるロットの P H H 細胞に若干の違いが認められた）。

## 【 0 3 3 8 】

M a c S y n e r g y I I 解析に従い、また P r i c h a r d 及び S h i p m a n（1 9 9 2）による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相加的である（拮抗作用を有さない）ことが判明した（表 1 7 c）。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡または C C K 8 アッセイで観察されなかった。

表 1 7 a：H B V D N A に対する化合物 2 3 及び T A F のインビトロ混合物の効果

## 【表 1 7 a - 1】

[薬物]		7	2	6		
		4	2	6		
		.	2	6	2	
	2 4	0	.	.	0	
	. 6	7	2	6	0	
	0	9 1	4	2	7	0
T A F (n M)						
0 . 0						
0	4	5	6	5	6	
	3	3	1	9	5	
	.	5 2	.	.	.	.
1 0 .	3	. 6	6	8	0	3
0 0	3	6	7	5	3	3
	4	4 1	4	4	5	5
3 . 3	2	. 5	2	2	5	3
3	.	9	.	.	.	.

平均 % 阻害

化合物 2  
3 (n M)



10

20

30

40

10

20

30

40

【表 17 a - 4】

			7	9	8	7	
				1	3	5	
	2		0	3	2	9	
	.	- 1	.	.	.	.	
1 . 1	7	. 7	3	5	3	2	
1	3	2	1	6	6	7	
	1			2	3	6	
	1		9	1	8	2	
	.		.	.	.	.	
0 . 3	5	7 .	3	4	5	9	
7	9	5 5	9	3	2	8	
				1	3	6	
	6		4	6	4	0	
	.		.	.	.	.	
0 . 1	3	2 .	0	7	8	7	
2	6	0 8	3	8	8	9	
			-	1	3	5	
			2	1	0	8	
		- 4	.	.	.	.	
0 . 0	.	. 5	4	1	4	1	
0	0	7	9	3	6	3	
			7	2	6		
			4	2	6		
			.	2	6	2	
	2 4	0	.	.	0		
[薬物]	. 6	7	2	6	0		
	0	9 1	4	2	7	0	
T A F (n M)							
1 0 .							
0 0	0	0	0	0	0	0	
						-	
						8	
						.	
						6	
						4	
3 . 3						4	
3	0	0	0	0	0	9	
1 . 1	0	0	0	1	0	0	
							相乗作用プロット (99.9%)
							ボンフ
							エラー
							ニ調整 98%
							相乗作用 1.89
							対数容積 0.43

10

20

30

40

【表 1 7 a - 5】

1				.			
				8			
				9			
				3			
				0			
				4			
0 . 3							
7	0	0	0	0	0	0	
0 . 1							
2	0	0	0	0	0	0	
0 . 0							
0	0	0	0	0	0	0	
							拮抗作用対数容積 - 8 . 6 4 - 1 . 9 7

10

表 1 7 b : H B s A g に対する化合物 2 3 及び T A F のインビトロ混合物の効果

【表 17 b - 1】

[ 薬 物 ]	2	7	2	6			
	4	4	2	6			
	.	.	2	6	2		
	6	0	.	.	0		
	9	7	2	6	0		
	0	1	4	2	7	0	
平均%阻害							
T A F ( n M ) 0 . 0 0						化合物 2 3 ( n M)	
			—		2		
	6		8	5	3		
	.	6	3	.	.		.
1 0 .	3	.	.	6	2		5
0 0	8	2	4	9	6		1
	1				1		2
	6	9	9	0	1		8
	.	.	.	.	.		.
3 . 3	1	5	5	3	5		5
3	2	8	6	7	7		8
	2	1	2		1		3
	9	8	0	9	8		3
	.	.	.	.	.		.
1 . 1	6	0	4	8	3		2
1	6	5	7	6	1		4
0 . 3	7	1	3	—	—		2
7	.	1	.	2	2		2

10

20

30

	0	.	6	.	.	.	
	4	1	6	3	9	2	
		3			2	2	
	2	2	1	1		2	
	2	1	9	6	8	8	
	.	.	.	.	.	.	
0 . 1	9	2	8	7	8	4	
2	9	9	1	9	5	1	
			—			2	
		0	5	4	1	2	
		.	.	.	.	.	
0 . 0		7	2	8	9	7	
0	0	7	7	3	5	7	
[薬物]		2	7	2	6		
		4	4	2	6		
		.	.	2	6	2	
		6	0	.	.	0	
		9	7	2	6	0	
	0	1	4	2	7	0	標準偏差 (%)
T A F (nM)							化合物 2 3 (nM)
		1	1			1	
	3	2	1	6	7	0	
	.	.	.	.	.	.	
1 0 .	0	2	6	9	0	2	
0 0	3	7	5	3	8	5	
				1			
	3	2		7	9		
	.	.	2	.	.	8	
3 . 3	6	2	.	4	9	.	
3	6	8	6	9	7	2	
		1					
	9	7	8	8	8	5	
	.	.	.	.	.	.	
1 . 1	0	6	3	6	8	2	
1	1	7	7	4	8	6	
	9	9	1	1	5	1	
0 . 3	.	.	0	7	.	.	
7	6	7	.	.	7	9	

40

【表 17b - 3】

0 . 1 2	7	7	4	1	6	3	
			7	5			
			1	1		1	
	3	9	5	1		3	
	.	.	.	.	9	.	
	6	9	7	5	.	4	
	8	2	6	9	9	2	
0 . 0 0		2		2			10
	1	1	8	6	6	7	
	.	.	.	.	.	.	
	8	6	5	0	9	1	
	3	3	8	8	9	2	
[薬物]	2	7	2	6			20
	4	4	2	6			
	.	.	2	6	2		
	6	0	.	.	0		
	9	7	2	6	0		
	0	1	4	2	7	0	
T A F ( n M )							相加之阻害  化合物 2 3 ( n M )
	6		1	1	8	2	
	.	7	.	0	.	7	
	3	.	4	.	2	.	
	8	1	5	9	1	7	
	1	1		2	1	3	
	6	6	1	0	7	5	
3 . 3 3	.	.	1	.	.	.	30
	1	7	.	1	7	2	
	2	7	7	7	6	2	
	2		2	3	3	4	
	9	3	5	3	1	5	
	.	0	.	.	.	.	
1 . 1 1	6	.	9	0	0	6	40
	6	2	5	6	3	8	
				1		2	
	7	7	2	1	8	8	
	.	.	.	.	.	.	
	0	7	1	5	8	2	
	4	6	4	3	5	1	

【表 1 7 b - 4】

	2	2	1	2	2	4	
	2	3	8	6	4	0	
	.	.	.	.	.	.	
0 . 1	9	5	9	7	4	5	
2	9	8	3	1	9	3	
			—			2	
		0	5	4	1	2	
		.	.	.	.	.	
0 . 0		7	2	8	9	7	
0	0	7	7	3	5	7	
	2	7	2	6			
	4	4	2	6			
	.	.	2	6	2		
	6	0	.	.	0		
[薬物]	9	7	2	6	0		相乗作用プロット (99.9%)
	0	1	4	2	7	0	ボンフ エラー ニ調整 98%
T A F (nM)							
1 0 .							相乗作
0 0	0	0	0	0	0	0	用 0
3 . 3							対数容
3	0	0	0	0	0	0	積 0
1 . 1							
1	0	0	0	0	0	0	
0 . 3							拮抗作
7	0	0	0	0	0	0	用 0
0 . 1							対数容
2	0	0	0	0	0	0	積 0
0 . 0							
0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

表 1 7 c : P H H細胞培養系中における化合物 2 3 及び T A F のインビトロ混合物試験の結果の要約



【表 17 c - 1】

HBV アッセイ指標	阻害剤A	阻害剤B	阻害剤A EC <sub>50</sub> (nM) #	阻害剤B EC <sub>50</sub> (nM) #	相乗積 (μM <sup>2</sup> %) *	相乗対数 容積	拮抗容積 (μM <sup>2</sup> %) *	拮抗対数容積	判定
---------------	------	------	------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------	------------	-------------------------------	--------	----

【表 17 c - 2】

HBV DNA	TA F	化合物 23	0.45	2.296	1.89	0.43	-8.64	-1.97	相加的
HBsAg	TA F	化合物 23	>100	4.36	0	0	0	0	相加的

\* 99.9%信頼区間  
# 前の別の試験で測定

## 【0339】

実施例 18

IFN 2a 及び化合物 25 のインビトロ混合物

試験の目的

細胞培養モデル系中の HBV 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 25 (ジヒドロキノリジノン化学クラスに属する HBV DNA、HBsAg 及び HBeAg の低分子阻害剤) 及び PEG 化インターフェロン 2a (IFN 2a、肝細胞の自然免疫経路を活性化する抗ウイルス性サイトカイン) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【0340】

結果及び判定

IFN 2a (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 IU/mL ~ 0.123 IU/mL の濃度範囲) を化合物 25 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 nM ~ 0.12 nM の濃度範囲) と混合して試験した。IFN 2a または化合物 25 による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定された HBV DNA、HBsAg 及び HBeAg の平均%阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 18 a、表 18 b 及び表 18 c に記載している。IFN 2a 及び化合物 25 の EC<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 18 d に記載している (異なるロットの PHH 細胞に若干の違いが認められた)。

## 【0341】

MacSynergy II 解析に従い、また Prichard 及び Shipman (1992) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表 18 d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、顕微鏡または CCK8 アッセイで観察されなかった。

表 18 a: HBV DNA に対する IFN 2a 及び化合物 25 のインビトロ混合物の効果

10

20

30

40

[薬物]	0 . 0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0 0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	平均%阻害 化合物 2 5 (μM)
IFN α 2 a		

I U/ mL	5 8 . 7 2 7 7 1 0 . 6 . 0 . 5 7 4 . 5 . 7 0 0 6 1 5 . 4 7 2 4 6 . 7 0 7 5 7 1 7 9 8 1 3 . 3 9 . 8 . 6 . 5 . 3 . 4 3 2 4 7 2 7 7 3 2 . 6 0 6 4 6 5 7 6 7 6 1 . 1 6 . 2 . 0 . 2 . 5 . 7 1 6 4 8 9 5 6 2 2 . 4 8 5 5 5 5 7 1 7 5 0 . 3 8 . 8 . 6 . 8 . 0 . 4 7 1 3 8 5 9 4 — 1 9 . 4 0 3 9 3 6 6 5 0 . 1 8 . 1 . 0 . 5 . 3 6 4 2 4 9 8 4 4 . 9 — 1 — 9 3 2 5 3 0 . 0 4 . . 8 4 . . 6 . 7 0 0 4 7 3 4 8	
[薬物]	0 . 1 0 0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0 0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	標準偏差 (%) 化合物 2 5 (μM)
I F N α 2 a I U/ mL	1 0 . 8 0 . 1 . 5 . 6 . 9 .	

40

【表 18 a - 3】

0 0	.	9 6	4 4	1 6	1 3	0 2			
	3								
	7								
	6								
3. 3	.	2.	3 .	1 .	3 .	4 .			
3	8	1 6	2 1	9 1	0 1	5			
	7								
	.	1 0							10
1. 1	0	. 5	6 .	2 .	2 .	2 .			
1	3	8	3 4	5 7	4 7	7 9			
	6								
	.			1 2					
0. 3	7	4 .	7 .	. 8	7 .	1 .			
7	2	6 6	0 4	3	1 7	6			
	1								
	5								
	.	1 0	1 1	1 5					20
0. 1	0	. 3	. 4	. 8	5 .	3 .			
2	9	4	6	2	8 4	7 9			
	2								
	6								
	.	2 7	1 2	1 3	2 1				
0. 0	8	. 9	. 4	. 9	. 2	5 .			
0	3	9	3	6	5	8 1			
	0								30
	.					1 0			
[薬物	0	0 .	0 .	1 .	3 .	. 0			
]	0	1 2	3 7	1 1	3 3	0			
I F N							相加的阻害 化合物 2 5 ( $\mu$ M )		
$\alpha$ 2 a									
I U /									
m L									
	5								
	8								
	.	5 2	5 4	6 0	7 2	8 0			
1 0 .	6	. 7	. 5	. 4	. 1	. 8			
0 0	6	1	8	4	5	9			
	4	3 9	4 1		6 4	7 5			
3. 3	6	. 2	. 6	4 9	. 2	. 4			
3	.	8	8	. 2	5	7			40

10

20

30

40

【表 1 8 a - 5】

		2 1	1 7				
		. 8	. 3			5 .	
0 . 3		0 3	2 1			8 5	
7	0	9	4	0	0	4 4	拮抗作用 0
		4 3	3 3			2 6 7 .	
		. 2	. 0			. 8 8 1	
0 . 1		6 1	3 5			4 0 7 1	
2	0	1	1	0	6	1	対数容積 0
0 . 0							
0	0	0	0	0	0	0	

10

表 1 8 b : H B s A g に対する I F N 2 a 及び化合物 2 5 のインビトロ混合物の効果

【表 18 b - 1】

[薬物]	0						平均%阻害 化合物 25 ( $\mu$ M)
	. 1 0						
	0	0 .	0 .	1 .	3 .	. 0	
	0	1 2	3 7	1 1	3 3	0	
I F N $\alpha$ 2 a I U / m L							
	2						
	2						
	. 2 7	2 2	3 0	3 7	6 3		
1 0 .	7 . 2	. 4	. 2	. 2	. 5		
0 0	7 3	1	5	3	6		
	1						
	8						
	. 2 8	2 7	3 5	4 3	6 6		
3 . 3	3 . 8	. 0	. 5	. 7	. 8		
3	2 6	9	3	1	8		
	1						
	0						
	. 3 1	3 1			6 6		
1 . 1	5 . 5	. 2	3 8	. 3			
1	7 2 7	7	2	. 7	7		
	2						
	. 1 8	1 5	2 5	3 4	6 0		
0 . 3	7 . 7	. 9	. 1	. 2	. 4		
7	4 8	8	4	4	4		
0 . 1	— 1 1	1 0	1 4	3 4	5 6		
2	4 . 8	. 9	. 5	. 5	. 6		

10

20

30

【表 18 b - 2】

	. 7 2 2 5	
	0	
	8	
	— 5 — 7 — 7 4 2	
0 . 0	. 6 . 5 . 3 8 . . 4	
0	0 4 2 3 8 1 9	
	0	
	. 1 0	
	0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0	
[薬物]	0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	標準偏差 (%)
I F N		化合物
α 2 a		2 5 (
I U /		μ M)
m L		
	8	
	.	
1 0 .	6 6 . 2 . 4 . 7 . 4 .	
0 0	8 9 7 2 9 7 3 9 8 0 1	
	9	
	.	
3 . 3	5 6 . 6 . 6 . 6 . 4 .	
3	2 1 9 1 4 0 4 9 4 4 7	
	2	
	.	
1 . 1	7 4 . 4 . 1 . 4 . 0 .	
1	2 0 7 7 1 2 3 7 2 2 8	
	8	
	.	
0 . 3	0 2 . 1 . 2 . 2 . 4 .	
7	8 5 6 2 7 2 6 0 5 7	
	6	
	.	
0 . 1	1 2 . 2 . 0 . 1 . 2 .	
2	7 6 5 5 3 5 4 9 5 9 9	
	1 2	
0 . 0	8 . . 2 8 . 8 . 4 .	
0	7 2 9 5 6 2 4 9 9 8	
[薬物]	0 0 . 0 . 1 . 3 . 1 0	相加的阻害
	. 1 2 3 7 1 1 3 3 . 0	

10

20

30

40



【表 18 b - 3】

	0	0						化合物 25 ( $\mu$ M)
	0							
I F N $\alpha$ 2 a I U / mL	2							
	2							
	.	1 8	1 6	1 7	2 9	5 5		
1 0 .	7	. 4	. 9	. 1	. 5	. 5		
0 0	7	1	6	1	7	9		
	1							
	8							
	.	1 3	1 2	1 2	2 5	5 3		
3 . 3	3	. 7	. 1	. 3	. 5	. 0		
3	2	1	8	3	2	3		
	1							
	0							
	.					1 8	4 8	
1 . 1	5	5 .	3 .	4 .	. 4	. 5		
1	7	5 3	8 4	0 1	5	7		
	2							
	.	— 2	— 4	— 4	1 1	4 4		
0 . 3	7	. 7	. 5	. 3	. 3	. 0		
7	4	5	7	9	1	7		
	—							
	4							
	.	— 9	— 1	— 1	4 0			
0 . 1	0	. 9	1 .	1 .	5 .	. 1		
2	8	5	9 1	7 1	0 9	4		
		— 5	— 7	— 7	4 2			
0 . 0		. 6	. 5	. 3	8 .	. 4		
0	0	4	2	3	8 1	9		
[薬物]	0	0 .	0 .	1 .	3 .	相乗作用プロット (99.9 % )		
		1 2	3 7	1 1	3 3			
	0	3 5	0 4	1 1	3 3	1 0		
I F N $\alpha$ 2 a							ボンフ エラー 9 8 ニ調整 %	

10

20

30

40

10

20

30

【表 1 8 c - 1】

[薬物]	0						
	.					1 0	
	0	0 .	0 .	1 .	3 .	. 0	
	0	1 2	3 7	1 1	3 3	0	
	1						
	7						
	.	3 3	2 2	2 5	3 2	5 1	
1 0 .	3	. 6	. 7	. 5	. 7	. 9	
0 0	2	4	3	8	2	7	
	6						
	.	2 4	2 0	1 9	2 7		
3 . 3	4	. 7	. 7	. 0	. 1		
3	7	1	1	6	9	4 9	

平均%阻害  
化 合 物  
2 5 (  $\mu$   
M)

10

20

	— 1 . 2 1 1 8 1 5 4 7 1 1 . 5 . 2 . 9 1 9 . 5 1 3 2 5 9 . 2 5 — 1 2 . 1 2 1 4 4 0 0 . 3 1 1 0 8 . . 4 . 4 . 4 7 7 . 2 5 6 8 5 6 — 2 1 . 1 5 3 6 0 . 1 0 1 . 3 . 0 . . 5 . 9 2 5 9 8 4 9 5 7 9 — 1 — 1 — 1 — 7 2 2 0 . 0 1 . 3 . 6 . . 3 . 0 0 0 2 5 8 1 8 1 4	
[藥物]	0 . 1 0 0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0 0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	標準偏差 (%)
I F N α 2 a I U / m L	1 1 . 7 4 . 2 . 5 . 3 . 4 . 0 0 4 4 3 5 7 3 6 8 0 9 1 9 . 0 8 . 1 . 5 . 1 4 8 . 3 . 3 7 0 1 6 7 5 . 7 7 3 3 1 . 1 1 4 . 2 . 7 . 9 . 6 . 1 7 9 3 2 9 4 5 6 8 7 5	化合物 2 5 (μ M)

40

	. 1 4 2 6 0 . 3 7 2 5 . 0 . 1 2 1 9 . 0 . 0 0 0	. 1 4 2 6 . 2 . 6 . 8 . 5 . 1 4 5 1 2 8 4 7 9 . 3 7 . . 0 . 4 9 . . 2 5 4 6 9 6 0 5 3 1 9 . 1 1 1 6 . 1 9 1 4 0 . 3 . 2 . 2 . 2 6 3 7 2 4 7 9	
[薬物]	0 . 0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0 0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	1 0 . 1 0 0 . 0 . 1 . 3 . . 0 0 1 2 3 7 1 1 3 3 0	相加的阻害 化 合 物 2 5 ( $\mu$ M)
I F N $\alpha$ 2 a I U / mL	1 7 . 1 0 . 0 0 6 . 3 . 3 3 — 1 . 1 . 1 1 0 . 3	1 1 3 5 3 8 . 5 . 3 . . 2 . 5 2 0 2 9 4 3 8 4 6 . — 4 — 6 — 9 — 0 2 7 4 . 0 . 4 . 2 . 3 . 0 7 5 5 4 7 8 — 1 . — 1 — 1 — 1 — 8 2 1 1 2 . 5 . 8 . . 5 . 1 3 5 1 1 1 2 2 6 0 . 3 — — 2 — 2 — 3 — 2 1 2	

20

40

【表 18 c - 4】

7	1	4 .	7 .	1 .	0 .	. 5	
	2	7 9	6 6	0 1	3 7	5	
	.						
	1						
	7						
	—						
	2						
	1						
	.	— 3	— 3	— 4	— 2		
0 . 1	0	4 .	7 .	1 .	9 .	5 .	
2	5	6 7	7 7	3 9	9	6 3	
		— 1	— 1	— 1	— 7	2 2	
0 . 0		1 .	3 .	6 .	. 3	. 0	
0	0	2 5	8 1	8	1	4	
		0 .	0 .	1 .	3 .		
		1 2	3 7	1 1	3 3		
[薬物]	0	3 5	0 4	1 1	3 3	1 0	
I F N							相乗作用プロット
α 2 a							(99.9%)
I U /							ボンフ
m L							エロー
							ニ調整 98%
		1 1	9 .	3 .	9 .	2 .	
		. 1	0 9	2 9	3 2	9 6	
1 0 .		3 9	6 1	2 5	9 1	9 8	
0 0	0	6	5	7	2	1	相乗作用 231
		2 .	2 1	9 .			. 36
		3 9	. 8	3 7			
3 . 3		9 0	9 4	6 7			対数容 52 .
3	0	9	4	5	0	0	積 67
		1 7	2 5	9 .		4 .	
		. 8	. 8	5 9		1 7	
1 . 1		0 5	1 3	2 0		5 7	
1	0	4	6	5	0	5	
		2 7	1 4	1 6	1 6		
		. 0	. 7	. 2	. 8		
0 . 3		9 1	9 5	4 0	1 8		
7	0	6	6	5	2	0	拮抗作用 0
		1 2	1 .		1 5		
0 . 1		. 0	8 2		. 6		対数容
2	0	1 9	1 8	0	8 6	0	積 0

10

20

30

40

【表 18 c - 5】

	1	1	5	
0 . 0				
0	0	0	0	0

表 18 d : P H H 細胞培養系中における I F N 2 a 及び化合物 2 5 のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 18 d】

10

HBV アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻 害 剤 B	阻 害 剤 A E C <sub>50</sub> (I U / mL) #	阻 害 剤 B E C <sub>50</sub> (nM) #	相 乗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M <sup>2</sup> %) *	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M <sup>2</sup> %) *	拮 抗 対 数 容 積	判定
HBV DNA	I F N α 2 a	化 合 物 2 5	2 . 1 5 4	0 . 6 5 4	3 1 4 . 1 5	7 1 . 5 1	0	0	相乗作用
HBs Ag	I F N α 2 a	化 合 物 2 5	1 3 . 8	4 . 5 0 3	2 1 8 . 7 6	4 9 . 8	0	0	相乗作用
HB e Ag	I F N α 2 a	化 合 物 2 5	1 0 . 2 4	5 . 7 5	2 3 1 . 3 6	5 2 . 6 7	0	0	相乗作用

20

\* 99.9%信頼区間  
# 前の別の試験で測定

30

## 【0342】

実施例 19

化合物 2 5 及び化合物 3 のインビトロ混合物

試験の目的

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 3 (スルファモイルベンズアミド化学クラスに属する H B V 封入低分子阻害剤) 及び化合物 2 5 (ジヒドロキノリジノン化学クラスに属する H B V DNA、H B s A g 及び H B e A g の低分子阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

40

## 【0343】

結果及び判定

化合物 2 5 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 nM ~ 0.12 nM の濃度範囲) を化合物 3 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、5000 nM ~ 61.73 nM の濃度範囲) と混合して試験した。化合物 2 5 または化合物 3 による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定された H B V DNA、H B s A g 及び H B e A g の平均% 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 19 a、表 19 b 及び表 19 c に記載している。化合物 2 5 及び化合物 3 の E C<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 19 d に記載している (異なるロットの P H H 細胞に若干の違いが認められた)

50

。

## 【 0 3 4 4 】

Mac Synergy II 解析に従い、また Prichard 及び Shipman (1992) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表 19 d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡または CCK 8 アッセイで観察されなかった。

表 19 a : HBV DNA に対する化合物 25 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

## 【表 19 a - 1】

	1							平均%阻害 化合物 3 (nM)
	1 5 6							
	6 8 5 6							
	0	1	5	5	6	5	0	
	.	.	.	.	.	0	0	
	0	7	1	5	6	.	0	
[薬物]	0	3	9	6	7	0		
化合物 25 nM								
	5 5 6 7							
	3 9 1 5							
	. . . . 8 3							
1 0 . 0 0	2	8	6	4	3	.	3	
	8	3	4	8	1	2		
	1	5	4	5	7			
	5	2	8	5	7			
	.	.	.	.	.	8	6	
3 . 3 3	2	7	7	4	8	.	1	
	4	7	8	9	4	9		
	3 4 4 6							
	5	2	0	8	8			
	.	.	.	.	.	8	5	
1 . 1 1	6	5	2	8	7	.	5	
	9	5	5	7	3	2		
	—	2	2	3	6			
	5	1	8	3	4			
	1	.	.	.	.	8	3	
0 . 3 7	.	4	5	3	0	.	7	
	8	7	4	7	4	7		
	—	1	1	2	5			
	2	7	8	7	8			
0 . 1 2	0	.	.	.	.	8	4	
	.	1	7	7	1	.	2	

10

20

30

40



【表 19 a - 2】

	9 8	8 —	5 —	8 2			
		2	2	—	2		
		8	5	3	5		
		.	.	.	.	7 4	
0 . 0		1	9	3	9	. 7	
0	0	3	3	2	4	8	
				1			
			1	5	6		
		6	8	5	6		
	0	1	5	5	6	5 0	
	.	.	.	.	.	0 0	
	0	7	1	5	6	. 0	
[薬物]	0	3	9	6	7	0	
化合物 25 nM							標準偏差 (%) 化合物 3 (nM)
	1			1			
	3	6	4	2	4		
	.	.	.	.	.		
1 0 .	6	6	2	0	5	3 .	
0 0	6	5	2	5	2	8 9	
	1						
	5	6	3	5	2		
	.	.	.	.	.		
3 . 3	6	9	5	9	7	2 .	
3	4	2	5	8	3	6 2	
			1				
	2	7	2	3			
	.	.	.	.	8		
1 . 1	1	3	6	7	.	1 .	
1	3	6	7	5	6	0 7	
		1	1	1			
	7	1	1	6			
	.	.	.	.	4		
0 . 3	1	0	5	6	.	3 .	
7	1	2	7	8	9	8 3	
	6	6	8	5	6		
0 . 1	.	.	.	.	.	1 .	
2	3	9	0	4	8	7 2	

【表 19 a - 3】

	7	2	3	4	9	
	3		1	1		
	7	6	2	2	6	
	.	.	.	.	.	
0 . 0	9	8	7	5	9	2 .
0	6	2	5	4	8	1 8
				1		
			1	5	6	
	6	8	5	6		
	0	1	5	5	6	5 0
	.	.	.	.	.	0 0
	0	7	1	5	6	. 0
[薬物]	0	3	9	6	7	0
化 合 物						
2 5						
n M						
				2	4	
	7	9	5	6		
	.	.	.	.	8	1
1 0 .	2	7	3	6	6	. 8
0 0	8	5	3	1	8	4
	1		—	1	3	
	5	—	6	2	7	
	.	8	.	.	.	7 8
3 . 3	2	.	7	4	2	. 6
3	4	6	4	3	3	2
	—	—				
	2	1		3		
	5	0	8	2	0	
	.	.	.	.	.	7 6
1 . 1	6	8	7	5	1	. 2
1	9	4	6	6	5	2
			—	—	—	
	—	—	9	5	1	
	5	9	1	6	2	
	1	4	.	.	.	6 1
0 . 3	.	.	1	8	4	. 7
7	8	5	6	4	2	2
	—	—	—	—	1	6 9
0 . 1	2	5	5	2	0	. 4
2	0	5	2	5	.	9

相加的阻害  
化合物 3  
(n M)

10

20

30

40

【表 19 a - 4】

	.	.	.	4		
	9	0	3			
	8	1	5			
	—	—				
	2	2	—	2		
	8	5	3	5		
	.	.	.	.	7	4
0 . 0	1	9	3	9	.	7
0	0	3	3	2	4	8
	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6		
	7	.	.	6		
	2	1	5	.	5	0
[薬物]	0	8	9	6	7	0 0
化 合 物						相乗作用プロット
2 5						(99.9%)
nM						ボンフェ
						ローニ調
						整 98%
	2			1		
	4	3		3		
	.	6		.		
	1	.		7		
	9	4		5		
1 0 .	4	2		4		
0 0	0	9	2	0	7	0
	3			2	3	
	8	4	3	1		
	.	3	.	.		
	5	.	3	6		
	9	8	7	2		
3 . 3	6	3	9	5		
3	0	3	7	8	6	0
	2			3	1	
	9	1	3	0		
	.	7	.	.		
	1	.	9	2	5	.
	6	3	6	7	7	7
1 . 1	8	1	8	7	8	6
1	0	2	3	8	4	3
0 . 3	0	7	8	3	6	9 .
						拮抗作用 0

10

20

30

40

【表 1 9 a - 5】

7		9	1	5	0	4	4	
		.	.	.	.	5	4	
		7	6	3	3	7		
		0	2	1	3			
		3	3	6	4			
		2	1	1	1			
		4	4					
		9	4	3	2			
		.	.	4	5			
		4	6	.	.	9	.	
		1	7	8	0	0	4	
0 . 1		6	3	7	4	9	4	
2	0	3	3	7	5	8		
0 . 0								
0	0	0	0	0	0	0		
								対数容積 0

10

20

表 1 9 b : H B s A g に対する化合物 2 5 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

【表 19 b - 1】

[薬物]	0				1 6	5	0
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0	0
	0	. 7	5.	5.	. 6	.	0
	0	3	1 9	5 6	7	0	
化合物 2 5 n M	3						
	2						
	.	4 0	4 1	4 5	5 2	6	4
1 0 .	9	. 0	. 4	. 1	. 3	.	8
0 0	9	9	8	3	4	4	
	1						
	3						
	.	2 6	2 8	3 0	3 4	5	4
3 . 3	1	. 3	. 8	. 9	. 5	.	5
3	2	2	5	7	6	9	
	—						
	3						
	.	2 1	2 0	2 1	3 2	5	6
1 . 1	1	. 3	. 7	. 9	. 4	.	2
1	8	2	3	9	7	1	
0 . 3	—	1 3	9.	8.	2 7	5	1
7	5	. 8	9 2	1 4	. 4	.	5

平均%阻害  
化 合 物  
3 (n M  
)

10

20

30

【表 19 b - 2】

	. 1				9		
	0						
	9						
	3						
	.			1 2	2 2	4 8	
0 . 1	6	7 .	8 .	. 8	. 4	. 4	
2	8	5 3	5 9	8	6	6	
		- 2	- 1	- 1		2 8	
0 . 0		0 .	7 .	3 .	1 .	. 2	
0	0	0 2	3 2	9 9	4 4	5	
	0				1 6	5 0	
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
[ 薬物	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0	
]	0	3	1 9	5 6	7	0	
化合物							標準偏差 (%)
2 5							化 合 物
nM							3 (nM
	1						)
	1						
	.						
1 0 .	7	5 .	4 .	1 .	3 .	4 .	
0 0	6	2 1	7 2	8	5 1	3 4	
	6						
3 . 3	.		8 .	5 .	2 .	2 .	
3	7	5	2 4	4 9	0 8	7 2	
	2						
	.						
1 . 1	6	0 .	5 .	3 .	4 .	4 .	
1	6	7 4	4	5	6 4	3	
	3						
	.		1 6	1 2			
0 . 3	1	7 .	. 0	. 0	5 .	4 .	
7	7	5 1	6	2	0 9	6 2	
	2						
	.						
0 . 1	7	6 .	8 .	9 .	4 .	5 .	
2	6	3 4	5 2	7 1	5	2 8	
	2		1 5	1 2	1 4	1 4	
0 . 0	6	3 .	. 3	. 9	. 9	. 1	
0	.	4 9	7	5	4	7	

10

20

30

40

	6 3							
[薬物]	0 . 6 1 0 . 7 0 3	1 8 5 . 1 9	5 5 5 . 5 6	1 6 6 6 7	5 0 0 0 0	相加的阻害 化合物 3 (nM)		
化合物 2 5 nM	3 2 . 1 9 9 . 5 9 7 1 3 . - 4 1 . 2 2 7 - 3 . - 2 1 3 8 8 4 - 5 . - 2 0 6 9 1 3 3 . - 1 6 5 . 8 6 - 2 0 . 0 0 2	2 1 . 3 8 - 1 1 . 0 5 - 2 3 . - 1 7 . 2 9 - 1 0 . 3 2	2 3 . 6 2 0 . 9 7 - 1 7 . 9 9	3 3 . 9 5 1 4 . 3 7 - 3 5 . 0 7 - 1 1 . 4 4	5 1 . 9 2 3 7 . 6 2 5 2 4 3 0 8 2 8 2 5			
[薬物]	6 1 . 7 0 2 8	1 8 5 . 1 9	5 5 5 . 5 6	1 6 6 6 . 7	5 0 5 0 0 0	相乗作用プロット (99.9%)		

【表 19 b - 4】

化合物 25 nM							ボ ン フ エ ロ ー ニ調整	9 8 %	
1 0 . 0 0	0	3 . 3 7	4 . 5 6	1 5 . 5	6 . 8 3		相 乗 作 用	2 5 7 . 4 9	10
3 . 3 3	0	3 . 1 4	1 1 6 6	1 3 . 9	7 . . 3		対 数 容 積	5 8 . 6 2	
1 . 1 1	0	4 2 . 7	2 4 . 0	2 8 . 0	1 8 . 8	1 6 . 0			20
0 . 3 7	0	1 5 . 2	1 4 2 4	1 1 2 8	1 1 8 5	1 1 8 6	拮 抗 作 用	0	
0 . 1 2	0	2 . 2 6			0 . 2 .	1 9 1 9	対 数 容 積	0	30
0 . 0 0	0	5 0 6	0	0	5 8 0 5	3 5 2			
	0	0	0	0	0	0			

表 19 c : H B e A g に対する化合物 25 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果



【表 19 c - 1】

表 19 c : H B e A g に対する化合物 2 5 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

[薬物]	0				1 6	5 0
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0
	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0
	0	3	1 9	5 6	7	0
化合物 2 5 nM						
	3					
	3					
	.	2 9	3 2	3 5	4 5	5 6
1 0 .	1	. 5	. 1	. 1	. 5	. 7
0 0	7	5	3	2	3	2
3 . 3	8	1 7	1 4	1 7	2 8	4 1

平均%阻害  
化合物  
3 (nM  
)

【表 19 c - 2】

3	.	. 0	. 5	. 5	. 1	. 8			
	7	6	5	8	9	1			
	4								
	4								
	.	1 4	1 0	1 7	2 7	4 8			
1 . 1	5	. 8	. 8	. 5	. 3	. 4			
1	1	4	5	4	2	9			10
	—								
	0								
	.				2 0	4 0			
0 . 3	5	7 .	2 .	7 .	. 6	. 7			
7	1	1 8	6 3	0 3	4	5			
	5								
	.		— 1		1 7	4 2			
0 . 1	3	4 .	. 2	8 .	. 3	. 3			
2	3	7 6	3	2 6	4	4			20
		— 1		— 5					
0 . 0		1 .	— 1	. 3	2 .	2 7			
0	0	3 5	6	9	3 4	. 3			
	0				1 6	5 0			
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0			
[薬物]	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0			
	0	3	1 9	5 6	7	0			
化合物 25 nM							標準偏差 (%)		
	1						化合物		30
	9						3 (nM		
	.						)		
1 0 .	0	7 .	7 .	3 .	5 .	8 .			
0 0	4	6 4	3 8	0 4	1 5	4 4			
	1								
	7								40
	.								
3 . 3	5	4 .	4 .	3 .	1 .	3 .			
3	3	4 2	0 2	7 1	1 7	6 8			
	1								
	1								
1 . 1	.	1 .	6 .	4 .	2 .	2 .			
1	6	6 1	6 9	6	8 2	7 9			

10

20

相加的阻害  
化合物  
3 (n M  
)

30

40

【表 19 c - 4】

	1							
	5							
	.	- 5	- 9				3 1	
0 . 1	3	. 4	. 8	0 .	7 .	. 1		
2	3	2	2	2 3	5 5	7		
		- 1		- 5				
0 . 0		1 .	- 1	. 3	2 .	2 7		
0	0	3 5	6	9	3 4	. 3		
[薬物]		6 1	1 8	5 5	1 6			
		. 7	5 .	5 .	6 6	5 0		
	0	2 8	1 9	5 6	. 7	0 0		
化合物							相乗作用プロット	
2 5							(99.9%)	
nM							ボンフ	
1 0 .							エラー	
0 0	0	0	0	0	0	0	ニ調整	9 8 %
		4 .	7 .	1 .	1 3			
		1 3	1 8	5 5	. 4			
3 . 3		3 7	0 1	0 3	5 9		相乗作	8 0 . 5
3	0	8	8	9	5	0	用	6
		1 5			1 1	8 .		
		. 8		3 .	. 2	7 2		
1 . 1		7 1		0 4	9 9	8 1	対数容	1 8 . 3
1	0	5	0	1 4	4	1	積	4
					1 1			
					. 6			
0 . 3					5 8		拮抗作	
7	0	0	0	0	5	0	用	0
					3 .			
					6 3			
0 . 1					5 8		対数容	
2	0	0	0	0	3	0	積	0
0 . 0								
0	0	0	0	0	0	0		

10

20

30

40

表 19 d : P H H 細胞培養系中における化合物 2 5 及び化合物 3 のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 19 d - 1】

H B V アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻害剤 B	阻 害 剤 A E C	阻 害 剤 B E C	相 乗 容 積 ( μ	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( μ M <sup>2</sup> %)	拮 抗 対 数 容 積	判 定
-----------------	------------	----------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------------------------	----------------	-----

【表 19 d - 2】

			50 ( nM) #	50 ( nM) #	M <sup>2</sup> (%) *				
H B V DNA	化 合 物 2 3 5	化 合 物 3	0 . 6 5 4	8 7 6 . 5	7 3 7 . 8	1 6 7 . 9 6	0	0	相 乗 作 用
H B s A g	化 合 物 2 3 5	化 合 物 3	4 . 5 0 3	7 7 9 3	2 5 7 . 4 9	5 8 . 6 2	0	0	相 乗 作 用
H B e A g	化 合 物 2 3 5	化 合 物 3	5 . 7 5	8 8 5 0	8 0 . 5 6	1 8 . 3 4	0	0	相 乗 作 用

\* 99.9%信頼区間  
# 前の別の試験で測定

## 【0345】

## 実施例 20

## 化合物 3 及び T A F のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 3 (スルファモイルベンズアミド化学クラスに属する H B V 封入低分子阻害剤) 及びテノホビル (プロドラッグであるテノホビルアラフェナミド、すなわち T A F の形態、H B V ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【0346】

## 結果及び判定

T A F (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 nM ~ 0.12 nM の濃度範囲) を化合物 3 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、5560 nM ~ 68.64 nM の濃度範囲) と混合して試験した。T A F または化合物 3 による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定された H B V DNA、H B s A g 及び H B e A g の平均%阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 20 a、表 20 b 及び表 20 c に記載している。T A F 及び化合物 3 の EC<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 20 d に記載している (異なるロットの PHH 細胞に若干の違いが認められた)。

## 【0347】

Mac Synergy II 解析に従い、また Prichard 及び Shipman (1992) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相加的または相乗的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表 20 d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡または CCK8 アッセイで観察されなかった。

表 20 a : H B V DNA に対する T A F 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

【表 2 0 a - 1】

[ 薬 物]	6 1						平均%阻害
	0			7	1 8	5 5	
	. 6 8	2 0	.	5 3	6 0		
	0 . 6	5 .	7	. 3	. 0		
	0 4	9 3	8	3	0		
T A F ( n M)							化合物 3 (n M)
3	7 8						
.	. 7 6	7 5				8 7	
7	3 . 6	. 8	8			. 2	
0	1 6	3	4	8 3	2		
1	6		7				
.	3		6				
.	. 6 6	6 5	.	8 1	8 8		
2	3 . 7	. 3	3	. 9	. 2		
3	9 1	6	3	8	1		
0	2		5				
.	8		6				
.	. 5 0		.	7 7			
4	7 . 2	4 3	5	. 1	8 6		
1	8 5	. 6	1	2	. 4		
0			4				
.	3		4				
.	. 2 2	1 9	.	7 4	8 6		
1	8 . 9	. 7	1	. 0	. 5		
4	4 9	3	5	8	3		
0	—		4				
.	8		0				
.	. 1 5	1 8	.	7 1	8 3		
0	7 . 8	. 4	0	. 9	. 5		
5	7 4	9	3	3	6		
0			3				
.	— 2	— 5	4	6 6	8 5		
0	. 7	. 0	.	. 4	. 3		
0	0 9	2	7	3	2		

10

20

30

40

【表 2 0 a - 2】

	8						
	6						標準偏差 (%)
	1						
	0				7	1 8 5 5	
[	.	6 8	2 0	.	5 3	6 0	
藥	0	. 6	5.	7	. 3	. 0	
物]	0	4	9 3	8	3	0	
T							化合物 3 ( n M)
A							
F							
(							
n							
M)							
3	4				2		
.	.				.		
7	1	5.	5.	8	6.	3.	
0	3	7 4	6 5	6	3 4	8 7	
1	6				3		
.	.				.		
2	2	1.		3	2.	1.	
3	6	4	7 5	6	1 5	6 1	
1							
0	5				8		
.	.				.		
4	8	4.	4.	4	2.	0.	
1	2	8 3	3 5	4	3 1	7 7	
0							
.	5	1 0	1 2	5			
1	.	. 0	. 1	.	2.	1.	
4	2	8	7	9	8 1	9 3	
1							
0	1				8		
.	.	1 3		.			
0	4	2.	. 7	3	6.		
5	6	6 7	4	2	4	0 5	
1					2		
0	9				1		
.	.	2 4	1 6	.			
0	7	. 5	. 0	3	3.	3.	
0	4	8	2	7	1 1	1 9	

10

20

30

40

【表 2 0 a - 3】

[ 薬 物]	6						相加的阻害	10	
	1								
	0	7		1 8	5 5				
	.	6 8	2 0	.	5 3	6 0			
	0	. 6	5.	7	. 3	. 0			
0	4	9 3	8	3	0				
T A F ( n M)							化 合 物 3 ( n M)	20	
3	7	8							
.	8	5							
7	.	7 7		.	9 2	9 6			
0	3	7 7	. 2	8	. 7	. 8			
1	6	. 7	2	5	2	2			
2	3	7							
3	.	6 2	6 1	.	8 7	9 4			
4	3	. 3	. 5	1	. 7	. 6			
5	9	7	5	2	1	3			
6	2	5							
7	8	3					30		
8	.	2 6	.		7 6	8 9			
9	7	. 7	2 5	5	. 0	. 5			
0	8	9	. 2	5	9	4			
1	3								
2	3	7							
3	.	— 0		.	6 7	8 5			
4	8	1.	. 9	2	. 7	. 8			
5	4	1 6	9	8	2	8			
6	—	2					40		
7	8	9							
8	.	— 1	— 1	.	6 3	8 4			
9	7	1.	4.	0	. 4	. 0			
0	7	8	2 3	6	9	3			
1	— 2		— 5	3	6 6	8 5			
2	.	. 7	. 0	4	. 4	. 3			
3	0	9	2	.	3	2			

20

30

40



【表 2 0 a - 4】

0				7		
				8		
				6		
				1		
				7		
[		6 8	2 0	.	1 8	
薬		. 6	5.	7	5 3	5 5
物]	0	4 2	9 3	8	. 3	6 0
T						
A						
F						
(						
n						
M)						
3						
.						
7						
0	0	0	0	0	0	0
1						- 1
.						. 1
2						2 1
3	0	0	0	0	0	5
0		7 .	4 .			- 0
.		5 6	0 8			. 6
4		4 4	4 1			0 5
1	0	7	5	0	0	9
0						
.						
1						
4	0	0	0	0	0	0
0						
.		1 8				
0		. 8				
5	0	5 3	0	0	0	0
0						
.						
0						
0	0	0	0	0	0	0

相乗作用プロット (99.9%)

ボンフ  
エラー  
ニ調整 98%

相乗作用 30.5

対数容積 6.94

拮抗作用 -1.73

対数容積 -0.39

10

20

30

40

表 2 0 b : H B s A g に対する T A F 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

50

[illegible]

20

30

40

[illegible]

【表 2 0 b - 3】

	0	4	9 3	7	. 3	. 0	
	0			.	3	0	
				7			
				8			
T A F (nM)							化 合 物 3 (nM)
				—			
	—			1			
	6			2			
	.	— 2	— 2	.		4 0	
3 .	7	4 .	9 .	1	8 .	. 0	
7 0	2	1 7	7 5	8	8 6	6	
	1						
	0			6			
	.	— 3	— 8	.	2 3	4 9	
1 .	9	. 5	. 2	4	. 9	. 9	
2 3	7	9	4	1	7	9	
	1						
	1			6			
	.	— 3	— 7	.	2 4	5 0	
0 .	2	. 2	. 8	7	. 2	. 1	
4 1	9	1	5	5	4	7	
	1						
	2			8			
	.	— 1	— 5	.	2 5	5 1	
0 .	8	. 4	. 9	3	. 5	. 0	
1 4	3	2	8	7	6	4	
				—			
	—			1			
	7			2			
	.	— 2	— 3	.			
0 .	3	4 .	0 .	8	8 .	3 9	
0 5	5	9	5 2	5	3 2	. 7	
				—			
				5			
		— 1	— 2	.		4 3	
0 .		6 .	1 .	1	1 4	. 8	
0 0	0	3 5	5 8	2	. 6	3	

10

20

30

40

【表 2 0 b - 4】

[薬物]	6						相乗作用プロット (99.9%)
	1						
	0	7		18	55		
	. 68	20	. 53	60			
	0	. 6	5 .	7	. 3	. 0	
	0	4	93	8	3	0	
TA F (nM)							ボンフ エラー ニ調整 98%
3. 70	13		20				相乗作用 64. 13
	. 8		. 8				
	75		66				
	0	9	3	0	0	0	
1. 23	0 .		5 .				対数容積 14. 6
	08		89				
	55		47				
	0	3	9	0	0	0	
0. 41	8 .						拮抗作用 0
	39						
	20						
	0	0	8	0	0	0	
0. 14	0		0	0	0	0	対数容積 0
	15						
	. 0						
	16						
05	0	0	5	0	0	0	
0.							
00	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

表 2 0 c : H B e A g に対する T A F 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

40

【表 2 0 c - 1】

[ 薬 物]	1 8 5 5										平均%阻害
	6 8 2 0 6 1 5 1 5 5										
	0 .	. 5	5 .	7 .	. 8	. 5					
	0 0	9	7 6	2 8	5	6					
T A F ( n M )											化合物 3 ( n M)

3 . 7 0	1 1 . 8 6 . 7 2 7 6 1 1 1 0 1 8 2 6 9 . 6	2 5 1 9 2 7	
1 . 2 3	9 . . 3 . 5 . 2 . 3 5 5 9 1 9 8 3 8 . 2		
0 . 4 1	7 6 3 2 9 8 7 5 - 2 - 3 1 3 1 8		
0 . 1 4	. 7 . 2 1 . . 9 . 7 4 6 8 4 0 7 5 2 . 8		
0 . 0 5	1 7 0 4 2 1 8 5 8 - 5 - 6 2 9 4 0		
0 . 0 0	. 0 . 3 2 . . 6 . 3 0 5 3 7 7 6 8		
[ 薬 物 ]	0 . . 5 5 . 7 . . 8 . 5 0 0 9 7 6 2 8 5 6	1 8 5 5 5 1 5 5	標準偏差 (%)
T A F ( n M )			化合物 3 ( n M )
3 . 7 0	8 . . 2 . 3 . 3 1 1 3 . 5 4 5 5 9 . 4 5 6 1 3 1 1	1 9 1 7 1 4	
1 . 2 3	. 9 1 . 5 . 6 . . 0 5 . 1 0 5 2 6 2 3 6 6 9 1 8		
0 . 4 1	. 4 7 . 8 . 4 . 7 . 2 . 4 3 5 9 8 0 2 1 9 7 5 1 1 1 2		
0 . 1 4	. 4 1 9 4 . . 9 5 . 4 . 1 . . 4 0 8 9 4 4 8 9		
0 . 0 5	1 6 9 . 6 . 4 . 9 . 7 . . 3 0 9 9 6 1 5 2 0 1		

20

40

	6						
	2 8	1 1					
0 .	. 2	2 .	6 .	5 .	. 6	6 .	
0 0	9	3	3 1	6 4	9	3 7	
	1 8 5 5						
	6 8	2 0	6 1	5 1	5 5		
[薬物]	0 .	. 5	5 .	7 .	. 8	. 5	相加的阻害
	0 0	9	7 6	2 8	5	6	
T A F (n M)							化合物 3 (n M)
	1 1	1 4			3 8	4 7	
3 .	. 8	7 .	6 .	. 3	. 0	. 4	
7 0	7	4 2	2 9	1	1	6	
	1 2			3 6	4 6		
1 .	9 .	5 .	4 .	. 4	. 6	. 2	
2 3	9 1	3 6	2 1	1	3	9	
	- 4			4 1			
0 .	1 .	- 3	. 4	4 .	3 0	. 4	
4 1	7 6	. 2	6	4 8	. 9	3	
	- 2	- 7	- 9	3 8			
0 .	. 7	. 9	. 2	0 .	2 7	. 7	
1 4	8	7	9	0 7	. 7	2	
	- 3		- 5	3 0 4 1			
0 .	1 .	. 8	. 0	3 .	. 4	. 0	
0 5	1 7	2	9	9 1	8	8	
	- 5		- 6	2 9 4 0			
0 .	. 0		. 3	2 .	. 6	. 3	
0 0	0	5	3	7 7	6	8	
	1 8 5 5						
	6 8	2 0	6 1	5 1	5 5		
[薬物]	0 .	. 5	5 .	7 .	. 8	. 5	相乗作用プロット (9 9 . 9 %)
	0 0	9	7 6	2 8	5	6	
T A F (n M)							ボンフェ ローニ調 整 9 8 %

40



【表 2 0 c - 4】

						2 .		
						4 2		
3 .						4 0		
7 0	0	0	0	0	0	4	相乘作用	5
		2 .						
		5 7						
1 .		4 4						
2 3	0	5	0	0	0	0	对数容積	1 . 1 4
0 .								
4 1	0	0	0	0	0	0		
0 .								
1 4	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0 .								
0 5	0	0	0	0	0	0	对数容積	0
0 .								
0 0	0	0	0	0	0	0		

表 20 d : P H H 細胞培養系中における T A F 及び化合物 3 のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 20 d】

HBV アッセイ指標	阻害剤A		阻害剤B	阻害剤A EC <sub>50</sub> (nM) #	阻害剤B EC <sub>50</sub> (nM) #	相乗容積 (μ <sup>2</sup> M) %	相乗容積	拮抗容積 (μ <sup>2</sup> M <sup>2</sup> %) *	拮抗対数容積	判定
HBV DNA	T F	A 3	化合物 3	0.87 406 5	87 6. 5	30 . 5	6. 94	-1. 73	-0. 39	相乗作用
HBs Ag	T F	A 3	化合物 3	>1 00	77 93	64 . 3	14 . 6	0	0	相乗作用
HBc Ag	T F	A 3	化合物 3	>1 00	88 50	5. 0	1. 14	0	0	相加的

\* 99.9%信頼区間  
# 前の別の試験で測定

【 0 3 4 8 】

## 实施例 2 1

IFN 2 a 及び化合物 2 2 のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中のHBV感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物22（スルファモイ

ルベンズアミド化学クラスに属するHBV封入低分子阻害剤)及びPEG化インターフェロン 2a (IFN 2a、肝細胞の自然免疫経路を活性化する抗ウイルス性サイトカイン)からなる2種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

#### 【0349】

##### 結果及び判定

IFN 2a (3倍希釈系列及び5点滴定における、10.0 IU/mL ~ 0.123 IU/mLの濃度範囲)を化合物22 (3倍希釈系列及び5点滴定における、5000 nM ~ 61.721 nMの濃度範囲)と混合して試験した。IFN 2aまたは化合物22による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定されたHBV DNA、HBsAg及びHBeAgの平均%阻害、及び3点の複製の標準偏差については、以下に示す表21a、表21b及び表21cに記載している。IFN 2a及び化合物22のEC<sub>50</sub>値については前の試験で測定しており、表21dに記載している (異なるロットのPHH細胞に若干の違いが認められた)。

#### 【0350】

MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman (1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相加的から相乗的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表21d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡またはCCK8アッセイで観察されなかった。

表21a: HBV DNAに対するIFN 2a及び化合物22のインビトロ混合物の効果

【表21a - 1】

[薬物]	0	1 6 5 0					
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
	0	.	7 5	.	5 .	. 6 . 0	
	0	3	1 9	5 6	7	0	
IFN α 2 a IU/ mL							平均%阻害 化合物 2 2 (μ M)
1 0 .	5	.	5 .	3 .	3 .	7 8 3	
0 0	9	8	6	4	2	. 3	
	5						
	2						
	.	6 9	7 1		7 2	8 4	
3 . 3	3	.	7 .	3 6	8 .	0 . 7	
3	9	9	6	.	3 1	6	
	2	5 9	5 9	5 5	6 3	8 0	
1 . 1	8	.	7 .	6 .	1 .	2 . 5	
1	.	7	1	7	2	9	

【表 2 1 a - 2】

0 . 3 7	0						
	8						
	6						
	.	4 4	4 2	4 2	6 1	7 5	
	5	. 0	. 4	. 8	. 3	. 3	
	9	9	8	2	3	3	
	—						
	1						
	8						
	.	2 9	2 3		4 5	7 8	
0 . 1 2	5	. 9	. 9	2 7	. 6	. 6	
	6	7	9	. 7	3	5	
		— 9	— 3	— 1	2 2	6 9	
0 . 0 0		. 0	3 .	3 .	. 3	. 1	
	0	2	5 3	7 2	1	9	
[薬物 ]	0				1 6	5 0	
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0	
	0	3	1 9	5 6	7	0	
I F N α 2 a I U / mL							
	7						
	.			1 0			
	1 0 .	2	3 .	0 .	. 1	3 .	4 .
	0 0	4	9 5	5 6	7	0 6	6
	1						
	1						
	.				1 1		
	3 . 3	4	3 .	4 .	7 .	. 1	4 .
	3	3	1	5 2	4	1	4 2
1 . 1 1	1						
	6						
	.			2 2			
	4	2 .	2 .	. 2	6 .	1 .	
	4	7 1	7 8	6	6 6	3 4	
	3	1 1			1 4		
	0 . 3	3	. 8	2 .	7 .	. 2	1 .
7	.	1	7 3	7	5	8 6	

標準偏差 (%)  
化合物  
2 2 (  $\mu$  M)

	4 9 2 3 . 1 1 9 1 6 . 9 1 0 9. 2. 7 . 1 7 . 1 2 4 9 3 5 . 1 2 2 9 2 4 2 2 0. 0 3 . 9 . 1 . 9 . 7 2. 0 8 5 6 6 7 7 5	
[藥物]	0 . 0 0 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 . 7 5 . 5 . . 6 . 0 3 1 9 5 6 7 0	相加的阻害 化合物 2 2 ( $\mu$ M)
I F N $\alpha$ 2 a I U / mL	4 5 5 3 6 8 8 7 5 5 5 . 2 . 3 . 1 . 3 9 . 3 5 7 5 7 5 2 . 3 6 4 5 6 3 8 5 3 4 8 . 4 . 8 . 0 . 3 9 . 1 3 6 1 3 2 8 . 2 1 1 8 4 4 7 7 0 . 5 3 . . 2 . 1 . 8 8 9 9 7 1 3 4 6 . — 1 — 2 — 6 2 7 7 1 0 5 8 4 . . 2 . 4 . 2 7 9 4 7 3 3 3 2 — — 2 — 5 — 3 6 3 0 1 9 . 8 . 4 . 7 . . 4 2 8 2 5 3 1 8 3 8 9 7	

40

【表 2 1 a - 4】

	. 5 6						
0 . 0		— 9	— 3	— 1	2 2	6 9	
0	0	. 0	3 .	3 .	. 3	. 1	
		2	5 3	7 2	1	9	
[薬物]		6 1	1 8	5 5	1 6		相乗作用プロット (99.9%)
		. 7	5 .	5 .	6 6	5 0	ボンフ ェロー ニ調整 98%
	0	2 8	1 9	5 6	. 7	0 0	
I F N							
α 2 a							
I U /							
m L		2 .					
		2 8	2 0				
1 0 .		0 5	. 2				相乗作 3 1 1
0 0	0	5	6 7	0	0	0	用 . 7 2
		1 1	2 0				
		. 4	. 0				
3 . 3		8 7	5 4				対数容 7 0 .
3	0	9	7	0	0	0	積 9 6
		2 9					
		. 2	4 6				
1 . 1		6 1	. 4				
1	0	4	9 1	0	0	0	
		7 .	5 8	2 3			
		0 6	. 2	. 7			
0 . 3		3 2	2 5	0 9			拮抗作
7	0	9	6	3	0	0	用 0
			4 2	2 9		6 .	
		6 .	. 9	. 2	7 .	9 8	
0 . 1		2 3	0 6	9 0	4 6	5 4	対数容
2	0	4 9	7	9	2 8	1	積 0
0 . 0							
0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

表 2 1 b : H B s A g に対する I F N 2 a 及び化合物 2 2 のインビトロ混合物の効果

【表 2 1 b - 1】

[ 薬 物]	0	6	1 8	5 5	1 6	5 0	平均%阻害
	.	1	5 .	5 .	6 6	0 0	
	0	.	1 9	5 6	. 6	. 0	

【表 2 1 b - 2】

	0	7	7	0		
		3				
I F N α 2 a I U / m L						化合物 2 2 (μ M)
	2					
	2	3				
1 0	0	.	1 8	2 3	3 2	
. 0	.	8	. 4	. 5	. 4	4 6
0	1	6	4	1	7	. 3
	2					
	1	1				
	0	.	1 8		3 2	4 0
3 .	.	0	. 8	2 3	. 7	. 9
3 3	2	9	6	. 8	2	2
	1					
	7					
	8	.	1 9	1 8	2 9	4 1
1 .	.	5	. 0	. 4	. 2	. 7
1 1	8	2	2	4	3	7
	1					
	0					
	4	.	1 2	1 2	1 9	3 2
0 .	.	3	. 8	. 7	. 6	. 9
3 7	6	8	9	3	4	9
	—	1				
	1	0				
	.	.	1 0	1 6	2 0	3 3
0 .	6	3	. 4	. 1	. 0	. 2
1 2	7	3	8	8	1	2
	—					
	1					
	3					
	.	— 1	— 5	1 0	2 3	
0 .	8	0.	. 0	. 3	. 0	
0 0	0	3	5 8	8	4	9
[ 薬 物]	0	6	1 8	5 5	1 6	5 0
	.	1	5.	5.	6 6	0 0
						標準偏差 (%)

10

20

30

40

	0 . 1 9 5 6 . 6 . 0 0 7 7 0 3	化 合 物 2 2 ( $\mu$ M)	
I F N $\alpha$ 2 a I U / m L	1 8 1 0 3 . . 0 . 1 6 . 2 . 6 . 3 . 0 1 5 5 3 2 4 5 5 2 4 1 1 8 . . 1 0 1 0 3 . 1 2 8 . 3 . . 5 . 2 3 3 2 3 2 3 9 3 5 2 1 1 4 2 . . 1 2 1 . 5 0 8 . 8 . . 1 1 1 1 1 6 1 7 5 2 3 . 6 9 7 . . 1 7 1 2 1 5 0 . 7 4 . 4 8 . . 4 . 0 3 7 5 8 2 4 7 5 1 2 1 0 0 . . 1 2 1 4 0 . 2 6 5 . 9 . . 8 . 2 1 2 3 8 9 7 8 2 1 9 1 1 8 6 . . 1 7 1 6 1 5 0 . 6 2 1 2 . 7 . 1 . 8 0 0 3 3 . 6 2 1 1		
[ 藥 物]	0 6 1 6 5 0 . 1 1 8 5 5 6 6 0 0 0 . 5 . 5 . . 6 . 0 0 7 1 9 5 6 7 0		相 加 的 阻 害

40



【表 2 1 b - 4】

		3						化合物 2 2 (μ M)	
I F N α 2 a I U / m L									
		2	9						
1 0	0	.	1 1	1 6	2 8	3 8			
. 0	.	0	. 6	. 0	. 3	. 5			
0	1	5	5	4	6	5			
		—							
	1	2							
	0	.			1 9	3 0			
3 .	.	2	0 .	5 .	. 4	. 9			
3 3	2	2	7	6 4	9	3			
		—							
	3								
	8	.	— 0		1 8	2 9			
1 .	.	8	. 8	4 .	. 2	. 8			
1 1	8	1	5	1 7	3	6			
		—							
	8								
	4	.	— 5	— 0	1 4	2 6			
0 .	.	5	. 4	. 2	. 4	. 6			
3 7	6	9	9	5	6	3			
		—							
	—	1							
	1	5							
	.	.	— 1	— 6		2 1			
0 .	6	7	2 .	. 8	8 .	. 8			
1 2	7	3	4 3	3	8 4	1			
		—							
	1								
	3								
	.		— 1	— 5	1 0	2 3			
0 .	8	0 .	. 0	. 3	. 0				
0 0	0	3	5 8	8	4	9			
[ 薬 物]		6	1 8	5 5	1 6				
	1	5 .	5 .	6 6	5 0				
	0	.	1 9	5 6	. 7	0 0			
								相乗作用プロット (99.9%)	

10

20

30

40

【表 2 1 b - 5】

	7 2 8							
I F N α 2 a I U / m L							ボンフ エロー ニ調整 98%	
1 0 . 0 0	0	0	0	0.	0 9 8 1 6 0 0	0	相乗作 用 8. 5 9	10
3 . 3 3 1 . 1 1 0 . 3 7	0	0	0	5. 2 2 6 3 7 0 0	0	0	対数容 積 1. 9 6	20
0 . 1 2 0 . 0 0	0	0	0	3. 2 6 2 7 3 0 0	0	0	拮抗作 用 0	
	0	0	0		0	0	対数容 積 0	30

表 2 1 c : H B e A g に対する I F N 2 a 及び化合物 2 2 のインビトロ混合物の効果

【表 2 1 c - 1】

			1	5		
		6	8	5		
	0	1	5	5	1 6	5 0
	.	.	.	.	6 6	0 0
[ 薬	0	7	1	5	. 6	. 0
物]	0	3	9	6	7	0
I F						
N α						
2 a						
I U						
/ m						
L						
1 0	3	2	2	2	3 4	4 8

平均%阻害  
化 合 物  
2 2 (  $\mu$   
M)

【表 2 1 c - 2】

. 0 0	0	9	6	6	. 3	. 5	10
	.	.	.	.	7	5	
	1	1	4	5			
	3		3	1			
	1	1		1			
	7	7		9			
	.	.		.	2 9		
	3 .	1	8	1	3	. 3 3 9	
	3 3	6	5	8	3	8 . 7	
		1	1	1	1		
1 . 1 1		5	4	5	0		20
	.	.	.	.	2 6	4 1	
	2	1	7	9	. 6	. 9	
	7	7	6	8	7	5	
				—			
	1	2	2	0			
	.	.	.	.	1 0	2 7	
	0 .	7	0	1	9	. 3 . 1	
	3 7	8	4	1	9	4 1	
		7	1	1	8		
0 . 1 2	.	1	0	.		3 4	30
	4	.	.	0	1 4	. 3	
	2	7	2	6	. 8	9	
			—	—			
		—	9	8			
		7	.	.		2 0	
	0 .	.	5	1	5 .	. 9	
	0 0	0	2	7	7	9 2 3	
[ 薬 物]			1	5			40
			6	8	5		
	0	1	5	5	1 6	5 0	
	.	.	.	.	6 6	0 0	
	0	7	1	5	. 6	. 0	
	0	3	9	6	7	0	
I F N α 2 a I U ／ m L 1 0							標準偏差 (%) 化 合 物 2 2 (μ M)
	0	8	5	1	4 .	3 .	

【表 2 1 c - 3】

. 0	.	.	.	.	1 2	3		
0	3	2	0	1				
	3	5	2	2				
	5	6	6	6				
	.	.	.	.				
3 .	5	2	1	0	3 .	4 .		
3 3	1	5	6	3	4 1	7 9		
		1		1				10
	2	2	3	1				
	.	.	.	.				
1 .	9	6	5	0	6 .	8 .		
1 1	1	4	2	8	9 7	9 3		
		1		1				
		2	8	3				
	3	.	.	.				
0 .	.	7	6	4	7 .	4 .		
3 7	5	4	2	7	9 1	9 3		20
		9	7	4				
	6	.	.	.	1 1			
0 .	.	7	4	7	. 4	7 .		
1 2	9	2	3	2	6	2 5		
				1				
	7	5	6	3				
	.	.	.	.				
0 .	8	8	8	2	8 .	9 .		
0 0	6	3	8	3	5 1	8 9		30
			1	5				
		6	8	5				
	0	1	5	5	1 6	5 0		
	.	.	.	.	6 6	0 0		
[ 薬	0	7	1	5	. 6	. 0		
物]	0	3	9	6	7	0		
I F							相加的阻害	
N α							化 合 物	
2 a							2 2 ( μ	40
I U							M)	
/ m								
L								
1 0	3	2	2	2	3 4	4 4		
. 0	0	5	3	4	. 2	. 7		
0	.	.	.	.	7	5		

	1	1	4	4			
	3		4	2			
	1			1			
	7	1	9	0			
	.	1	.	.	2 2		
3 .	1	.	2	3	. 0	3 4	
3 3	6	2	3	9	6	. 5	
	1						
	5	9	7	8			
	.	.	.	.	2 0		
1 .	2	1	1	3	. 2		
1 1	7	7	6	5	9	3 3	
	—	—	—				
	1	5	7	6			
	.	.	.	.		2 2	
0 .	7	2	6	2	7 .	. 3	
3 7	8	9	2	4	5 9	4	
			—	—			
	7	0	1	0			
	.	.	.	.			
0 .	4	7	4	1	1 2	2 6	
1 2	2	5	4	4	. 9	. 8	
			—	—			
		—	9	8			
		7	.	.		2 0	
0 .	.	.	5	1	5 .	. 9	
0 0	0	2	7	7	9 2	3	
[ 薬 物]		6	1	5			
		1	8	5			
		.	5	5			
		7	.	.	1 6		
		2	1	5	6 6	5 0	
	0	8	9	6	. 7	0 0	
I F N α 2 a I U ／ m L 1 0							相乗作用プロット ( 99.9%) ボンフ エラー ニ調整 98%
	0	0	0	0	0	0	相乗作 0

40

【表 2 1 c - 5】

. 0							用
0							
3 .							対 数 容
3 3	0	0	0	0	0	0	積 0
1 .							
1 1	0	0	0	0	0	0	
0 .							拮 抗 作
3 7	0	0	0	0	0	0	用 0
0 .							対 数 容
1 2	0	0	0	0	0	0	積 0
0 .							
0 0	0	0	0	0	0	0	

10

表 2 1 d : P H H 細胞培養系中における I F N 2 a 及び化合物 2 2 のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 2 1 d】

20

H B V アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻 害剤 B	阻 害 剤 A E C <sub>50</sub> (I U / m L) #	阻 害 剤 B E C <sub>50</sub> (n M) #	相 乗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M <sup>2</sup> %) *	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( μ <sup>2</sup> M <sup>2</sup> %) *	拮 抗 対 数 容 積	判定
H B V D N A	I F N α 2 a	化 合 物 2 2	2 . 1 5 4	1 0 2 0	3 1 1 . 7 2	7 0 . 9 6	0	0	相 乗 作 用
H B s A g	I F N α 2 a	化 合 物 2 2	1 3 . 8	1 2 , 8 0 0	8 . 5 9	1 . 9 6	0	0	相 加 的
H B e A g	I F N α 2 a	化 合 物 2 2	1 0 . 2 4	1 0 , 7 4 0	0	0	0	0	相 加 的

30

\* 9 9 . 9 % 信 頼 区 間  
# 前 の 別 の 試 験 で 測 定

40

## 【 0 3 5 1 】

## 実施例 2 2

## 化合物 2 2 及び T A F のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 2 2 (スルファモイルベンズアミド化学クラスに属する H B V 封入低分子阻害剤) 及びテノホビル (プロドラッグであるテノホビルアラフェナミド、すなわち T A F の形態、H B V ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的また

50

【 0 3 5 2 】

T A F ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、 $10.0 \text{ nM} \sim 0.12 \text{ nM}$  の濃度範囲 ) を化合物 22 ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、 $5000 \text{ nM} \sim 61.721 \text{ nM}$  の濃度範囲 ) と混合して試験した。化合物 22 または T A F による治療 ( 単独または混合 ) のいずれかにおいて測定された H B V D N A、H B s A g 及び H B e A g の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 22 a、表 22 b 及び表 22 c に記載している。T A F 及び化合物 22 の  $\text{EC}_{50}$  値については前の試験で測定しており、表 22 d に記載している ( 異なるロットの P H H 細胞に若干の違いが認められた )。

【 0 3 5 3 】

表 2 2 a : H B V    D N A に対する化合物 2 2 及び T A F のインビトロ混合物の効果

【表 2 2 a - 1】

[illegible]

10

20

30

40



【表 2 2 a - 2】

7	1	.	1	4	9	4	
	.	9	.	.	.	.	
	9	2	8	6	3	2	
	2		5	8	7	4	
		—		1			
	—	5	5	1	3	5	
	2	.	.	.	6	2	
0 . 1	.	2	1	6	.	.	
2	6	2	2	7	5	5	
			—		2	5	
		2	3	8	7	4	
		.	.	.	.	.	
0 . 0		3	3	0	9	6	
0	0	8	3	1	8	6	
	6	1	5	1			
	1	8	5	6			
	.	5	5	6	5		
	7	.	.	6	0		
	2	1	5	.	0		
[薬物]	0	8	9	6	7	0	
T A F (nM)							
						1	
	1	8		1	3	1	
	.	.	3	0	.	.	
1 0 .	3	3	.	.	3	5	
0 0	2	6	9	1	9	7	
	1	1			1		
	2	5	5	4	3	7	
	.	.	.	.	.	.	
3 . 3	3	2	4	3	6	6	
3	4	6	2	8	8	6	
	2		2	1		1	
	5	8	0	8	6	1	
	.	.	.	.	.	.	
1 . 1	3	6	3	2	6	3	
1	8	1	1	6	4	3	
	8	1	1	1	1	8	
0 . 3	.	0	6	2	1	.	
7	1	.	.	.	.	9	

10

20

30

40

標準偏差 (%)  
化合物 2 2  
(nM)

【表 2 2 a - 3】

0 . 1 2	1	6	4	3	3	3	10
		4	1	7	1		
			1	1		1	
	3	6	3	1	0	0	
	.	.	.	.	.	.	
	2	4	4	6	9	7	
	8	1	4	4	4	6	
			1	1		1	
	0	7	3	8	0	7	
	.	.	.	.	.	.	
0 . 0 0	1	4	4	4	8	1	
	9	9	2	4	3	2	
[薬物]	6	1	5	1			20
	1	8	5	6			
	.	5	5	6	5		
	7	.	.	6	0		
	2	1	5	.	0		
	0	8	9	6	7	0	
T A F (nM)							相加的阻害 化合物 2 2 (nM)
1 0 . 0 0	5		4		6	7	
	0	5	8	5	4	7	30
	.	1	.	4	.	.	
	2	.	5	.	1	4	
	1	4	5	2	4	3	
	4	4	3	4		7	
	0	1	8	4	5	2	
	.	.	.	.	6	.	
3 . 3 3	1	5	1	9	.	8	
	6	8	7	5	9	7	
				1	3		
	4	7	1	2	1	5	
1 . 1 1	.	.	.	.	.	6	40
	9	2	7	5	5	.	
	5	1	8	6	4	9	
	—		—			5	
	1	0	5	6	2	3	
	.	.	.	.	6	.	
0 . 3 7	9	5	3	2	.	7	
	2	1	1	4	6	9	

【表 2 2 a - 4】

0 . 1 2	—	—		2	5	
	—	0	6	5	6	3
	2	.	.	.	.	.
	.	1	0	6	1	4
	6	6	2	2	1	8
			—		2	5
0 . 0 0		2	3	8	7	4
		.	.	.	.	.
		3	3	0	9	6
	0	8	3	1	8	6
[薬物]	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6	5	
	7	.	.	6	0	
	2	1	5	.	0	
	0	8	9	6	7	0
T A F (nM)						
1 0 . 0 0	0	0	0	0	0	0
				0		
				.		
				7		
				7		
				5		
3 . 3 3				4		
	0	0	0	2	0	0
1 . 1 1	0	0	0	0	0	0
0 . 3 7	0	0	0	0	0	0
0 . 1 2						
0 . 0	0	0	0	0	6	0
	0	0	0	0	0	0

相乗作用プロット  
(99.9%)ボンフ  
エラー  
ニ調整 98%相乗作  
用 8.07対数容  
積 1.84拮抗作  
用 0対数容  
積 0

10

20

30

40

【表 2 2 a - 5】

0	
---	--

表 2 2 b : H B s A g に対する化合物 2 2 及び T A F のインビトロ混合物の効果

【表 2 2 b - 1】

[薬物]							平均%阻害 化合物 2 2 (n M)
	0	6	1	5	1		
T A F (n M)		1	8	5	6		
		.	5	5	6	5	
		7	.	.	6	0	
		2	1	5	.	0	
	0	8	9	6	7	0	
1 0			2		2	3	
	7	3	1	7	4	8	
	.	.	.	.	.	.	
	9	9	3	8	8	5	
	7	7	3	9	4	4	
		—		1	2	4	
	9	6	1	6	4	4	
3 . 3 3	.	.	6	.	.	.	
3 3 3 3	0	4	.	5	2	0	
3	6	8	7	3	7	7	
	2	1		2	2	4	
	0	3	2	0	7	6	
1 . 1 1	.	.	1	.	.	.	
1 1 1 1	8	8	.	9	1	1	
1	1	5	8	8	8	1	
	1	—	1	1	2	4	
	0	3	0	0	3	5	
0 . 3 7	.	.	.	.	.	.	
0 3 7 0	7	6	0	3	2	0	
4	8	2	4	2	1	5	
	2	1	1		2	4	
	9	9	4	2	1	8	
0 . 1 2	.	.	.	1	.	.	
3 4 5 6	8	9	5	.	6	5	
8	2	9	6	8	7	7	
		—		—	1	2	
		0	2	2	7	0	
		.	.	.	.	.	
		3	3	1	6	7	
0	0	2	7	7	8	3	

10

20

30

40

10

40

【表 2 2 b - 3】

	2 8	1 9	5 6	.7		
T A F (n M)						化合物 2 2 (n M)
		1		2	2	
	7	7	0	5	4	7
	.	.	.	.	.	.
1 0	9	6	1	9	2	0
	7	8	5	7	4	5
			1		2	2
	9	8	1	7	5	7
3 . 3 3	.	.	.	.	.	.
3 3 3 3	0	7	2	0	1	9
3	6	7	2	9	4	1
	2	2	2	1	3	3
	0	0	2	9	4	7
1 . 1 1	.	.	.	.	.	.
1 1 1 1	8	5	6	0	8	2
1	1	6	9	9	1	3
	1	1	1		2	2
	0	0	2	8	6	9
0 . 3 7	.	.	.	.	.	.
0 3 7 0	7	4	8	8	5	2
4	8	9	9	4	5	8
	2		3		4	4
	9	2	1	2	2	4
0 . 1 2	.	9	.	8	.	.
3 4 5 6	8	.	4	.	2	3
8	2	6	8	3	3	7
	—		—	1	2	
	0	2	2	7	0	
	.	.	.	.	.	.
	3	3	1	6	7	
0	0	2	7	7	8	3
	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6	5	
	7	.	.	6	0	
	2	1	5	.	0	
[薬物]	0	8	9	6	7	0
						相乗作用プロッ ト ( 9 9 . 9 % )

10

20

30

40

【表 2 2 b - 4】

T A F (n M)							ポンプ エラー ニ調整	9 8 %
0							相乗作 用	9 . 0 9
1 0	0	0	0	0	0	0	対数容 積	2 . 0 7
						2		
						.		
						1		
						4		
3 . 3 3						0		
3 3 3 3						3		
3	0	0	0	0	0	4		
1 . 1 1								
1 1 1 1								
1	0	0	0	0	0	0	拮抗作 用	— 2 . 1
						6		
						.		
						9		
						5		
0 . 3 7						0		
0 3 7 0						1		
4	0	0	0	0	0	2		
			—					
			2					
			.				対数容 積	— 0 . 4
			1					
0 . 1 2			4					
3 4 5 6			3					
8	0	0	4	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0		

10

20

30

表 2 2 c : H B e A g に対する化合物 2 2 及び T A F のインビトロ混合物の効果

40



【表 2 2 c - 1】

	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6	5	
	7	.	.	6	0	
[ 薬 物	2	1	5	.	0	
]	0	8	9	6	7	0
T A F						平均%阻害
( n M						化合物 2 2
)						( n M)

10

20

30

40

【表 2 2 c - 3】

) <div>1 0 . 0 0</div> <div>3 . 3 3</div> <div>1 . 1 1</div> <div>0 . 3 7</div> <div>0 . 1 2</div> <div>0 . 0 0</div>	1			1	1	
	9	1	2	7	1	8
	.	3	.	.	.	.
	8	.	2	6	9	6
	3	7	5	7	5	4
		1	1		1	
	9	3	5	3	4	9
	.	.	.	.	.	.
	5	3	7	5	7	5
	9	2	4	9	1	4
		1	1	1		
	8	4	6	0	1	2
	.	.	.	.	.	.
	9	2	1	7	5	7
	9	1	9	8	3	8
		3	1	1	1	
	5	4	6	2	2	
	.	.	.	.	.	7
	2	3	8	0	4	.
	6	6	6	5	5	4
		1				
	4	4	8	5	4	4
	.	.	.	.	.	.
	7	3	6	0	1	1
	1	9	1	8	8	9
		2	1	1	2	1
	0	0	0	7	0	1
	.	.	.	.	.	.
	6	5	6	1	7	6
	3	5	9	7	8	5
[ 薬 物 ]	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6	5	
	7	.	.	6	0	
	2	1	5	.	0	
	0	8	9	6	7	0
T A F ( n M )						相加的阻害 化合物 2 2 ( n M )

10

20

30

40

	2	1	1	1	3	4
	2	7	3	8	0	5
	.	.	.	.	.	.
1 0 .	8	6	2	9	6	7
0 0	5	7	8	5	4	9
	1			1		4
	9	1	9	5	2	3
	.	4	.	.	7	.
3 . 3	6	.	7	6	.	5
3	9	3	2	3	8	7
	2	1	1	1	3	4
	2	7	2	8	0	5
	.	.	.	.	.	.
1 . 1	5	3	9	6	3	5
1	6	6	5	4	8	9
			—			
		3	1	5		3
	9	.	.	.		6
0 . 3	.	8	2	3	1	.
7	9	5	8	4	9	7
	2	2			3	4
	6	1	1	2	4	8
	.	.	7	2	.	.
0 . 1	6	6	.	.	0	4
2	1	9	5	9	2	4
			—			
		—	1	—		2
		6	2	5	1	9
		.	.	.	0	.
0 . 0		7	4	0	.	7
0	0	1	1	6	1	4
	6	1	5	1		
	1	8	5	6		
	.	5	5	6	5	
	7	.	.	6	0	
[薬物]	2	1	5	.	0	
	0	8	9	6	7	0
T A F ( n M )						相乗作用プロット (99.9%) ボンフ エラー ニ調整 98%

40

【表 2 2 c - 5】

1 0 .							相 乗 作	
0 0	0	0	0	0	0	0	用	0
				—				
				0				
				.				
				6				
				1				
3 . 3				5			対 数 容	
3	0	0	0	3	0	0	積	0
					—			
					2			
					.			
					6			
					3			
1 . 1					4			
1	0	0	0	0	8	0		
0 . 3							拮 抗 作	— 3 .
7	0	0	0	0	0	0	用	2 5
0 . 1							対 数 容	— 0 .
2	0	0	0	0	0	0	積	7 4
0 . 0								
0	0	0	0	0	0	0		

10

20

表 2 2 d : P H H細胞培養系中における化合物 2 2 及び T A F のインビトロ混合物試験の結果の要約

30

【表 2 2 d - 1】

HBV アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻 害 剤 B	阻 害 剤 E C 50 (nM) #	阻 害 剤 E C 50 (nM) #	相 乗 容 積 ( $\mu$ M <sup>2</sup> %) *	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( $\mu$ M <sup>2</sup> %) *	拮 抗 対 数 容 積	判 定
HBV DNA	T A F	化 合 物 2 2	0 . 4 0 5	1 0 2 0	8 . 0 7	1 . 8 4	0	0	相加的
HB s Ag	T A F	化 合 物 2 2	> 1 0 0	1 2 , 8 0 0	9 . 0 9	2 . 0 7	- 2 . 1 4	- 0 . 4 9	相加的
HB e Ag	T A F	化 合 物 2 2	> 1 0 0	1 0 , 7 4 0	0	0	- 3 . 2 5	- 0 . 7 4	相加的

\* 99.9%信頼区間

【表 2 2 d - 2】

# 前の別の試験で測定

## 【0354】

## 実施例 23

化合物 22 及び化合物 25 のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の HBV 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 22 (スルファモイルベンズアミド化学クラスに属する HBV 封入低分子阻害剤) 及び化合物 25 (ジヒドロキノリジノン化学クラスに属する HBV DNA、HB s Ag 及び HB e Ag の低分子阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【0355】

## 結果及び判定

化合物 25 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、10.0 nM ~ 0.12 nM の濃度範囲) を化合物 22 (3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、5000 nM ~ 61.73 nM の濃度範囲) と混合して試験した。化合物 25 または化合物 22 による治療 (単独または混合) のいずれかにおいて測定された HBV DNA、HB s Ag 及び HB e Ag の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 23 a、表 23 b 及び表 23 c に記載している。化合物 25 及び化合物 22 の EC<sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 23 d に記載している (異なるロットの PHH 細胞に若干の違いが認められた)。

## 【0356】

Mac Synergy II 解析に従い、また Prichard 及び Shipman (1992) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的または相加的である (拮抗作用を有さない) ことが判明した (表 23 d)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡または CCK8 アッセイで観察されなかった。

表 23 a : HBV DNA に対する化合物 22 及び化合物 25 のインビトロ混合物の効果

【表 2 3 a - 1】

[薬物]	0					1 6	5 0	
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0		
	0	.	7 5	.	5 .	.	6 .	0
	0	3		1 9	5 6	7	0	
化合物 2 5 (n M)	3							
	7	5 4	5 2	6 3			8 5	
1 0 .	.	.	7 .	4 .	5	6 7	.	4
0 0	3	1		9	4	.	1 4	

平均%阻害  
化 合 物  
2 2 (n  
M)

	9 1 6 . 5 0 5 2 5 3 6 2 8 2 4 . 4 . 2 . 2 . 8 . 0 1 3 5 1 3 8 — 1 9 . 3 2 4 1 5 7 8 0 2 . 0 4 2 . 5 . 5 . 9 1 1 8 . 5 8 6 3 — 4 6 . 3 0 2 3 5 2 7 3 4 . 7 . 7 2 1 . 2 . 2 8 1 2 . 3 2 3 — 4 2 . 2 6 1 6 2 7 4 2 7 4 8 . 4 . 4 . 6 . 0 . 0 2 2 6 6 9 7 4 — 1 — 9 — 1 1 7 6 3 0 . 0 1 . . 1 2 . . 9 . 0 0 0 7 5 2 7 4 6	
[薬物]	0 . 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 0 . 7 5 . 5 . . 6 . 0 0 3 1 9 5 6 7 0	標準偏差 (%)
化合物 2 5 (nM)	7 . 3 4 . 2 . 4 . 5 . 1 . 3 1 1 5 7 9 4 0 9 9 5 6 4 . 7 . 4 . 3 . 3 . . 3 6 1 6 6 8 2 3 2 1	化合物 2 2 (nM)



	9 8 3 5 . 1 3 5 7 . 0 . . 4 7 . 1 . 1 1 8 7 6 8 8 2 6 3 4 5 1 0 . 3 . 6 . 0 . 7 . 1 . 7 6 4 6 9 2 1 5 7 1 2 1 . 0 . 1 0 7 . 5 . 0 . 2 . 2 5 8 3 6 3 1 6 1 6 4 0 . 0 . 0 0 5 . 4 . . 4 8 . 2 . 0 3 7 1 3 6 8 6 7 9 2	
[薬物]	0 . 0 0	0 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 . 7 5 . 5 . 6 . 0 3 1 9 5 6 7 0
化合物 2 5 (nM)	3 7 . 3 9 1 6 . 4 1 1 1 3 1 1 1	0 3 0 3 1 2 9 4 8 7 6 . 0 6 4 6 8 3 8 4 2 7 . 3 1 6 9 4 6 . 8 . 5 . . 4 . 1 1 5 9 7 9 7 9 1 2 — — 3 — 3 — 3 2 . 5 5 1 3 . 0 . 4 . 1 8 . 9
		相加的阻害 化合物 2 2 (nM)

40

10

20

30

40

【表 2 3 a - 5】

		1	1		5	4	
		6 0		7 1	5 8	1 9	
		. 2	5 2	. 2	. 7	. 6	
0 . 1		9 1	. 5	0 7	4 3	9 1	
2	0	5	6 4	7	4	4	対 数 容 積 0
0 . 0							
0	0	0	0	0	0	0	

10

表 2 3 b : H B s A g に対する化合物 2 2 及び化合物 2 5 のインビトロ混合物の効果

[illegible]

[illegible]

40

【表 2 3 b - 3】

	2		2	3			
	5		6	8			
	1			1			
	4		1	4			
	.	1	7	5	.	1	1
0 .	8	.	3	.	8	.	1
0 0	6	8	2	7	4	4	
			1	5			
			8	5			
	0		5	5	1	6	5
	.	6	1	.	.	6	6
[ 薬	0	.	7	1	5	.	6
物]	0	3	9	6	7	0	
化 合							
物 2							
5							
( n							
M)							
	4		3	4			
	2		7	0			
1 0	.	3	7	.	.	5	4
. 0	9	.	7	1	7	.	7
0	5	2		3	7	1	1
	2			1	1		
	0			2	7		
	.	1	3	.	.	3	7
3 .	8	.	5	7	7	.	1
3 3	1	6		2	8	3	3
				1	2		
	2			8	3		
	6	1	9	.	.	4	1
1 .	.	.	6	8	5	.	5
1 1	4	6		9	9	7	9
	1						
	2			4			
	.			.	9	3	0
0 .	9	4	.	0	.	.	8
3 7	3	9	5	4	6	8	9
	9			0	5	2	8
0 .	.	1	.	.	.	.	0
1 2	3	0	1	0	8	1	9

相加的阻害  
化合物  
2 2 (nM)

10

20

30

40

【表 2 3 b - 4】

	2		6	6			
			—				
			1	—			
			0	3			
		— 9	.	.	2 0	3 0	
0 .		. 1	2	8	. 6	. 9	
0 0	0	6	1	2	1	6	
			1	5			
			8	5			
			5	5			
		6 1	.	.	1 6		
[薬物]		. 7	1	5	6 6	5 0	
	0	2 8	9	6	. 7	0 0	
化合物 2							相乗作用プロット (99.9%)
5							ボンフ
(n							エラー 9 8
M)							ニ調整 %
1 0							
. 0							
0	0	0	0	0	0	0	相乗作用 9 .
		8 .					6 8
		6 4					
3 .		4 0					対数容 2 .
3 3	0	4	0	0	0	0	積 2
1 .							
1 1	0	0	0	0	0	0	
		1 .					
		0 3					
0 .		3 0					拮抗作用 0
3 7	0	4	0	0	0	0	対数容 0
0 .							積 0
1 2	0	0	0	0	0	0	
0 .							
0 0	0	0	0	0	0	0	

10

20

30

40

表 2 3 c : H B e A g に対する化合物 2 2 及び化合物 2 5 のインビトロ混合物の効果

【表 2 3 c - 1】

				5	1 6	5 0	
		6 1	1 8	5	6 6	0 0	
[ 薬	0 .	. 7	5 .	5	. 6	. 0	
物]	0 0	3	1 9	.	7	0	平均%阻害



【表 2 3 c - 2】

	5 6						化合物 2 2 (n M)
	4 2						10
1 0	2 8		3 9	.	4 2	5 2	
. 0	. 4	4 5	. 3	7	. 6	. 7	20
0	2	. 7	5	4	5	5	
	2 3						30
	1 3	2 9	2 4	.	2 4	3 9	
3 .	. 9	. 0	. 1	4	. 6	. 6	40
3 3	4	9	9	2	7	7	
	2 0						10
	1 4	2 3	1 8	.	2 5	3 6	
1 .	. 9	. 1	. 3	5	. 3	. 1	20
1 1	8	4	9	5	9	5	
	4 .						30
				.	1 7	2 7	
0 .	2 .	7 .	7 .	5	. 8	. 0	40
3 7	9	2 4	6 4	1	3	5	
	9 1 0						10
			1 0	.	2 0	3 3	
0 .	4 .	7 .	. 0	3	. 6	. 4	20
1 2	8	8 1	6	1	8	6	
	— 7						30
		— 1	— 1	.		2 1	
0 .		6 .	4 .	2	8 .	. 6	40
0 0	0	8 1	5 9	3	5	8	
	5 5 5						10
					1 6	5 0	
		6 1	1 8	.	6 6	0 0	20
[ 薬	0 .	. 7	5 .	5	. 6	. 0	
物]	0 0	3	1 9	6	7	0	30
化 合							
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
							10
							20
							30
							40
</							

物 2 5 ( n M)							2 2 (n M)
1 0				8			
. 0	3 .	4 .	6 .	3	4 .	2 .	
0	9 7	4 2	6 2	1	5 9	2 3	
				1			
				5			
				.	1 1		
3 .	9 .	1 .	6 .	1	. 7	2 .	
3 3	3	4	2 9	7	1	0 3	
				1			
				1			
				.			
1 .	6 .	7 .	9 .	5	8 .	9 .	
1 1	1 6	5 6	8	4	1 8	7 1	
				1			
				4			
	1 0		1 0	.		1 0	
0 .	. 4	7 .	. 0	2	7 .	. 3	
3 7	4	8	9	3	8 2	4	
				1			
				7			
	1 4			.			
0 .	. 2	8 .	1 .	0	9 .	4 .	
1 2	9	3 5	6 6	7	0 8	7 9	
				1			
				1			
	1 0	1 1		.			
0 .	. 7	. 8	5 .	3	4 .	6 .	
0 0	1	8	8 4	9	9 4	8 6	
[ 薬 物]				5			
				5			
				5	1 6	5 0	
	6 1	1 8	.	6 6	0 0		
0 .	. 7	5 .	5	. 6	. 0		
0 0	3	1 9	6	7	0		
化 合 物 2							相加の阻害化合物 2 2 (

40

【表 2 3 c - 4】

5 ( n M)							n M)
				2			
				3			
1 0	2 8	1 6	1 7	.		4 3	
. 0	. 4	. 3	. 9	2	3 4	. 9	
0	2	9	8	4	. 5	4	10
				7			
	1 3	— 0		.	2 1		
3 .	. 9	. 5	1 .	7	. 2	3 2	
3 3	4	3	3 8	2	6	. 6	
				8			
	1 4			.	2 2	3 3	
1 .	. 9	0 .	2 .	8	. 2	. 4	
1 1	8	6 9	5 8	3	1	1	20
				—			
				4			
		— 1	— 1	.	1 1	2 3	
0 .	2 .	3 .	1 .	1	. 1	. 9	
3 7	9	4 2	2 7	2	5	5	
				—			
				2			
		— 1	— 9	.	1 2	2 5	
0 .	4 .	1 .	. 0	0	. 8	. 4	
1 2	8	2	9	8	9	4	30
				—			
				7			
		— 1	— 1	.		2 1	
0 .		6 .	4 .	2	8 .	. 6	
0 0	0	8 1	5 9	3	5	8	
[ 薬 物]				5			
				5			
				5			
		6 1	1 8	.	1 6		
		. 7	5 .	5	6 6	5 0	
	0	2 8	1 9	6	. 7	0 0	
化 合 物 2							相乗作用プロッ ト ( 9 9 . 9 % )
5							ボンフ
( n							エラー 9 8
							ニ調整 %

10

20

30

40



## 実施例 2 4

I F N 2 a 及び化合物 3 のインビトロ混合物

## 試験の目的

細胞培養モデル系中の H B V 感染ヒト初代肝細胞を用いて、化合物 3 及び P E G 化インターフェロン 2 a ( I F N 2 a、肝細胞の自然免疫経路を活性化する抗ウイルス性サイトカイン) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

## 【 0 3 5 8 】

## 結果及び判定

I F N 2 a ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、1 0 . 0 I U / m L ~ 0 . 1 2 3 I U / m L の濃度範囲) を化合物 3 ( 3 倍希釈系列及び 5 点滴定における、5 0 0 0 n M ~ 6 1 . 7 3 n M の濃度範囲) と混合して試験した。I F N 2 a または化合物 3 による治療 ( 単独または混合) のいずれかにおいて測定された H B V D N A、H B s A g 及び H B e A g の平均 % 阻害、及び 3 点の複製の標準偏差については、以下に示す表 2 4 a、表 2 4 b 及び表 2 4 c に記載している。I F N 2 a 及び化合物 3 の E C <sub>50</sub> 値については前の試験で測定しており、表 2 4 d に記載している ( 異なるロットの P H H 細胞に若干の違いが認められた) 。

## 【 0 3 5 9 】

M a c S y n e r g y I I 解析に従い、また P r i c h a r d 及び S h i p m a n ( 1 9 9 2 ) による上記の判定基準を用いて、2 種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用から予想される値と比較すると、混合物が相乗的である ( 拮抗作用を有さない) ことが判明した ( 表 2 4 d ) 。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡または C C K 8 アッセイで観察されなかった。

表 2 4 a : H B V D N A に対する I F N 2 a 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

## 【 表 2 4 a - 1 】

[ 薬 物 ]	0	1 6 5 0					平均 % 阻害 化 合 物 3 ( $\mu$ M )
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0	
	0	3	1 9	5 6	7	0	
I F N $\alpha$ 2 a I U / m L	6 1						
1 0	.	7 1	8 0	7 9	8 0	8 3	
. 0	8	. 1	. 5	. 6	. 4	. 1	
0	7	5	3	5	6	3	
	5	6 5	7 4		8 4		
3 .	9	. 8	. 4	7 6	. 9	8 7	
3 3	.	7	9	. 8	1	. 1	

10

20

30

40

10

20

標準偏差 (%)

化合物

3 ( $\mu\text{M}$ )

30

40

【表 2 4 a - 3】

	1 0 . 0 . 1 2 1 5 . 0 . 0 0	3 6 1 5 . 3 3	7 . 7 7 . 3 . 1 3	6 . 2 4 . . 5	3 . 9 5 1 0 . 7 6	6 . 7 8 1 4 . 7 9 9	1 . 7 8 . 2 . 2 6
[ 薬 物]	0 . 0 0	6 1 . 3	1 8 5 . 1 9	5 5 5 . 5 6	1 6 6 6 . 7	5 0 0 0 . 0	
I F N α 2 a I U ／ m L	6 1 . 8 7 5 9 . 8 3 3 4 3 . 0 1 1 3 8 . 0 3 7 0 .	5 5 . 8 8 . 3 6 . 3 6 . 2 5	6 1 . 4 4 4 5 . 3 9 4 1 . 0 1 5	5 8 7 0 . 5 8 1 5 4 . 7 5	8 7 . 2 5 8 2 . 6 1 8 1 . 1 6	9 3 . 6 9 9 1 . 0 3 9 0 . 3 1 8 5	

相加の阻害  
化 合 物  
3 (μ M  
)

10

20

30

40

【表 2 4 a - 4】

1 2	.	. 3	. 1	. 6	. 9	. 5	
	4	3	9	5	6	8	
		— 1		2 6	6 9	8 4	
0 .		1.	4.	. 4	. 3	. 2	
0 0	0	7 1	1 4	7	9	6	
[ 薬 物]		6 1	1 8	5 5	1 6		相乗作用プロッ ト (99.9%)
	0	. 7	5.	5.	6 6	5 0	ボ ン フ
		2 8	1 9	5 6	. 7	0 0	エ ロ ー 9 8
I F							ニ調整 %
N α							
2 a							
I U							
/ m							
L							
					— 1		
1 0					. 5		3 4
. 0					2 3		相 乗 作 . 7
0	0	0	0	0	0	6	用 3
		3.	4.			— 2	
		9 7	2 6			. 3	
3 .		6 3	1 7			4 4	対 数 容 7 .
3 3	0	6	6	0	0	6	積 9 1
				1 2			
				. 6			
1 .				8 2			
1 1	0	0	0	7	0	0	
0 .							拮 抗 作 — 3
3 7	0	0	0	0	0	0	. 8
		5.	3.	4.			用 7
		3 8	9 2	5 0			
0 .		8 9	4 1	0 5			— 0
1 2	0	3	6	5	0	0	対 数 容 . 8
0 .							積 8
0 0	0	0	0	0	0	0	

表 2 4 b : H B s A g に対する I F N 2 a 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果



【表 2 4 b - 1】

[薬物 ]	0				1 6	5 0	平均%阻害
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
	0	.	7	5 .	5 .	. 6	
	0	3		1 9	5 6	7 0	

IFN α 2 a IU/ mL	2 4 . 3 3 3 3 4 9 6 7 9 . 3 . 9 3 9 . 8 . 1 4 8 3 . 7 4 8 1 2 2 4 2 9 3 4 4 5 6 4 3 . 3 . . 8 . 7 . 4 . 5 . 9 3 8 9 1 6 3 6 1 4 . 2 2 2 6 3 6 4 4 6 7 9 . 8 . 0 . 4 . 9 . 1 1 1 2 9 2 7 8 6 1 7 2 7 4 2 6 1 0 . 3 . 9 . . 8 . 6 . 0 . 4 7 9 7 5 7 2 9 2 1 . 1 0 1 9 2 2 4 2 6 2 0 . 1 5 . 1 . 0 . 1 . 0 . 0 2 6 3 7 8 8 5 — 5 — 1 5 1 0 . 0 . 4 . 4 4 . 2 2 . 8 0 0 9 6 6 3 . 4 6	化合物 3 ( μ M)
[薬物]	0 1 6 5 0 . 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 0 . 7 5 . 5 . . 6 . 0 0 3 1 9 5 6 7 0	標準偏差 (%)
IFN α 2 a IU/ mL	2 1 5 1 2 4 7 . 9 . . 0 . 8 9 . 0 0 . 7 6 9 3 2 1 5 9	化合物 3 ( μ M)

	8 6 1 8 . 3 . 3 3 2 0 . 1 . 1 1 1 5 . 0 . 3 7 1 6 . 0 . 1 2 2 0 . 0 . 0 0	8 6 1 8 . 9 8 . 7 . 2 . 3 . 5 . 6 1 4 2 2 0 1 5 2 1 2 0 . 0 4 . 6 . 3 . 5 . 4 . 1 7 4 4 1 0 5 3 8 2 6 1 5 . 2 4 . 7 . 8 . 6 . 2 . 8 3 3 5 7 4 1 6 9 1 6 . 4 3 . 5 . 7 . 7 . 6 . 7 7 5 0 7 7 8 6 5 5 9 2 0 . 2 8 . . 4 . 3 . 2 . 7 7 8 1 1 9 1 8	
[藥物]	0 . 0 0	0 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 . 7 5 . 5 . . 6 . 0 3 1 9 5 6 7 0	
I F N α 2 a I U / m L  1 0 . 0 0	2 4 . 9 4	2 0 2 3 2 8 4 1 6 3 . 8 . 8 . 4 . 7 . 8 2 4 2 5 7	相加的阻害 化合物 3 ( μ M)

40

10

20

30

40

		8	7	4	6	
		5		3		
0 . 0						
0	0	0	0	0	0	0

表 2 4 c : H B e A g に対する I F N 2 a 及び化合物 3 のインビトロ混合物の効果

【表 2 4 c - 1】

[ 薬 物 ]	0				1 6	5 0	平均%阻害 化 合 物 3 ( $\mu$ M)
	.	6 1	1 8	5 5	6 6	0 0	
	0	. 7	5 .	5 .	. 6	. 0	
	0	3	1 9	5 6	7	0	
1 0 . 0 0	3						10
	2	3 1	3 4	3 7	4 7	6 4	
	.	. 5	. 5	. 1	. 8	. 6	
	8	3	6	6	3	8	
3 . 3 3	1						20
	4						
	.	2 5	2 8		3 9	6 1	
	3	. 4	. 0	3 0	. 4	. 8	
1 . 1 1	8	3	1	. 3	2	8	30
	1						
	9						
	.	2 1	2 5	3 1	4 0	6 2	
0 . 3 7	3	. 2	. 6	. 9	. 0	. 0	40
	2	9	6	3	1	9	
	—						
	2						
0 . 1 2	.			1 8	2 8	5 3	標準偏差 (%)
	2	6 .	9 .	. 9	. 3	. 1	
	4	4 3	5 3	4	2	2	
	—						
0 . 0 0	9		1 2	1 8	3 0	5 4	
	.	6 .	. 4	. 0	. 2	. 0	
	5	2 3	6	3	7	5	
	—	1		—	1	1 2	
0 . 0 0		1 .	— 4	. 0	. 4	. 0	
	0	1 4	. 9	2	2	6	
[ 薬 物 ]	0	6 1	1 8	5 5	1 6	5 0	標準偏差 (%)

【表 2 4 c - 2】

]	. . 7 5 . 5 . 6 6 0 0 0 3 1 9 5 6 . 6 . 0 0 7 0	
I F N α 2 a I U / m L	6	化合物 3 ( μ M)
1 0 . 0 0	. 8 6 . 5 . 4 . 7 . 3 . 7 7 3 5 5 8 4 1 1 4 4	10
3 . 3 3	. 0 5 . 7 . 9 . 7 . 1 . 7 3 7 4 2 4 1 1 5 7 9 7	20
1 . 1 1	. 8 5 . 5 . 7 . 7 . 3 . 8 4 5 2 2 6 3 9 4 2 3 1 1 1	
0 . 3 7	. 2 . 4 . . 6 7 . 1 . 9 8 7 4 7 4 7 1 1 2 1 5	30
0 . 1 2	. 4 5 . 3 . 4 . 1 . 2 . 8 1 4 2 2 5 2 4 7 1 8 8	
0 . 0 0	. 1 7 6 . 6 3 . 3 . 4 . 9 8 2 1 3 7 7	
[ 薬 物 ]	0 . 6 1 1 8 5 5 6 6 0 0 0 . 7 5 . 5 . . 6 . 0 0 3 1 9 5 6 7 0	相加的阻害 化合物 3 ( μ M)
I F N α 2 a I U / m L		40

10

40



【表 2 4 c - 4】

[illegible]

10

表 2 4 d : P H H 細胞培養系中における I F N 2 a 及び化合物 3 のインビトロ混合物試験の結果の要約

【表 2 4 d】

H B V アッセイ指標	阻 害 剤 A	阻 害 剤 B	阻 害 剤 A E C 5 0 ( I U / m L ) #	阻 害 剤 B E C 5 0 ( n M ) #	相 乗 容 積 ( $\mu^2$ M % ) *	相 乗 対 数 容 積	拮 抗 容 積 ( $\mu$ M <sup>2</sup> % ) *	拮 抗 対 数 容 積	判 定
H B V D N A	I F N $\alpha$ 2 a	化 合 物 3	2 . 1 5 4	8 7 6 . 5	3 4 . 7 3	7 . 9 1	- 3 . 8 7	- 0 . 8 8	相 乗 作 用
H B s A g	I F N $\alpha$ 2 a	化 合 物 3	1 3 . 8	7 7 9 3	2 4 . 1 1	5 . 4 9	0	0	相 乗 作 用
H B e A g	I F N $\alpha$ 2 a	化 合 物 3	1 0 . 2 4	8 5 8 0	1 0 3 . 0 4	2 3 . 4 6	0	0	相 乗 作 用

\* 99.9%信頼区間

# 前の別の試験で測定

20

30

40

【 0 3 6 0 】

## 实施例 25

T A F 及び S I R N A - N P のインビトロ混合物

## 試験の目的

H B V 細胞培養モデル系を用いて、テノホビル（プロドラッグであるテノホビルアラフェナミド、すなわち T A F の形態、H B V ポリメラーゼのヌクレオチド類似体阻害剤）及び S I R N A - N P （全てのウイルス m R N A 転写物及びウイルス抗原の強力なノックダウンを促進することを目的とする s i R N A ）からなる 2 種薬物混合物が、インピトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

50

## 【0361】

HepDE19試験プロトコルにおけるインビトロ混合物

Prichard及びShipmanの方法(1990)(Prichard MN, Shipman C, Jr. 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res 14:181-205 AND Prichard MN. 1992. MacSynergy II, University of Michigan)を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。Guo et al. (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)に記載のとおり、HepDE19細胞株を分化させた。HBVゲノムを安定的にトランスフェクトされ、HBV pregenomic RNAを発現してHBV rcDNA(弛緩型開環状DNA)合成をテトラサイクリン制御様式で補助できるのは、ヒト肝細胞癌細胞株である。HepDE19細胞を、96ウェルの組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、10%ウシ胎児血清+1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補足したDMEM/F12培地(テトラサイクリン非含有)中に播種し、加湿インキュベータ内、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を新鮮な培地へと移してから、阻害剤A及び阻害剤Bを用い、それらの対応するEC<sub>50</sub>値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で7日間の間インキュベートした。阻害剤を、100%DMSO中(TAF)または増殖培地中(SIRNA-NP)のいずれかで希釈し、アッセイ中の最終DMSO濃度を0.5%とした。それぞれの濃度の阻害剤Aをそれぞれの濃度の阻害剤Bと混合させるようなチェッカー盤様式で、2種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、rcDNA産生阻害におけるそれら混合物の効果を測定した。48時間のインキュベーション後、HBV特異的カスタムプローブセット及び製造業者の取扱説明書を備えたbDNAアッセイ(Affymetrix)を用いて、阻害剤治療したウェル中に存在するrcDNAレベルを測定した。それぞれのウェルから生成したRLUデータを、未治療対照ウェルの%阻害として計算し、MacSynergy IIプログラムを用いて解析し、Prichard及びShipmanが定めた以下のような判定ガイドライン、95%CIにおける相乗容積<25μM<sup>2</sup>% (対数容積<2)=おそらく有意ではない; 25~50μM<sup>2</sup>% (対数容積>2かつ<5)=小さいが有意、50~100μM<sup>2</sup>% (対数容積>5かつ<9)=中程度、はインビボで重要となり得る; 100μM<sup>2</sup>%超(対数容積>9)=強い相乗作用、おそらくインビボで重要; 1000μM<sup>2</sup>%に近い容積(対数容積>90)=異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。同時に、製造業者の取扱説明書に従いCell-Titer Glo試薬(Promega)を用いて細胞生存能の測定値としてのATP含有量を測定するのに使用した複製プレートを用いて、細胞生存能に対する阻害剤混合物の効果を評価した。

## 【0362】

結果及び判定

TAF(2倍希釈系列及び9点滴定における、200.0nM~0.781nMの濃度範囲)をSIRNA-NP(3倍希釈系列及び5点滴定における、60ng/mL~0.741ng/mLの濃度範囲)と混合して試験した。TAFまたはSIRNA-NPによる治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表25Aに記載している。TAF及びSIRNA-NPのEC<sub>50</sub>値については、表25Bに記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用

いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用（表25A）から予想される値と比較すると、混合物が相加的である（拮抗作用を有さない）ことが判明した（表25B）。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡またはCell-Titer Gloアッセイで観察されなかった。

表25A：テノビルアラフェナミド及びSIRNA-NPのインビトロ混合物  
【表25A-1】

[薬物]	1 2 5										平均%阻害
	0	3	6	2	5	0	1	0	2	0	
SIRNA-NP (ng/mL)	7	1	1	2	5	0	0	0	0	0	
60	8	5	6	2	5	0	0	0	0	0	
20	0	1	3	5	0	0	0	0	0	0	
000											
6.6											
67											

10

20

30

【表 2 5 A - 2】

	8 7		8		8	8	9		
	0 2		1	8	7	7	1		
	.	.	7 8	.	2	.	.	9 5	9 8
2. 2	1 8	.	1 2	.	9	0	0	. 8	. 0
2 2	8 6	6	8	7	8	9	3	1	8
	5 5		6	6	7	7	8		
	3 5		2	3	8	2	2		
	.	.	5 5	.	.	.	.	9 0	9 6
0. 7	0 4	.	4 0	6	7	6	4	. 4	. 2
4 1	5 6	3	1	5	5	2	7	7	4
	—			1	2	2			
	4			0	8	0	5		
	.		0	.	.	.	3	7 7	8 9
	7	3 .	.	5	6	0	.	. 5	. 9
0	0 6	4 9	6	9	1	4	2	9	3
[薬物]	0								
	.		3						
	7		.	6	1				
	8	1 .	1	.	2				
	1	5 6	2	2	.	2	5	1 0	2 0
	0 3	2 5	5	5	5	5	0	0	0
S I R NA— NP (n g /m L )	0 0		0	0	0		0		
	.	.	.	.	.	0	.		
	6 4	0 .	5	1	2	.	0	0 .	0 .
	4 6	6 3	5	7	3	1	6	0 4	1
	1 2		1	0	0	0	0		
	.	.	.	.	.	.	.		
	0 0	1 .	4	8	3	5	1	0 .	0 .
	0 0 0	7 2	8 2	2	2	2	6	4	1 0 6
	2 3		5	1	0	1	0		
	.	.	.	.	.	.	.		
	6 . 6	3 5	4 .	9	6	9	4	8	0 . 0 .
	6 7	5 6	1 9	7	8	4	5	7	5 1 1 2
	2. 2	3 7	1 0	9	3	3	3	1	0 . 0 .
	2 2	.	.	2	.	.	.	.	5 7 4 8

10

20

標準偏差 (%)

T A F (n M  
)

30

40

【表 2 5 A - 3】

	5	9	9	6	9	2	6	4		
	4	5		2	4	7	7	9		
	1	1		1		1				
	2	6		1	9	0	1			
	.	.		.	.	.	.	3		
0. 7	8	9	1 1	6	4	0	7	.	0 .	0 .
4 1	2	7	. 3	2	2	2	7	4	5	8 3
	1			1	1					
	5			2	9	9	8	4		
	.	1 5	.	.	.	.	.	.		
	5	. 6	1	0	8	5	9	2 .	2 .	
0	0	4	3	2	7	9	8	2	7 9	1 2
	0									
	.		3							
	7		.	6	1					
	8	1 .	1	.	2					
[薬物	1	5 6	2	2	.	2	5	1 0	2 0	
] ]	0	3	2 5	5	5	5	5	0	0	0
S I R										
NA-										
NP										
(n g										
/m L										
)										
	9				9	9	9	9		
	8	9		9	8	8	8	9		
	.	8	9 8	8	.	.	.	.	9 9	9 9
	1	.	. 2	.	3	7	5	1	. 5	. 8
6 0	9	1	5	2	8	1	5	5	9	2
	9	9		9		9	9	9		
	6	6		6	9	7	7	8		
	.	.	9 6	.	6	.	.	.		9 9
2 0.	4	2	. 5	4	.	4	1	3	9 9	. 6
0 0 0	2	5	4	4	8	4	4	2	. 2	4
	8	8		8	8	9	9	9		
	8	7		8	9	1	0	4		
	.	.	8 8	.	.	.	.	.	9 7	9 8
6. 6	0	4	. 4	0	2	4	4	3	. 3	. 7
6 7	2	5	4	9	9	5	2	9	2	9
2. 2	8	7	8 0	8	8	8	8	9	9 5	
2 2	0	9	. 8	0	2	5	4	0	. 5	9 8

10

20

相加的阻害

T A F (n M  
)

30

40

【表 2 5 A - 4】

	. . 7 . . . . 6	
	1 2 . 3 2 8 1 7	
	8 4 . 8 5 5 2	
	5 5 . 5 5 6 6 7	
	3 0 . 3 8 6 2 8	
	. . 5 4 . . . . 8 9 9 5	
0. 7	0 8 . 6 3 0 4 4 0 . 4 . 2	
4 1	5 2 9 3 2 8 6 3 8 7	
	— 1 2 2	
	4 0 8 0 5	
	. 0 . . 3 7 7 8 9	
	7 3 . . 5 6 0 . . 5 . 9	
0	0 6 4 9 6 9 1 4 2 9 3	
	1 2	
	0 1 3 6 2 5	
	. . . . .	
[薬物]	7 5 1 2 5 0 5 1 0	相乗作用プロット (99.9%)
	0 8 6 3 5 0 0 0 2 0 0	ボンフ
S I R		エラー 9 6
NA-		ニ調整 %
NP		
(n g		
/m L		
)		
	0 0 0	
	. . .	
	3 5 1	
6 0 .	9 2 5	相乗作用 6 .
0	0 0 0 0 0 0 0 2 0 0	2 6
	0 0	
	. .	
	2 0	
2 0 .	1 7	対数容 0 .
0 0 0	6 0 9 0 0	積 9
	0 .	
	5 6	
6 . 6		
6 7	0 0 0 0 0 6 0 0 0 0	拮抗作用 0
2 . 2		
2 2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	

10

20

30

40

【表 2 5 A - 5】

							4				
							.				
							3				
0.7							3			対数容	
41	0	0	0	0	0	0	4	0	0	積	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

10

表 2 5 B : bDNA アッセイを用いた rcDNA 定量を伴う DE 19 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約 :

【表 2 5 B】

阻害剤 A	阻害剤 B	阻害剤 A E C <sub>50</sub> (ng /mL )	阻害剤 B E C <sub>50</sub> (nM )	相乗容 積 (μ M <sup>2</sup> %) *	相乗 対数 容積	拮抗容積 (μ M <sup>2</sup> %) *	拮抗対数 容積	判定
SIR		0.6	44.	6.2	0.			
NA-TAF		24	52	6	9	0	0	相加的
NP								

20

\* 99.9%信頼区間

## 【0363】

## 実施例 26

## 化合物 3 及び GLS 4 のインビトロ混合物

## 試験の目的

HBV 細胞培養モデル系を用いて、化合物 3 (スルファモイルベンズアミド化学クラスに属する HBV 封入低分子阻害剤) 及び GLS 4 (ヘテロアリールジヒドロピリミジン、すなわち HAP の化学クラスに属する HBV 封入低分子阻害剤) からなる 2 種薬物混合物が、インビトロで相加的、相乗的または拮抗的であるかどうかを明らかにすることである。

30

## 【0364】

## Hep DE 19 試験プロトコルにおけるインビトロ混合物

Prichard 及び Shipman の方法 (1990) を用いて、インビトロ混合物試験を実施した。Guo et al. (2007) に記載のとおり、Hep DE 19 細胞株を分化させた。HBV ゲノムを安定的にトランスフェクトされ、HBV pregenomic RNA を発現して HBV rcDNA (弛緩型開環状 DNA) 合成をテトラサイクリン制御様式で補助できるのは、ヒト肝細胞癌細胞株である。Hep DE 19 細胞を、96 ウェルの組織培養処理済みマイクロタイタープレートを用いて、10% ウシ胎児血清 + 1% ペニシリン - ストレプトマイシンを補足した DMEM / F12 培地 (テトラサイクリン非含有) 中に播種し、加湿インキュベータ内、37、5% CO<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートした。翌日、細胞を新鮮な培地へと移してから、阻害剤 A 及び阻害剤 B を用い、それらの対応する EC<sub>50</sub> 値付近の濃度範囲で治療し、加湿インキュベータ内、37、5% CO<sub>2</sub> 下で 7 日間の間インキュベートした。両方の阻害剤を 100% DMSO 中で希釈し、アッセイ中の最終 DMSO 濃度を 0.5% とした。それぞれの濃度の阻害剤 A をそれぞれの濃度の阻害剤 B と混合させるようなチェッカー盤様式で、2 種類の阻害剤について、単独に加えて混合物の両方で試験し、rcDNA 産生阻害におけるそれら混合物

40

50

の効果を測定した。48時間のインキュベーション後、HBV特異的カスタムプローブセット及び製造業者の取扱説明書を備えたbDNAアッセイ(Affymetrix)を用いて、阻害剤治療したウェル中に存在するrcDNAレベルを測定した。それぞれのウェルから生成したRLUデータを、未治療対照ウェルの%阻害として計算し、MacSynergy IIプログラムを用いて解析し、Prichard及びShipmanが定めた以下のような判定ガイドライン、95%CIにおける相乗容積 $< 25 \mu M^2$ % (対数容積 $< 2$ ) = おそらく有意ではない;  $25 \sim 50 \mu M^2$ % (対数容積 $> 2$ かつ $< 5$ ) = 小さいが有意、 $50 \sim 100 \mu M^2$ % (対数容積 $> 5$ かつ $< 9$ ) = 中程度、はインビボで重要となり得る;  $100 \mu M^2$ %超 (対数容積 $> 9$ ) = 強い相乗作用、おそらくインビボで重要;  $1000 \mu M^2$ %に近い容積 (対数容積 $> 90$ ) = 異常に高くデータチェックを要する、を用いて、混合物が相乗的であるか、相加的であるかまたは拮抗的であるかを明らかにした。同時に、製造業者の取扱説明書に従いCell-Titer Glo試薬(Promega)を用いて細胞生存能の測定値としてのATP含有量を測定するのに使用した複製プレートを用いて、細胞生存能に対する阻害剤混合物の効果を評価した。

### 【0365】

#### 結果及び判定

化合物3 (3倍希釈系列及び5点滴定における、 $3.0 \mu M \sim 0.04 \mu M$ の濃度範囲)をGLS4 (2倍希釈系列及び9点滴定における、 $2.0 \mu M \sim 0.008 \mu M$ の濃度範囲)と混合して試験した。化合物3またはGLS4による治療(単独または混合)のいずれかにおいて測定されたrcDNAの平均%阻害及び4点の複製の標準偏差については、表26aに記載している。化合物3及びGLS4のEC<sub>50</sub>値については、表26bに記載している。MacSynergy II解析に従い、またPrichard及びShipman(1992)による上記の判定基準を用いて、2種阻害剤混合物の測定値を、上記濃度範囲における相加的相互作用(表26a)から予想される値と比較すると、混合物が、ほぼ相加的で極めてわずかに拮抗的であることが判明した(表26b)(拮抗作用の度合いは小さいが有意)。細胞生存能または細胞増殖に対する有意な阻害は、解析試料の顕微鏡またはCell-Titer Gloアッセイで観察されなかった。

表26a: 化合物3及びGLS4のインビトロ混合物

【表26a-1】

[薬物]	0 0 0 1 2										平均%阻害 GLS-4 ( $\mu M$ )
	0	0	0	0	0	1	2	5	0	0	
化合物3 $\mu M$	9					9	9	9		9	
3.4			93	93	93	3	1	6		8	
00		94		7	6	7			9		
0	4	6	5	9	4	4	7	8	7	0	

10

20

30

40



[illegible]

20

30

40

【表 2 6 a - 3】

1 1	5	.	7	.	2	2 4	.	0	.	.	.	.	.	.
0	.	6		3			5	6	6	8	7	3		
	9								1	3	2	1		
	5													
	2													
	2						5	1	0	0	0			
0 .	.	2	6			3 1	1 6	.	.	.	.	.	.	.
0 4	9	.	9	6 .	.	5	. 0	5	8	6	7	3		
0	2	1		3 6	9		9	4	2	8	2	1		
								6	1	1	0	0		
		1	7	1 5	1 5	1 0	.	.	.	.	.	.		
		.	1	. 4	. 3	. 9	6	3	4	5	3			
0	0	7	2	4	5	5	5	9	7	9	5			
[薬物]							0							
		0 .	0 .	0 .			.	0						
		0 0	0 1	0 3	0 .	1	.	0						
		7 8	5 6	1 2	0 6	2	2	.						
化合物 3	0	1 3	3	5	2 5	5	5	5	5	1	2			
μ M														
	9						9	9	9	9				
	4						8	9	9	9	9			
	.	9 4	9 4	9 4	9 6	.	.	.	.	.	9			
	4	. 4	. 1	. 8	. 6	7	7	8	9	.				
3	9	3	7	8	4	8	1	6	2	9				
	8						9		9		9			
	6						7	9	9	9	9			
1 .	.	8 6	8 6	8 7	9 1	.	9	.	9	.				
0 0	8	. 7	. 1	. 7	. 9	0	.	6	.	7				
0	7	2	1	9	8	9	3	7	8	7				
	5						9	9	9	9	9			
	6						0	7	8	9	9			
0 .	.	5 6	5 4	5 9	7 3	.	.	.	.	.				
3 3	6	. 1	. 1	. 7	. 5	3	6	9	3	2				
0	8	7	6	3	5	9	8	1	5	3				
	1						8	9	9	9	9			
	9						2	5	7	8	8			
0 .	.	1 9	1 5	2 5	5 1	.	.	.	.	.				
1 1	9	. 0	. 3	. 6	. 1	2	7	9	8	5				
0	9	5	3	1	5	5	2	8	1	8				
	1						8	9	9	9	9			
	1						0	5	7	8	8			
0 .	.			1 7	4 5	.	.	.	.	.				
0 4	1	1 0	5 .	. 3	. 7	2	2	7	6	4				
0	4	. 1	9 7	9	5	9	5	6	8	2				
0	0	— 1	— 5	7 .	3 8	7	9	9	9	9				

10

20

30

40

相加の阻害  
G L S - 4  
(μ M)

[illegible]

【表 2 6 a - 5】

化合物 3 $\mu\text{M}$											ポンプ エラー ニ調整 96%	
3.0	0	0	0	0.3	0.6	0.2	0.8	1.4	0	0	相乗作用	0
1.00	0	0	0	0	0	0.3	0.7	0.8	0	0		
0.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	-1.5 .72
0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	対数容積	-2. 17
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

10

20

表 2 6 b : bDNA アッセイを用いた rDNA 定量を伴う DE19 細胞培養系によるインビトロ混合物試験の結果の要約 :

30

【表 2 6 b】

阻害剤 A	阻害剤 B	阻害剤 A E C <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	阻害剤 B E C <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	相乗容 積 ( $\mu\text{M}^2\%$ ) *	相乗 対容積	拮抗容 積 ( $\mu\text{M}^2\%$ ) *	拮抗対 数容積	判定
化合物 3	G L S 4	0.2 72	0.0 77	0	0	-1.5 .72	-2. 17	相加的*
化合物 3	G L S 4	0.2 72	0.0 77	0	0	-2.9 .95	-4. 13	小さな 拮抗作用#

40

\* 99.9%信頼区間

# 95%信頼区間

【0366】

全ての刊行物、特許及び特許文献は、あたかも個別に参照として組み込まれるように、参照により本明細書に組み込まれる。様々な特定及び好ましい実施形態及び手法を参照し

50

ながら、本発明について記載してきた。しかしながら、本発明の趣旨及び範囲を維持しつつ、多数の変更及び改良を行うことができるということを理解すべきである。

【配列表】

2019501202000001.app

## 【国際調査報告】

PCT/US2017/012614 14.07.2017

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/12614

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC - A61K 39/12, 39/29; C07K 14/01, 14/02; C12N 15/51 (2017.01) CPC - A61K 39/12, 39/292; C07K 14/01, 14/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/172128 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al.) 12 November 2015; paragraphs [0009], [0029]-[0030], [0032]-[0033], [0078], [0085]; claims 1-3, 7	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 16, 18, 21/18, 22/21/18, 33, 35, 38/35, 39/38/35, 53
Y	(STRAY, SJ et al.) BAY 41-4109 has Multiple Effects on Hepatitis B Virus Capsid Assembly. Journal of Molecular Recognition. 27 September 2006; Vol. 19, No.6; pages 542-548; abstract; page 544, column 2, paragraph 3	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 16, 18, 21/18, 22/21/18, 33, 35, 38/35, 39/38/35, 53
Y	US 2011/0218512 A1 (TULLIS, RH et al.) 08 September 2011; abstract; paragraph [0016]	18, 21/18, 22/21/28, 33
A	US 6,809,083 B1 (MUELLER, RA et al.) 26 October 2004; whole document	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 16, 35, 38/35, 39/38/35, 53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 May 2017 (18.05.2017)		Date of mailing of the international search report <b>14 JUL 2017</b>
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

PCT/US2017/012614 14.07.2017

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/12614

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter. I(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter. I(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. I(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

PCT/US2017/012614 14.07.2017

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/12614

**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-15, 23-32, 40-52, 55  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

\*\*Please See Supplemental Page-\*\*\*

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Groups I+, claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 16 (in-part), 18 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 33 (in-part), 35 (in-part), 38 (in-part), 39 (in-part) and 53 (in-part)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



PCT/US2017/012614 14.07.2017

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/12614

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-5, 16-22, 33-39, 53, 54; a capsid inhibitor and a sAg secretion inhibitor are directed toward a method for treating hepatitis B in an animal, comprising administering to the animal at least two agents selected from the group consisting of: a) reverse transcriptase inhibitors; b) capsid inhibitors; c) cccDNA formation inhibitors; d) sAg secretion inhibitors; e) oligomeric nucleotides targeted to the Hepatitis B genome; and f) immunostimulators; and a composition and kit therefor.

The method, composition and kit will be searched to the extent they encompass a capsid inhibitor (first exemplary agent), and a surface antigen (sAg) secretion inhibitor (second exemplary agent). Applicant is invited to elect additional agent(s), or classes thereof, to be searched. Additional agent(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 16 (in-part), 18 (in-part), 21 (in-part), 22 (in-part), 33 (in-part), 35 (in-part), 38 (in-part), 39 (in-part) and 53 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a capsid inhibitor (agent), and a surface antigen (sAg) secretion inhibitor (agent). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected agent(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an agent encompassing a reverse transcriptase inhibitor (first exemplary elected agent).

No technical features are shared between the agents of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori. Groups I+ share the technical features including: a method for treating hepatitis B in an animal comprising administering to the animal at least two agents selected from the group consisting of: a) capsid inhibitors; b) sAg secretion inhibitors; c) reverse transcriptase inhibitors; d) cccDNA formation inhibitors; e) oligomeric nucleotides targeted to the Hepatitis B genome; and f) immunostimulators; a pharmaceutical composition that comprises a pharmaceutically acceptable carrier and at least said two agents; and a kit comprising at least said two agents.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 6,809,083 B1 to Mueller et al. (hereinafter 'Mueller').

Mueller discloses a method for treating hepatitis B in an animal (a method for treating hepatitis B in a mammal (an animal); abstract, column 3, lines 18-21) comprising administering to the animal at least two agents (comprising administering to the mammal (animal) at least two agents; abstract, column 3, lines 18-21, column 4, lines 28-39) including reverse transcriptase inhibitors (a nucleoside or nucleotide antiviral compound (reverse transcriptase inhibitor); column 2, lines 39-55; column 4, lines 28-39) and immunostimulators (and immunostimulators; column 4, line 36); a pharmaceutical composition that comprises a pharmaceutically acceptable carrier and at least said two agents (a pharmaceutical composition that comprises a pharmaceutically acceptable carrier and at least said two agents; column 4, lines 28-39, column 5, lines 23-30); and a kit comprising at least said two agents.

Mueller does not disclose: a kit comprising at least said two agents. However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Mueller to have provided the at least two agents, as disclosed by Mueller, or a composition comprising said agents, as disclosed by Mueller, in a kit with instructions for use to perform a method of treatment of an animal for HBV, as disclosed by Mueller, in order to more readily and easily enable a medical practitioner to determine appropriate doses of the agents, and to administer the agents to said animal.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Mueller reference, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/4453 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 31/4453	
A 6 1 K 31/18 (2006.01)	A 6 1 K 31/551	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/18	
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/662 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
A 6 1 K 31/522 (2006.01)	A 6 1 K 31/662	
A 6 1 K 31/7072 (2006.01)	A 6 1 K 31/522	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/7072	
A 6 1 K 31/4409 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/4409	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 9/99	Z N A
	C 1 2 N 15/113	1 0 0 Z

(31)優先権主張番号 62/409,180

(32)優先日 平成28年10月17日(2016.10.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/420,969

(32)優先日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM), EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(72)発明者 クコナティ, アンドレア

カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 ブリティッシュ コロンビア, バーナビー, グレンライオン パークウェイ 8900-100

(72)発明者 リー, エイミー シー.エイチ.

カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 ブリティッシュ コロンビア, バーナビー, グレンライオン パークウェイ 8900-100

(72)発明者 レインブランド, コルネリス エー.

カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 ブリティッシュ コロンビア, バーナビー, グレンライオン パークウェイ 8900-100

(72)発明者 ソフィア, マイケル ジェイ.

カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 ブリティッシュ コロンビア, バーナビー, グレンライオン パークウェイ 8900-100

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA13 AA20 AA24 DA12 MA16 MA52 MA66 NA05

	ZB092	ZB331	ZB332	ZC202	ZC751					
4C086	AA01	AA02	BC17	BC21	BC31	BC42	BC84	CB07	CB08	DA38
	EA16	EA17	GA05	GA07	GA08	GA16	MA02	MA03	MA04	MA16
	MA52	MA66	NA05	ZB33	ZC02	ZC20	ZC75			
4C206	AA01	AA02	JA11	MA02	MA03	MA04	MA36	MA72	MA86	NA05
	ZB33	ZC75								