(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114502194 A
(43)申请公布日 2022.05.13

(21)申请号 202080069643.5
(22)申请日 2020.09.30
(30)优先权数据
62/909,321 2019.10.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/053606 2020.09.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/067480 EN 2021.04.08
(71)申请人 华盛顿大学
地址 美国华盛顿
(72)发明人 M·J·小加勒 S·李
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 李程达
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
A61K 39/29(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

权利要求书4页 说明书36页
序列表29页 附图75页

(54)发明名称

用于治疗乙型肝炎病毒感染的组合物和方法

(57)摘要

本公开内容提供了用于抑制被感染的细胞中的乙型肝炎病毒(HBV)的组合物和方法。示例性方法包括使被感染的细胞与一种或多种在被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化的试剂接触。在一些实施方案中,一种或多种试剂包括含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子、小分子试剂(例如苯并噻唑衍生物分子)或其组合。在一些实施方案中,所述方法还包括使被感染的细胞与NRTI接触。所述方法可以是治疗患有HBV感染的受试者的体内方法,其包括施用治疗相关量的配制在一种或多种治疗效果组合物中的一种或多种试剂。示例性组合物被配制用于治疗受试者中的乙型肝炎病毒(HBV)感染,其包含:RIG-I激动剂、用于细胞内递送的媒介物和药学上可接受的承载体。

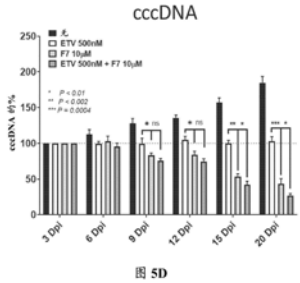


图 5D

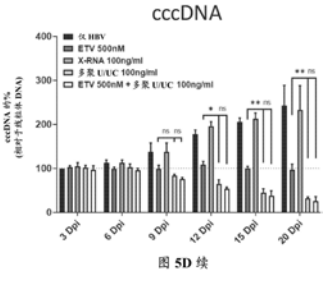


图 5D 续

CN 114502194 A

1.一种抑制被感染的细胞中乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)水平的方法,所述方法包括使被感染的细胞与在被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化的试剂接触。

2.权利要求1所述的方法,其中抑制cccDNA包括抑制被感染的细胞中的cccDNA形成。

3.权利要求1所述的方法,其中抑制cccDNA包括降低被感染的细胞中现有cccDNA的稳定性。

4.权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述试剂通过诱导视黄酸诱导基因I(RIG-I)样受体(RLR)信号传导途径来诱导IRF3活化。

5.权利要求4所述的方法,其中所述RLR信号传导途径包括RIG-I、黑素瘤分化相关基因5(MDA5)、遗传学和生理学实验室2(LGP2)和/或线粒体抗病毒信号传导(MAVS)蛋白。

6.权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述试剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包含:

包含末端三磷酸的5’臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3’臂区,其中3’臂区的5’最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3’臂区是至少30%的尿嘧啶残基。

7.权利要求6所述的方法,其中所述聚尿嘧啶核心由8至30个尿嘧啶残基组成。

8.权利要求6所述的方法,其中所述3’臂区的5’最末端的核酸残基是胞嘧啶残基或鸟嘌呤残基。

9.权利要求6所述的方法,其中所述3’臂区是至少90%的尿嘧啶残基。

10.权利要求6所述的方法,其中所述3’臂区包含至少7个连续的尿嘧啶残基。

11.权利要求6所述的方法,其中所述5’臂区还包含一个或多个位于末端三磷酸和聚尿嘧啶核心之间的核酸残基。

12.权利要求6所述的方法,其中所述5’臂区由末端三磷酸组成,并且其中所述末端三磷酸直接连接到所述聚尿嘧啶核心的5’末端。

13.权利要求6所述的方法,其中所述核酸分子包含至少16个核苷酸的序列。

14.权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述试剂是小分子试剂。

15.权利要求14所述的方法,其中所述小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子。

16.权利要求15所述的方法,其中所述小分子试剂包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。

17.权利要求1所述的方法,包括使所述被感染的细胞与两种或更多种在所述被感染的细胞中诱导IRF3活化的试剂接触。

18.权利要求17所述的方法,其中所述两种或更多种试剂包括:

核酸分子,其包含:

包含末端三磷酸的5’臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3’臂区,其中3’臂区的5’最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3’臂区是至少30%的尿嘧啶残基;和

小分子试剂,其是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,

3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。

19.权利要求1所述的方法,还包括使所述细胞与核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)接触。

20.权利要求19所述的方法,其中所述NRTI选自拉米夫定(Lamivudine)、阿德福韦酯(Adefovir dipivoxil)、恩替卡韦(Entecavir)、替比夫定(Telbivudine)、替诺福韦(Tenofovir)、替诺福韦艾拉酚胺(Tenofovir alafenamide,TAF)、克来夫定(Clevudine)、Besivo、日达仙(Zadaxin)、瑞德西韦(Remdesivir)等。

21.权利要求1所述的方法,其中所述试剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包含:

包含末端三磷酸的5'臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基;

其中所述方法进一步包括使细胞与选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等的NRTI接触。

22.前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述被感染的细胞是肝细胞。

23.一种在有需要的受试者中治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物在受试者的被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化。

24.权利要求23所述的方法,其中所述组合物是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包含:

包含末端三磷酸的5'臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。

25.权利要求24所述的方法,其中所述聚尿嘧啶核心由8至30个尿嘧啶残基组成。

26.权利要求24所述的方法,其中所述3'臂区的所述5'最末端的核酸残基是胞嘧啶残基或鸟嘌呤残基。

27.权利要求24所述的方法,其中所述3'臂区是至少90%的尿嘧啶残基。

28.权利要求24所述的方法,其中所述3'臂区包含至少7个连续的尿嘧啶残基。

29.权利要求24所述的方法,其中所述5'臂区还包含一个或多个位于末端三磷酸和聚尿嘧啶核心之间的核酸残基。

30.权利要求24所述的方法,其中所述5'臂区由末端三磷酸组成,并且其中所述末端三磷酸直接连接到所述聚尿嘧啶核心的5'末端。

31.权利要求24所述的方法,其中所述核酸分子包含至少16个核苷酸的序列。

32.权利要求23所述的方法,其中所述组合物是或包含诱导RIG-I信号传导的小分子试剂。

33.权利要求32所述的方法,其中所述试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子。

34.权利要求33所述的方法,其中所述小分子试剂包含化学式(N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺)。

35.权利要求23所述的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的第一试剂和第二试剂,

其中所述第一试剂是或包含核酸分子,所述核酸分子包含:

包含末端三磷酸的5'臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基;

其中所述第二试剂是或包含含有化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺的小分子试剂。

36.权利要求23-35中任一项所述的方法,还包括向所述受试者施用治疗有效量的核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)。

37.权利要求36所述的方法,其中所述NRTI选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。

38.权利要求23所述的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的第一试剂和第二试剂,

其中所述第一试剂是或包含核酸分子,所述核酸分子包含:

包含末端三磷酸的5'臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基;和

其中所述第二试剂是或包含NRTI。

39.权利要求38所述的方法,其中所述NRTI选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。

40.一种用于治疗受试者中的乙型肝炎病毒(HBV)感染的组合物,其包含:

RIG-I激动剂,

用于细胞内递送的媒介物,以及

药学上可接受的承载体。

41.权利要求40所述的组合物,其中所述RIG-I激动剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包含:

包含末端三磷酸的5'臂区;

包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。

42.权利要求41所述的组合物,其中所述聚尿嘧啶核心由8至30个尿嘧啶残基组成。

43.权利要求41所述的组合物,其中所述3'臂区的5'最末端的核酸残基是胞嘧啶残基或鸟嘌呤残基。

44.权利要求41所述的组合物,其中所述3'臂区是至少90%的尿嘧啶残基。

45.权利要求41所述的组合物,其中所述3'臂区包含至少7个连续的尿嘧啶残基。

46.权利要求41所述的组合物,其中所述5'臂区还包含一个或多个位于末端三磷酸和

聚尿嘧啶核心之间的核酸残基。

47.权利要求41所述的组合物,其中所述5'臂区由末端三磷酸组成,并且其中所述末端三磷酸直接连接到所述聚尿嘧啶核心的5'末端。

48.权利要求41所述的组合物,其中所述核酸分子包含至少16个核苷酸的序列。

49.权利要求40所述的组合物,所述RIG-I激动剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。

50.权利要求40-49中任一项所述的组合物,还包含核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)。

51.权利要求50所述的组合物,其中所述NRTI选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。

52.权利要求40-51中任一项所述的组合物,其中将所述RIG-I激动剂掺入所述媒介物中。

53.权利要求40-51中任一项所述的组合物,其中所述媒介物是脂质体、纳米胶囊、纳米颗粒、外泌体、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等,其被配置用于将RIG-I激动剂引入感染HBV的靶宿主细胞中。

54.一种治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求40-53中任一项所述的组合物。

用于治疗乙型肝炎病毒感染的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年10月2日提交的美国临时申请号62/909,321的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并在此通过引用并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是72750_Sequence_Listing_final_2020-09-28.txt。文本文件为31KB;于2020年9月28日创建;并正在通过EFS-Web与说明书的提交一起递交。

[0005] 政府许可权利声明

[0006] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的基金号R01 AI118916和R01 AI127463下在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0007] 乙型肝炎病毒(HBV)是一个全球公共卫生问题,全球有超过2.5亿人慢性感染。慢性HBV感染是肝病包括肝硬化、肝细胞癌(HCC)和肝功能衰竭的主要原因,因此每年HBV感染导致超过700,000人死亡[WHO,2017]。

[0008] HBV是一种小型的嗜肝DNA病毒,其部分通过逆转录进行复制。HBV通过牛磺胆酸钠协同转运多肽(NTCP)受体特异性地进入肝细胞以复制并产生病毒粒子。进入肝细胞胞质溶胶后,病毒核衣壳易位至细胞核,以分解和释放病毒松弛环状(RC)DNA。在细胞核中,RC DNA转化为共价闭合环状DNA(cccDNA),这是一种长寿命病毒微型染色体,用作合成所有HBV RNA转录物(包括前基因组(pg)RNA、pre-S、S和X病毒RNA)的主要模板。合成后,成熟的含有核衣壳的RC DNA通过在内质网(ER)出芽获得包膜,然后产生子代病毒粒子。成熟的HBV核衣壳库的一部分用于促进在称为细胞内扩增途径的过程中的进一步cccDNA合成。该过程有助于将cccDNA库维持为每个细胞3-50个分子的稳态群,标志慢性感染。通过从被感染的细胞中根除cccDNA或消耗被感染的细胞来从肝脏中去除cccDNA被认为是HBV治愈的必要条件。

[0009] 目前对慢性HBV的治疗依赖于两类治疗,包括(i)核苷酸类似物(NA),其抑制病毒逆转录酶和DNA聚合酶功能,以及(ii)聚乙二醇化干扰素α(peg-IFNα)疗法,其诱导固有免疫防御以抑制HBV抗原产生。尽管这些疗法可以抑制活跃的病毒复制,降低cccDNA水平,并可以减缓疾病进展,但它们并不能消除cccDNA的细胞核库,并且与被治疗的患者中的显著副作用有关。cccDNA的持续存在在体内的建立时间为6-22周,其中大多数患者需要终生接受抗病毒治疗以持续抑制病毒复制。有问题的是,慢性HBV的基于IFN的治疗耐受性差,并且只有低频率的被治疗的患者显示定义临床HBV治愈的HbsAg的完全丧失。

[0010] 因此,尽管抑制性HPV疗法得到了发展,但仍然需要能够特异性根除cccDNA的有效疗法和治疗策略,从而导致更完整和功能性的治愈并避免延长的抑制疗法的有害影响。本公开内容解决了这些和相关的需要。

发明内容

[0011] 提供此概述以以简化的形式介绍概念的选择,这些概念将在下面的发明详述中进一步描述。本概述不旨在鉴别所要求保护的主题的关键特征,也不旨在用作确定所要求保护的主题的范围的帮助。

[0012] 在一个方面,本公开内容提供了一种抑制被感染的细胞中乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)水平的方法。所述方法包括使被感染的细胞与在被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化的试剂接触。"抑制cccDNA"可以包括抑制被感染的细胞中的cccDNA形成或降低被感染的细胞中现有cccDNA的稳定性。

[0013] 在一些实施方案中,该试剂通过诱导视黄酸诱导基因I(RIG-I)样受体(RLR)信号传导途径来诱导IRF3活化。在一些实施方案中,试剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中PAMP包含:包含末端三磷酸的5'臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;以及包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。在一些实施方案中,试剂是小分子试剂。在一些实施方案中,小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺的小分子试剂。在一些实施方案中,所述方法包括使细胞与包含病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子和小分子试剂(例如苯并噻唑衍生物分子,例如N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺)的组合接触。

[0014] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括使细胞与核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)接触。在一些实施方案中,NRTI选自拉米夫定(Lamivudine)、阿德福韦酯(Adefovir dipivoxil)、恩替卡韦(Entecavir)、替比夫定(Telbivudine)、替诺福韦(Tenofovir)、替诺福韦艾拉酚胺(Tenofovir alafenamide,TAF)、克来夫定(Clevudine)、Besivo、日达仙(Zadaxin)、瑞德西韦(Remdesivir)等。

[0015] 在一些实施方案中,细胞是肝细胞。

[0016] 在另一个方面,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物在受试者的被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化。

[0017] 在一些实施方案中,所述组合物包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包含:包含末端三磷酸的5'臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;以及包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。在一些实施方案中,所述试剂是诱导RIG-I信号传导的小分子试剂。在一些实施方案中,小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如小分子试剂包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者组合或协调施用治疗有效量的包含病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子和小分子试剂。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向受试者施用核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)。在一些实施方案中,NRTI选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。NRTI可以与一种或多种在受试者的被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化的试剂组合或协调施用。

[0019] 在另一个方面,本公开内容提供了用于治疗受试者的乙型肝炎病毒(HBV)感染的

组合物,其包含:RIG-I激动剂、用于细胞内递送的媒介物和药学上可接受的承载体。

[0020] 在一些实施方案中,RIG-I激动剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中PAMP包含:包含末端三磷酸的5'臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;以及包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。在一些实施方案中,RIG-I激动剂是或包含小分子试剂。在一些实施方案中,小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺的小分子试剂。在一些实施方案中,组合物包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子和小分子试剂(例如,苯并噻唑衍生物分子,例如,包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺)。在一些实施方案中,所述组合物还包含核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)。在一些实施方案中,NRTI选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。在一些实施方案中,媒介物是脂质体、纳米胶囊、纳米颗粒、外泌体、微粒、微球、脂质颗粒、囊泡等,其被配置用于将RIG-I激动剂引入感染HBV的靶宿主细胞中。

[0021] 在另一个方面,本公开内容提供治疗患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的组合物。

附图说明

[0022] 本发明的前述方面和许多伴随的优点将变得更容易理解,因为它们通过参考以下详细描述并结合附图时得到更好的理解,其中:

[0023] 图1A-1D说明了F7小分子和多聚U/UC PAMP差异诱导固有免疫基因。(1A)F7的结构和代表性多聚U/UC PAMP-RNA的序列(SEQ ID NO:1)。(1B)IRF3易位的免疫荧光分析。HepG2-hNTCP细胞在含有2.5%DMSO的培养基中培养,用仙台病毒(SenV;10HAU/ml)感染,或用F7(10μM)、X-RNA(脂质体中200ng/ml)或多聚U/UC PAMP(脂质体中200ng/ml)处理24小时。用3%多聚甲醛固定细胞,使用小鼠抗hNTCP(绿色)、兔抗IRF3(红色)抗体染色并用DAPI(蓝色)复染。比例尺代表20μm。(1C)F7和多聚U/UC诱导IRF3活化和固有免疫基因表达。如所示,将仙台病毒、F7、X-RNA和多聚U/UC PAMP施用于HepG2-hNTCP和dHepaRG持续24和48小时。通过SDS-PAGE解析细胞裂解物,然后进行免疫印迹。使用相应的抗体测定p-IRF3(IRF3的S386磷酸化活性形式)、IRF3(总IRF3)和IFIT1相对于微管蛋白表达水平的蛋白质表达水平。(1D)基因表达分析。如上所述,用SenV、F7、X-RNA和多聚U/UC-RNA施用HepG2-hNTCP细胞持续24和72小时,然后从收获的细胞中纯化总细胞RNA。通过qRT-PCR测量固有免疫基因IFIT1、CXCL10、IFITM1、RSAD2、RIG-I、MDA5、SAMHD1、APOBEC3A、APOBEC3G、IFN-α、IFN-β和IFN-λ3的表达水平,并标准化至GAPDH表达水平。每个都显示为来自三个独立实验的相对于用2.5%DMSO处理所获得的结果的平均诱导倍数。

[0024] 图2A-2E说明了cccDNA形成的治疗性抑制。(2A)感染和处理(上图)的方案和Southern印迹分析(下图)以测量包括cccDNA在内的无蛋白质DNA。该方案说明了使用HBV接种(1000Geq/细胞)和环孢菌素A(CsA)、F7、X-RNA和多聚U/UC PAMP的施用的时间表。在感染后1天(Dpi)将2.5%DMSO添加到培养基中。使用Hirt提取方法从HepG2-hNTCP细胞中收获cccDNA和PF-RC DNA,并使用HBV特异性DNA探针通过Southern印迹分析进行分析。标注无病

毒蛋白DNA(无蛋白松弛环状DNA[PF-RC DNA]和cccDNA)。(2B和2C)HepG2-hNTCP 2(B)或分化的HepaRG细胞(2C)以1000Geq/细胞的moi用HBV感染,并施用指定浓度的CsA(10μM)或F7。对于(2B)和(2C)的上图,在3dpi的Hirt提取后分离DNA,并使用HBV-DNA探针进行Southern印迹分析。对于(2B)和(2C)的下图,使用RT-qPCR分析分别在HepG2-hNTCP和dHepaRG细胞中测量F7对cccDNA形成的抑制作用。(2D和2E)HepG2-hNTCP(2D)或dHepaRG细胞(2E)以1000Geq/细胞的moi用HBV感染,并施用CsA(10μM)、X-RNA(100ng/ml)或指定浓度的多聚U/UC PAMP。对于(2D)和(2E)的上图,使用Southern印迹分析来分析DNA。对于(2D)和(2E)的下图,通过RT-qPCR分析DNA。基于相对于DMSO处理的对照的cccDNA的下降来计算IC_{90}和IC_{50}值。IC_{90}和IC_{50}值是三个实验的平均值±一个标准偏差。通过使用CellTiter-Glo™试剂测量细胞ATP含量作为细胞活力的量度来确定细胞毒性。所示的CC_{50}值是三个实验的平均值±一个标准偏差。质量标记的位置显示在每个Southern印迹上。

[0025] 图3A-3F说明了F7和多聚U/UC PAMP抑制从头HBV cccDNA合成。(3A)上图:感染和多聚U/UC PAMP处理时间表。细胞用100ng/ml多聚U/UC PAMP在HBV感染前(Pre)处理24小时、在HBV感染后(Post)处理48小时或处理72小时(pre/post)。在3dpi时收获细胞并制备Hirt提取物(3B)HepG2-hNTCP细胞和(3C)dHepaRG细胞通过Southern印迹(上图)和RT-qPCR(下图)进行分析。对于RT-qPCR分析,来自DMSO处理的对照的值分别设置为100%,数据显示为对照样品中cccDNA的平均值±标准偏差(SD)百分比。***P<0.005,以及ns=不显著。(3D)HBV感染和F7处理时间表。细胞用F7(10μM)在感染前(Pre)处理24小时、感染期间(Co)处理24小时、在感染后(Post)处理48小时或处理96小时(pre/co/post)。在3Dpi时收获细胞并制备Hirt提取物HepG2-hNTCP(3E)和dHepaRG细胞(3F)。上图显示Southern印迹分析。下图显示RT-qPCR分析和与对照DMS处理的细胞相比,处理细胞中剩余的cccDNA的百分比。来自DMSO处理的对照培养物的值设置为100%。数据表示为平均值±标准偏差(SD),*P<0.01,**P<0.005,***P<0.001,****P<0.0001以及ns=不显著。CsA作为处理对照。对于Southern印迹,指示了质量标记的位置。

[0026] 图4A-4D说明了抗病毒活性的亚细胞区室分析。(4A)和(4C):F7处理(4A)或多聚U/UC PAMP处理(4C)的HBV感染方案。HepG2-hNTCP培养物以moi 1000Geq/细胞接种HBV持续24小时。在处理第0天,培养物接受F7(10μM)或多聚U/UC PAMP(100ng/ml)。在三天内显示的每个时间点收获细胞用于产生Hirt提取物。收集平行培养物用于蛋白质印迹分析,以分别监测核纤层蛋白B1和钙联蛋白作为全细胞裂解物和胞质溶胶的标志物。(4B)和(4D)使用HBV特异性DNA探针通过Southern印迹分析DNA。显示了无病毒蛋白DNA(无蛋白松弛环状DNA[PF-RC DNA]和cccDNA)。指示了质量标记的位置。下图显示了核纤层蛋白B1和钙联蛋白丰度的蛋白质印迹。

[0027] 图5A-5F说明了F7和多聚U/UC PAMP处理指导HBV cccDNA衰变。(5A)HBV感染和处理时间表。第0天,HepG2-hNTCP细胞以1000Geq/细胞的moi用HBV感染,孵育24小时,并更换培养基。在第三天,收获细胞或用DMSO、ETV(500nM)、F7(10μM)、多聚U/UC(100ng/ml)或用与F7或多聚U/UC PAMP组合的ETC处理。在20天的时间进程中,在指定点收获细胞。(5B)、(5C)通过Hirt提取物分离DNA并使用HBV特异性DNA探针进行Southern印迹分析。每条泳道下方的百分比值表示与每次处理前的第三天对照相比的cccDNA的相对量。指示了质量标记的位置。(5D)cccDNA水平通过RT-qPCR测量。显示了相对于线粒体DNA(MT-CO3)的cccDNA值。使用

Student's t检验确定统计学显著性。数据表示为平均值±标准偏差(SD),*P<0.01,**P<0.005,***P<0.001以及ns=不显著。(E)来自RT-qPCR分析的cccDNA的半衰期是通过在每种处理策略下同时拟合三个重复来估计的。C(t)是处理后时间"t"时cccDNA的百分比值,C(0)是处理开始时cccDNA的百分比值。(5F)每个处理系列的整个时间进程中的HBsAg。使用Student's t检验确定统计学显著性。数据表示为平均值±标准偏差(SD),**P<0.005,以及ns=不显著。

[0028] 图6A-6D说明了F7和多聚U/UC PAMP通过RIG-I特异性地对IRF3活化发信号以抑制HBV cccDNA。(6A)将F7施用至HepG2-hNTCP-NT(表达非靶向指导RNA)、RKO(表达RIG-I-靶向指导RNA的RIG-I敲除)和MKO(表达MDA5-靶向指导RNA的MDA5-敲除)持续24小时。收获细胞并通过免疫印迹分析。使用相应的抗体测定p-IRF3(S386磷酸化、活性IRF3)、IRF3(总IRF)、IFIT1、RIG-I和MDA5相对于微管蛋白表达水平的蛋白质表达水平。(6B)HepG2-hNTCP-NT、RKO和MKO细胞用100ng/ml X-RNA或100ng/ml或200ng/ml多聚U/UC PAMP处理24小时。如(6A)中那样收获细胞并通过免疫印迹分析。(6C和6D)以1000Geq/细胞的moi用HBV感染细胞。24小时后,用DMSO(-;阴性对照)、CsA(处理对照)、(6C)10μM)或F7或(6D)X RNA或多聚U/UC PAMP处理培养物。三天后收获细胞,制备Hirt提取物并使用HBV-DNA探针进行Southern印迹分析。指示了质量标记的位置。每条泳道下方的值显示与对照处理相比剩余的cccDNA百分比。

[0029] 图7A-7C说明了原代人肝细胞中cccDNA的抑制。(7A)将PHH单独培养或用100ng/ml X-RNA(X100)或50ng/ml(P50)、100ng/ml(P100)或200ng/ml(P200)多聚U/UC PAMP处理或用SenV(对照)感染并在24和72小时后收获。使用相应的抗体通过免疫印迹分析细胞裂解物的p-IRF3(S386磷酸化、活性IRF3)、IRF3(总IRF3)、IFIT1和肌动蛋白(对照)。(7B)将PHH培养物单独培养或用100ng/ml X-RNA(X100)或100ng/ml(P100)或200ng/ml(P200)多聚U/UC PAMP处理或用SenV(对照)感染并在24和72后收获。收获细胞,提取RNA并通过RT-qPCR分析以测量指定的固有免疫基因的标准化至GAPDH表达水平的表达水平。值在热图中显示为来自三个独立实验的相对于未处理细胞的平均诱导倍数。(7C)PHH培养物以200Geq/细胞的moi接种HBV。24小时后,用CsA(处理对照;10μM)、100ng/ml X-RNA(X100)或100ng/ml(P100)或200ng/ml(P200)多聚U/UC PAMP处理培养物。三天后收获细胞,通过分离的Hirt提取分离DNA,并使用HBV特异性探针通过Southern印迹分析。标注无病毒蛋白DNA(无蛋白松弛环状DNA[PF-RC DNA]和cccDNA)。每条泳道下的值显示与未处理的对照相比剩余的cccDNA百分比。质量标记的位置显示在左侧。

[0030] 图8A-8L是说明F7和多聚U/UC诱导差异性固有免疫基因表达的一系列图表。HepG2-hNTCP细胞用SenV(阳性对照)感染或用F7(5或10uM,如图所示)、X-RNA(100ng/ml;X-100和200ng/ml;X-200)或多聚U/UC PAMP 100ng/ml或200ng/ml如所示的处理24小时(黑色柱)和72小时(灰色柱)。在每个时间点收获细胞。纯化总细胞RNA并进行RT-qPCR分析以测量一组固有免疫基因的表达水平,包括IFIT1、CXCL10、IFITM1、RSAD2、RIG-I、MDA5、SAMHD1、APOBEC3A、APOBEC3G、IFN-α、IFN-β和IFN-λ3。将基因表达水平标准化至每个样品中的GAPDH表达水平,并表示为来自三个独立实验的相对于使用2.5%DMSO处理(阴性对照)所获得的结果的诱导倍数。数据表示为平均值±标准偏差(SD),*P<0.01,**P<0.005,***P<0.0005,****P<0.0001,以及ns=不显著。

[0031] 图9A-9E说明了在用F7或多聚U/UC PAMP处理期间，在细胞的平行培养物中的HBV复制的动力学。(9A)HepG2-hNTCP细胞以1000Geq/细胞的moi用HBV感染。24小时后，用F7(10μM)(上图)或100ng/ml X RNA或100ng/ml多聚U/UC PAMP(下图)处理细胞。在每个时间点收获细胞，制备Hirt上清液并进行Southern印迹分析。(B)通过RT-qPCR分析HBV pgRNA。对于RT-PCR分析，来自20Dpi的“仅HBV”的值设置为100％。数据表示为平均值±标准偏差(SD)，***P<0.001，****P<0.0001，以及ns＝不显著。(9C)通过Southern印迹分析来自用10uM F7(上图)或100ng/ml XRNA或多聚U/UC PAMP(下图)处理的细胞的HBV细胞内衣壳相关DNA。(9D)通过ELISA检测用F7(上图)或多聚U/UC(下图)处理的HBV感染的细胞分泌的HBsAg。(9E)通过qPCR从用10uM(左图)或100ng/ml XRNA或多聚U/UC PAMP(右图)处理的细胞中测量细胞外HBV-DNA。数据表示为来自三个独立实验的平均值±标准偏差(SD)。***P＝0.0002。

[0032] 图10A-10E图解说明了F7和多聚U/UC PAMP处理的CC_{50}分析。HepG2-NTCP细胞(10A和10C)、dHepaRG(10B和10D)和PHH(10E)用增加剂量的F7或多聚U/UC PAMP处理72小时。通过测量ATP含量同时确定细胞活力，将值标准化至模拟处理的细胞。图表表示3个独立实验的每一个实验中一式三份样品的平均值，误差条显示标准偏差。ns＝不显著。

[0033] 图11说明了cccDNA的半衰期。HepG2-NTCP细胞以moi1000Geq/细胞用HBV感染，在3dpi时，培养物保持未处理，或通过每天用单独的或包含ETV的新鲜培养基替换培养基来使用ETV(500nM)在整个50天的时间进程内进行处理。在指定的时间点收获细胞，通过Hirt提取分离DNA，并使用HBV特异性探针通过Southern印迹分析。每条泳道下方的百分比值表示与第3天水平相比存在的cccDNA的相对量。

[0034] 图12说明了用CRISPR/Cas9指导RNA构建体转导以靶向RIG-I(RKO)或MDA5(MKO)或用非靶向指导RNA(NT)对照转导的HepG2-hNTCP细胞的免疫印迹分析。用100U/ml IFN-β处理细胞24小时。制备细胞裂解物并通过免疫印迹分析。使用相应的抗体测定RIG-I、MDA5和IFIT1和微管蛋白(管家蛋白对照)的水平。

[0035] 发明详述

[0036] 乙型肝炎病毒(HBV)介导持续感染、慢性肝炎和肝病。HBV共价闭合环状DNA(cccDNA)对于病毒持续存在是很重要的，因此消除它被认为是HBV治愈的基石。通过避免固有免疫活化和抗病毒基因表达的干扰素调节因子3(IRF3)诱导，被感染的肝细胞中由病原体识别受体(PRR)检测到的低效率有助于HBV持续存在。鉴于上述挑战，发明人评估了RIG-I的诱导的信号传导的抑制cccDNA的能力，其中RIG-I是一种发出固有免疫信号的PRR。如下文更详细描述，使用了两种不同的RIG-I激动剂用于概念证明，一种被称为“F7”的小分子化合物，以及一种5’三磷酸多聚U/UC病原体相关分子模式(PAMP)RNA。F7和多聚U/UC PAMP处理HBV感染的细胞诱导IRF3活化的RIG-I信号传导，以诱导抗病毒基因用于cccDNA形成的抑制和已建立的cccDNA的加速的衰变，并与恩替卡韦的作用相加。该研究表明，活化IRF3，例如通过诱导RIG-I途径，诱导固有免疫作用，为消除cccDNA提供治疗益处。

[0037] 根据前述内容，在一个方面，本公开内容提供了一种抑制被感染的细胞中乙型肝炎病毒(HBV)共价闭合环状DNA(cccDNA)水平的方法。所述方法包括使被感染的细胞与在被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化的试剂接触。

[0038] 如上所述，乙型肝炎病毒DNA从被感染的细胞的核中的病毒核衣壳中释放出来。这

种病毒DNA以松弛环状DNA(RC DNA)的形式从病毒衣壳中释放出来。RC DNA被转化为共价闭合环状DNA(cccDNA),并用作合成所有HBV RNA转录物(包括前基因组(pg)RNA、pre-S、S和X病毒RNA)的主要模板。cccDNA可以通过细胞内扩增途径在细胞内复制。cccDNA的寿命可以相对较长,并且可以作为长期慢性感染的基础,即使在治疗后也是如此。如本文所用,术语"抑制cccDNA"包括抑制被感染的细胞中新cccDNA的形成。术语"抑制cccDNA"还可以包括在接触步骤之前降低被感染的细胞中现有cccDNA的稳定性。稳定性的降低可导致cccDNA的半衰期缩短。稳定性降低可以通过被感染的细胞内cccDNA水平的减少来观察。在一些实施方案中,cccDNA水平的减少与也被HBV感染的被感染的(例如,相同谱系或组织类型的)细胞有关。减少可以是被感染的细胞中的cccDNA水平的任何可检测的减少,例如减少约5%、减少约10%、减少约15%、减少约20%、减少约25%、减少约30%、减少约35%、减少约40%、减少约45%、减少约50%、减少约55%、减少约60%、减少约65%、减少约70%、减少约75%、减少约80%、减少约85%、减少约90%、减少约95%、减少约97%、减少约99%,以及完全根除。

[0039] 该细胞可以是任何被HBV感染的细胞。在一些实施方案中,被感染的细胞是肝细胞。

[0040] 针对病毒感染的固有免疫反应的关键组分是干扰素调节因子3(IRF3)的活化。IRF3诱导抗病毒基因的表达,并且还诱导IFN。抗病毒基因可以抑制病毒在被感染的细胞中的复制,而IFN通过表达数百个具有抗病毒和免疫调节活性的干扰素刺激基因(ISG)来指导在被感染的细胞和邻近旁观者细胞中的病毒复制的抑制。除了病毒感染的IFN抑制外,病毒感染的细胞的程序性死亡可用于防止病毒传播。因此,IRF3作用的组合,包括产生的IFN作用和细胞死亡信号传导,为许多病毒提供了病毒控制的协同程序。本公开内容部分基于该途径可用于对抗HBC的证明,其通常避免诱导此类IRF3作用。

[0041] 在一些实施方案中,通过诱导视黄酸诱导基因I(RIG-I)样受体(RLR)信号传导途径间接诱导IRF3活化的试剂。RLR是细胞质RNA解旋酶,其作为PRR用于识别RNA病毒感染。RLR包括RIG-I(视黄酸诱导基因I)、MDA5(黑色素瘤分化相关基因5)和LGP2(遗传学和生理学实验室2)。虽然RIG-I和MDA5编码串联氨基末端半胱天冬酶活化和募集结构域(CARD),但LGP2缺乏CARD,并且被认为在由RIG-I或MDA5启动的信号传导中起调节作用。在病毒PAMP RNA的识别和结合后,RIG-I通过衔接蛋白线粒体抗病毒信号传导(MAVS,也称为IPS-1/VISA/Cardif)发出信号。RLR的下游信号传导诱导潜伏转录因子的活化,包括干扰素调节因子(IRF)-3和NF-κB,导致被感染的细胞产生I型干扰素(IFN)。本领域普通技术人员将能够容易地确定RLR途径的活化,例如通过测定已知下游RLR调节基因的转录。例如,在一些实施方案中,RLR活化可以通过增加IFNβ或ISG54表达来建立。在另一个实施方案中,RLR活化可以通过IRF3磷酸化的增加来建立。因此,在一些实施方案中,RLR信号传导途径包含RIG-I、黑色素瘤分化相关基因5(MDA5)、遗传学和生理学实验室2(LGP2)和/或线粒体抗病毒信号传导(MAVS)蛋白。

[0042] 在一些实施方案中,诱导RIG-I信号传导的试剂是或包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子。本公开内容所涵盖的示例性PAMP和含PAMP的核酸分子公开于美国公开号2015/0017207和2018/0104325,其涉及PAMP诱导的固有免疫反应信号传导,并通过引用整体并入本文。本公开内容所涵盖的含PAMP的核酸的元件和示例性实施方案在本文中得到解决。

[0043] 作为初步事项，本文使用的术语“核酸”是指单体单元或“残基”的聚合物。核酸的单体亚基或残基各自包含含氮碱基(即核碱基)、五碳糖和磷酸基团。每个残基的身份通常参照每个残基的核碱基(或含氮碱基)结构的身份在本文中表示。典型的核碱基包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)(在RNA中代替胸腺嘧啶(T)残基)和胞嘧啶(C)。然而，本公开内容的核酸可以包括本领域公知的任何修饰的核碱基、核碱基类似物和/或非经典核碱基。对核酸单体或残基的修饰包括核酸单体或残基结构中的任何化学变化，其导致非经典亚基结构。此类化学变化可能来自例如表观遗传修饰(例如基因组DNA或RNA)，或由辐射、化学或其他方式造成的损伤。可以由修饰产生的非经典亚基的说明性和非限制性实例包括尿嘧啶(用于DNA)、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-formethylcytosine、5-羧基胞嘧啶b-葡糖基-5-羟基-甲基胞嘧啶、8-氧鸟嘌呤、2-氨基-腺苷、2-氨基-脱氧腺苷、2-硫代胸苷、吡咯并-嘧啶、2-硫代胞苷或脱碱基损伤(abasic lesion)。脱碱基损伤是沿着脱氧核糖主链但缺乏碱基的位置。天然核苷酸的已知类似物以类似于天然存在的核苷酸的方式与核酸杂交，例如肽核酸(PNA)和硫代磷酸酯DNA。

[0044] 核碱基所连接的五碳糖可以取决于核酸的类型而变化。例如，糖在DNA中是脱氧核糖，在RNA中是核糖。在某些情况下，在本文中，核酸残基也可以指核苷结构，例如腺苷、鸟苷、5-甲基尿苷、尿苷和胞苷。此外，核苷的替代命名法还包括在核碱基之前指示“核糖”或“脱氧核糖”前缀以推断五碳糖的类型。例如，本文偶尔使用的“核糖胞嘧啶”等同于胞苷残基，因为它指示RNA分子中该残基处存在核糖。核酸聚合物可以是或包含脱氧核糖核苷酸(DNA)聚合物、核糖核苷酸(RNA)聚合物，包括mRNA。核酸也可以是或包含PNA聚合物，或本文所述的任何聚合物类型的组合(例如，包含具有不同糖的残基)。

[0045] 在一些实施方案中，含PAMP的核酸是合成的。在此上下文中，术语“合成的”是指核酸的非天然特征。此类核酸可以使用标准合成技术从头合成。可替代地，可以使用本领域众所周知的重组技术从天然存在的病原体序列产生或衍生核酸PAMP。在一些实施方案中，合成核酸PAMP构建体的序列不是天然存在的。

[0046] 在一些实施方案中，含PAMP的核酸是RNA构建体。在这些实施方案的一些中，含PAMP的核酸来源于HCV多聚U/UC区或反映其序列，并且在此上下文中，通常可称为多聚U/UC PAMP RNA构建体。在一些实施方案中，多聚U/UC PAMP RNA构建体是合成的。

[0047] 本公开内容的含PAMP的核酸通常包含(a)5’臂区，其包含末端三磷酸(“ppp”或“3xp”)；(b)聚尿嘧啶核心(也称为“多聚U核心”)；和(c)3’臂区。在一个实施方案中，三个区域(a、b和c)共价连接在单个核酸聚合物大分子中。共价连接可以是直接的(没有散布的一个或多个接头序列)或间接的(具有散布的一个或多个接头和/或一个或多个序列)。在一个实施方案中，5’臂区共价连接至多聚U核心的5’端。在一个实施方案中，3’臂区共价连接至多聚U核心的3’臂区。聚合物可以是单链或双链的，或者可以以单链和双链部分的组合出现。

[0048] 在一个实施方案中，多聚U核心包含至少8个连续的尿嘧啶残基。在进一步的实施方案中，其包含8至60个连续的尿嘧啶残基，例如8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60个以及连续的尿嘧啶残基。在一个实施方案中，多聚U核心包含超过8个连续的尿嘧啶残基。在一个实施方案中，多聚U核心包

含12个或更多个连续的尿嘧啶残基。在一些实施方案中，多聚U核心由多个连续的尿嘧啶残基组成，例如8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60个连续的尿嘧啶残基。

[0049] 在一个实施方案中，3’臂区包含不是尿嘧啶残基的5’最末端的核酸残基。相反，3’臂区的5’最末端的核酸残基可以是腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶残基，或任何非经典残基。在一个实施方案中，3’臂区的5’最末端的核酸残基是胞嘧啶残基、鸟嘌呤残基或腺嘌呤残基。

[0050] 在一个实施方案中，3’臂区的核苷酸组成是至少约40％的尿嘧啶残基。在一些实施方案中，3’臂区是至少约45％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％，或者是至少约95的尿嘧啶残基。在一个实施方案中，3’臂区包含连续的尿嘧啶残基的多个短区段(例如，长度在约2至约15个核苷酸之间)，其间散布有一个或多个胞嘧啶残基。在一个实施方案中，3’臂区包含连续的尿嘧啶残基的多个短区段(例如，长度在约2至约15个核苷酸之间)，其间散布有一个或多个鸟嘌呤残基。在一个实施方案中，3’臂区包含连续的尿嘧啶残基的多个短区段(例如，长度在约2至约15个核苷酸之间)，其间散布有一个或多个腺嘌呤残基。在一个实施方案中，3’臂区包含一段连续的尿嘧啶残基，其不超过合成的含PAMP的核酸分子的多聚U核心的长度。在一个实施方案中，3’臂区不包含一段连续的尿嘧啶残基，其等于和/或超过合成的含PAMP的核酸分子的多聚U核心的长度。在一些实施方案中，3’臂区包含至少7个连续的尿嘧啶残基，例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个连续的尿嘧啶残基。

[0051] 至少，5’臂区由末端三磷酸(ppp)部分组成。在这样的实施方案中，三磷酸位于合成的含PAMP的核酸分子的5’末端并且可以表示为“5’-ppp”。在进一步的实施方案中，末端三磷酸直接连接到多聚U核心序列的5’末端。在另一个实施方案中，5’臂区包含5’末端三磷酸和一个或多个额外的核酸残基，其序列以3’-末端终止。该实施方案的5’臂区中的一个或多个额外的核酸残基位于末端三磷酸和多聚U核心的5’最末端的尿嘧啶残基之间。本领域普通技术人员将容易理解，5’臂区中的一个或多个额外的核酸残基可以是任何数量的核酸残基并且可以呈现任何序列而没有限制。5’臂区中一个或多个额外的核酸残基的序列不影响含PAMP的核酸分子的功能。例如，如美国公开号2015/0017207和2018/0104325中所述，向含有5’三磷酸的非刺激性核酸(例如HCV X区域)添加多聚U核心区赋予固有免疫系统信号传导的刺激特性。在一个实施方案中，5’臂区中的一个或多个额外核酸残基的序列不由天然存在的HCV基因组序列的整个5’末端部分组成，该天然存在的HCV基因组序列天然存在于该HCV株的多聚U/UC区的多聚U核心的“上游”或5’端。换句话说，在这个实施方案中，整个合成的含PAMP的核酸分子不是天然存在的HCV基因组，其具有完整的5’三磷酸、整个编码区和非翻译的3’多聚U/UC区。因此，在该实施方案中，5’臂区、5’臂区的一个或多个核酸残基和聚尿嘧啶核心在HCV基因组中不天然地一起存在。然而，在该实施方案中，5’臂区的一个或多个核酸残基可以包含或由存在于5’臂区和聚尿嘧啶核心之间的整个天然存在序列的子片段组成。可替代地，在该实施方案中，5’臂区的一个或多个核酸残基可以包含除了存在于5’末端和聚尿嘧啶核心之间的部分或整个天然存在的HCV基因组序列之外的序列。

[0052] 在一些实施方案中，核酸分子包含至少16个核苷酸的序列。在一些实施方案中，核酸分子包含至少约16个核苷酸至约1000个核苷酸的序列，例如约20至约1000个核苷酸、约

30至约1000个核苷酸、约40至约1000个核苷酸、约50至约1000个核苷酸、约60至约1000个核苷酸、约70至约1000个核苷酸、约80至约1000个核苷酸、约90至约1000个核苷酸、约100至约1000个核苷酸、约150至约1000个核苷酸约1000个核苷酸、约200至约1000个核苷酸、约250至约1000个核苷酸、约300至约1000个核苷酸、约350至约1000个核苷酸、约400至约1000个核苷酸、约450至约1000个核苷酸核苷酸，约500至约1000个核苷酸，约550至约1000个核苷酸，约600至约1000个核苷酸、约650至约1000个核苷酸、约700至约1000个核苷酸，以及其中的任何数量或范围。在更进一步的实施方案中，核酸含有约20至约100个核苷酸、约30至约100个核苷酸、约40至约100个核苷酸、约50至约100个核苷酸、约60至约100个核苷酸、约70至约100个核苷酸，约80至约100个核苷酸，以及约90至约100个核苷酸，以及其中的任何数量或范围。在一些实施方案中，核酸包含约16至60个核苷酸，例如约16至约30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60个核苷酸。在一些实施方案中，核酸具有多达约50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60个核苷酸，并且3'-臂包含多个2至15个连续尿嘧啶残基的短区段，其中具有散布在多个短区段之间的一个或多个胞嘧啶或鸟嘌呤残基。在一些实施方案中，核酸分子具有多达53个核苷酸并且3'臂区是至少60％的尿嘧啶残基。

[0053] 由所公开的含PAMP的核酸所涵盖的PAMP的核酸序列的非限制性实例公开于美国公开号2015/0017207和2018/0104325以及Saito,T.等人(2008).Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA.Nature 454,523-527;以及Schnell,G.等人(2012).Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I.PLoS pathogens 8,e1002839(每一个都以引用的方式并入本文)并在本文中作为SEQ ID NO:34-123示出。在一些实施方案中，含PAMP的核酸含有多聚U核心区和/或3'-臂序列，其独立地选自SEQ ID NO:34-123的任何公开的序列中的任何多聚U核心区和/或3'臂区。这些示例性的非限制性序列也在下表1中提供。所公开的含PAMP的核酸可以包含其中列出的任何序列。应当理解，这种示例性的含PAMP的核酸将符合如本文所述的含PAMP的分子的一般结构参数，包括具有末端三磷酸(ppp)部分。在一个实施方案中，含PAMP的分子包含序列:GGCCAUCCUGUUUUUUUCCCUUUUUUUUUUUCUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU(SEQ ID NO:124)。在另一个实施方案中，含PAMP的核酸包含序列:GGCCAUUUUCUUUUUUUUUCUCUUUUUUUUUUUUUUUUUAUUUUCUUUAAU(SEQ ID NO:125)。同样，应理解具有所示序列的示例性含PAMP的核酸也将具有上述特征，包括5'末端三磷酸(ppp)部分。

[0054] 表1:具有示例性5'臂、多聚U核心和3'-臂结构域的多聚U/UC PAMP构建体的序列

[0055]

5'臂 [a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU	34
ACUGUUCC	U43	C(U14)CCCUCUUUCUUCCCUUCUCAUCUUAUUCUACUUUCUUUCUU	35
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU(C26)	36
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U34	CUCCUUUUUUUUUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	37
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U36	CCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU	38
UUUUUUUUUUUUUUUUUUUC(U11)C	U34	VUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	39

[0056]

5'臂 [a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C (U8)UCC	U9	CCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU(C26)	40
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U17	CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU(C17)	41
GGCCAUCCUG	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCU	42
CCCCCCCCCC	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCU	43
GGCCAUCCUG	U34	CCCCCCCCCCCCCCCCCC	44
	U44	VUUUUUUUUUUUUUUUU	45
	U44	CUUUUUUUUUUUUUUUU	46
UUCCUUCC	U36	CUCCUUUUUUUUUCCUCU	47
UUUUUUUUUG	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCU	48
UUUUUUUUUG	U34	CUUUUUUUUUUUUCCUUU	49
GGUUUUCC	U36	CUUUUUUUUUUUUUUUU	50
GGCCAUCCUG	U10	C(U10)C(U10)CUCUCCUUUUUUUUUCCUCU	51
GGCCAUCCUG	U15	C(U15)CUUCUCCUUUUUUUUUCCUCU	52
GGCCAUCCUG	U10	CCC(U10)CCC(U8)CUCCUUUUUUUUUCCUCU	53
GGCCAUCCUG	U18	CCCCCC(U10)CUCCUUUUUUUUUCCUCU	54
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U34	CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU	55
GGCCAUUC	U16	CUUUCUUCUUU	56
GGCCAUUCCC	U81	CUCUUCUUUUCUUUAUUCCUUCUUU	57
GGCCGUUCC	U64	CUUUUCCCCUUUUUUAUUUUUCUUUCUU	58
GGCCAUCCUGUUUUUUUGUUUUUUC	U43	CUUUUUUUCCCUUUUUUUUAUUUUAUUUUCUUUUGGU	59
GGCCAUCCCCC	U96	CCUCUUUUUUUCCUUUUCUUCUUU	60
GGCCGUUCUG	U85	CCUUUUUUUUAUUCCUCUUCU	61
GGCCAUCCCCUUUG	U94	AUUUCUCCUUCUUUU	62
GGCCAUUCC	U25	CUUUUUUUUUCC(U24)CCUUUUCUUUCUUCUUU	63
GGCCAUUUUC	U14	CUUCUUUCUUUUUCUUUUUCUUUUUUUCCUUCUUU	64

[0057]

5'臂 [a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
AGCCAUUUCCUG	U28	CUUUUUUUUUUCUUUCCUUUCCUUCUUUUUUUCCUUUCUUUUUCCCUUCUUUAAU	65
GGCCAUUUCCUG(U15)GG	U39	CCUUUCCUUCUUUUUUUUUUUUUCCCUCUUUAU	66
GGCCAUUUCCUG	U34	CUUUUCCUUCUUUUUCCCUUUUUCUUUCUUCCUUCUUUAAU	67
GGCCAUCCUGUG	U75	AUUUCCUUUUCUU	68
5'GGCCAACCUG(U26)CC	U34	CCUUUUUUUCUUUUUUUUUUUUUUUUUCCUUCCUUUU	69
GGCCAUCCUG	U16	CUUUCUUU	70
GGCCAUUUUUCC	U23	CUUUUUUUUUUCCUUUUUUUCUUUUUUUUUUCUUUUCUUU	71
GGCCAUUC	U35	CGUUUCUUUUUCUUCUUUUUGUUUUCUCUUCUCCUUUU	72
GGCCAUUCCCC(U14)CCGC	U33	CUUUUUUUUUCC(U27)CUUUUU	73
GGCCAUCCCCC(U13)CCGC	U21	CUUUUUUUUUUUCUUUUUUUUUUCC(U24)CUUUUCUUUUU	74
GGCCAUUC	U16	CUUUCUUCUUU	75
GGCCAUCCCCUUC	U22	CCUUUUCUUCUUU	76
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C	U29	CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCUUUCCUUU	77
GGCCGUCCUG(U19)CC	U67	CUUCUUUCUUUCUU	78
GGCCAUUUCCUG	U53	C(U17)CC(U20)CUUUCCUUCUUUUUUCCUUUCUUUUCCUUCCUUCUUUAAU	79
GGCCAUUCCUG(U16)CUUUGUUUUUUUUG	U17	CCUUUC(U15)CCUUUCUUCUUUAAU	80
GGCCAUUUCCUG	U20	CUUUCCUUCUUUUUUCCUUUCUUUUCCUUCCUUCUUUAAU	81
GGCCAUUUCCUG	U34	CUUUUCCUUCUUUUUCCCUUUUUCUUUCUUCCUUCUUUAAU	82
GGCCAUUUCCUG	U51	C(U17)CC(U20)CUUUCCUUCUUUUUUCCUUUCUUUUCCUUCCUUCUUUAAU	83

[0058]

5'臂 [a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
GGCCAUUUCCUG(U14)CCC	U37	CUUUCCUUCUUUUUUUCCUUUCUUUUCCUUCCUUCUUUAAU	84
GGCAUCCUG	U64	CUUUUCUUU	85
ACACUCCAUUUCUUUUUUUG	U67	CUUUUUCUUUCCUUUCUUUUCUGACUUCUAAUUUUCCUUCUUA	86
GUCCUUCUG	U78	CCUUACCCUUUCCUUCUUUUCUUCCUUUUUUUUCCUUACUUU	87
GGGUCCCCUUG	U12	CUUUCCUUCUUUCCUUUCCUAAUCUUUCUUUCUU	88
AGCCAUUUCCUG	U28	CUUUUUUUUUUUCUUUCCUUUCCUUCUUUUUUUCCUUUCUUUUUCCCUUCUUUAAU	89
GGCCAUUUCCUG(U15)G	U55	CCUUUCCUUUUUUUUUUUUUUUCCCUUUUUAU	90
GGCCAUCCUG(U22)C	U17	CUUUUUUUUUCUUCUUUUUCUUUCC(U24)CUUCUUUC	91
GGCCAUUUCCUG	U46	CUUUUUCCCUCUUUUUCUUCUCUUUUUCCUUCUUUAAU	92
GCUAACUGUUCC	U43	CUUUUUUUUUUUUUUCCCUCUUUCUUCCCUUCUCAUCUUAUUCUACUUUCUUUCUU	93
GCUAACUGUUCC	U38	C(U15)CCCUCUUUCUUCCCUUCUCAUCUUAUUCUACUUUCUUUCUU	94
GCUAACUGUUCC(U11)C	U27	CCUUCUUUCUUUCUUUCUUACCUUACUUUACUUUCUUUUCU	95
GCUAACAGUUUCUC(U13)CC(U6)AUUUUUA	U25	AUUUUCUUUUCCUUUCUUUCUCACCUUACAUUACUUUCUUUCUU	96
GCUAAUUUCCUUAUUG	U19	CUUUCCAUUUCCUUCCUUCUUACUUCACUUUACCUUCUUUCU	97
GCUAACUG	U77	CCUUUCCUUUCUUUCUUACCUUACUUUACAUUCUUUUCU	98
GCUAACUGUUCC	U70	CUUUCCUUCCUUUCUCACCUUCUUUUACUUCUUUCCU	99

[0059]

5'臂 [a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
GCUAACUG	U45	CUUUUCUUUCCUUUCCUUCUUACUCUACUUUACUUUUUCU	100
GCUAACUGUUC	U78	CUUUUCCUUCUUCUUUCUUACCUUAUUUUCCUUCUUUCUU	101
GCUAACUG	U30	CUUUUUUUUUCUUUUCUUUCCUUCUUACCUUACUUUACUUUCUUUUCU	102
GCUAACUG	U81	CCUUUUUCCUUUUCCUUCUCUUUUUACCUUACUUUACUUUUCUU	103
GCUAACUGUCCC	U84	CUUUUUUUCUCUUUUCCUUCUUUCUUACCUUAUUUUACUUUCUUUCCU	104
GCUAACUGUCCCUUUUUUUUUG	U30	C(U18)GUUUCUUUUCCUUCUCAUUUCCUUCUUAUCUUAAUUACUUCCUUUCCU	105
GCUAACUG	U39	CCUUCUUCCUUUCCUUCUUACCUUACUUUAUUUUCUUUCCU	106
GCUAACUG	U54	CUUUCUUUUCUUUUCUCACCUUACUUUACUUCCUUUCUU	107
GCUAGUUUUC	U24	G(U14)CCUCUUUUUCCGUAUUUUUUUUUUUUCCUCUUUUCUU	108
GGCCAUCCUG(U7)CCC(U11)C	U34	CUCC(U9)CCUC(U7)CCUUUUCUUUCCUUU	109
CCAUUUUUC	U13	GUUUG(U16)CUUUCCUUCUUUCCUGACUUUUAAUUUUCCUUCUUA	110
CCAUUUUUC	U49	GUUUG(U17)CUUUCCUUCUUUCCUGACUUUUAAUUUUCCUUCUUA	111
GGCCAUUUCCUG	U33	ACCCUUUUUUCUC(U12)CCUUCUUCUUUAAU	112
GGCCAUUUCCUG	U18	ACCCUUUUUUCUC(U17)CCUUCUUCUUUAAU	113
GGCCAUUUUCUG	U14	AUUUUCUUUAAU	114
GGCCAUUUUC(U10)CUC	U18	AUUUUCUUUAAU	115
GGCCAUUUUCUG	U20	CC(U12)CCUC(U20)AUUUUCUUUAAU	116
GGCCAUUUUCUG(U12)C	U17	CCUUUUUUUUUCUC(U14)AUUUUCUUUAAU	117
GGCCAUCCUG	U24	G(U17)CUUUUUCC(U13)AUUUUCUUCUUU	118

[0060]

5'臂[a]	U-核心	3'臂	SEQ ID NO:
GGUCCUAAG	U13	CUUCCUUCCUUCUUUCCUUUUCUAAUUUUCCUUCUUU	119
GGUCCUAAGUUG	U15	CCUUCCUUCUUUCCCUUUUCUAAUUUUCCUUCUUU	120
GGUCCUAAGUUG	U23	CCUUUCCUUCCUUCUUUCCUUUUCUAAUUUUCCUUCUUU	121
GGCCAUUUCUG	U41	GUUUCCUUCUUUUUCCUUUUC(U11)CUCCCUUUAAU	122
GGCCAUUUCUG	U14	GUUUCCUUCUUUUUCCUUUUC(U13)CUCCCUUUAAU	123

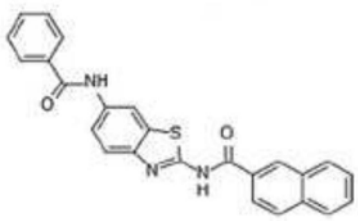
[0061] [a]除了所示序列之外,5'臂均包含5'-ppp部分。

[0062] 如美国公开号2015/0017207和2018/0104325中所述,含有具有聚尿嘧啶核心序列的HCV衍生的RNA PAMP的核酸可以触发视黄酸诱导基因I(RIG-I)样受体(RLR)信号传导。因此,在一些实施方案中,含PAMP的核酸分子能够诱导视黄酸诱导基因I(RIG-I)样受体(RLR)活化。在一个实施方案中,RLR是RIG-I。本领域普通技术人员将能够容易地确定RLR的活化,例如通过测定已知下游RLR调节基因的转录,如下文更详细描述的。例如,在一些实施方案中,RLR活化可以通过IFNβ或ISG54表达的增加来建立。在另一个实施方案中,RLR活化可以通过IRF3磷酸化的增加来建立。

[0063] 在一些实施方案中,含PAMP的核酸分子以约80ng/mL或更高的浓度与细胞接触以导致RLR活化的诱导。因此,在一些实施方案中,所述方法包括使细胞与浓度为至少约80ng/mL至约500ng/mL,例如100ng/mL至250ng/mL的含PAMP的核酸分子试剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括使细胞与浓度为至少约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约110ng/mL、约120ng/mL、约130ng/mL、约140ng/mL、约150ng/mL、约160ng/mL、约170ng/mL、约180ng/mL、约190ng/mL、约200ng/mL、约210ng/mL、约220ng/mL、约230ng/mL、约240ng/mL、约250ng/mL、约260ng/mL、约270ng/mL、约280ng/mL、约290ng/mL、约300ng/mL、约310ng/mL、约320ng/mL、约330ng/mL、约340ng/mL、约350ng/mL、约360ng/mL、约370ng/mL、约380ng/mL、约390ng/mL、约400ng/mL、约410ng/mL、约420ng/mL、约430ng/mL、约440ng/mL、约450ng/mL、约460ng/mL、约470ng/mL、约480ng/mL、约490ng/mL和约500ng/mL的含PAMP的核酸分子接触。

[0064] 在一些实施方案中,所述试剂是或包含小分子试剂。本领域普通技术人员可以容易地鉴定诱导RLR和/或IRF3信号传导途径的小分子试剂。本公开内容所涵盖的诱导RLR信号传导途径和/或IRF3信号传导途径的示例性小分子激动剂描述于例如Bedard,K.M.等人(2012).Isoflavone agonists of IRF-3dependent signaling have antiviral activity against RNA viruses.Journal of virology 86,7334-7344;Pattabhi,S.等人(2016).Targeting Innate Immunity for Antiviral Therapy through Small Molecule Agonists of the RLR Pathway.Journal of virology 90,2372-2387;Probst,P.等人(2017).A small-molecule IRF3 agonist functions as an influenza vaccine

adjuvant by modulating the antiviral immune response.Vaccine 35,1964-1971,通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子。示例性分子在US 9884876中公开。在一个特定的实施方案中,在下述研究中用作概念证明,小分子试剂具有化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。该小分子在本文中称为"F7",并且具有以下结构:

[0065] 

(F7)

[0066] 在一些实施方案中,所述方法包括使被感染的细胞与两种或更多种在被感染的细胞中诱导IRF3活化的试剂接触。两种或更多种试剂(例如,第一试剂、第二试剂、第三试剂等)可以一起与细胞接触,例如当配制为单一混合物时,或在分开的施用(其经协调以使得每个试剂的作用在重叠的时间范围内显示在细胞中)中与细胞接触。两种或更多种试剂可以包括例如含PAMP的核酸和小分子试剂。含PAMP的核酸和小分子试剂中的每一种都可以涵盖如上文更详细描述的每种试剂的特征和实施方案。例如,在一个说明性实施方案中,两种或更多种试剂包含含有病原体相关分子模式(PAMP)的核酸,其中PAMP包含:包含末端三磷酸的5'臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;以及包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基。此外,该说明性实施方案中的小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺的小分子。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法还包括使细胞与逆转录酶抑制剂以及如上所述在被感染的细胞中诱导IRF3活化的至少一种试剂接触。示例性逆转录酶抑制剂可以包括核苷酸或核苷逆转录酶抑制剂(NTRI),它们是合成病毒DNA所需的天然存在的核苷酸或核苷的类似物。NTRI与天然脱氧核苷酸竞争掺入生长的病毒DNA中。然而,由于结构差异(例如,缺少3'羟基),链延伸被阻止,因为下一个进入的核苷酸不能形成延伸链所需的磷酸二酯键。本公开内容涵盖的示例性、非限制性NTRI包括拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。本领域普通技术人员可以选择其他合适的逆转录酶抑制剂来进行所公开的方法。

[0068] 在一个具体的实施方案中,所述方法包括使细胞与以下中的两种或更多种接触:

[0069] (1)包含病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子,其中所述PAMP包括:

[0070] 包含末端三磷酸的5'臂区;

[0071] 包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

[0072] 包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基,如上文更详细描述的;

[0073] (2)小分子试剂,例如苯并噻唑衍生物分子,例如N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺;和

[0074] (3)NRTI,例如选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。

[0075] 在一个具体的实施方案中,所述方法包括使感染的细胞与包含如上所述的病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子和NRTI接触,所述NRTI例如选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。如上所述,多种试剂(包括NRTI)可以组合或混合配制,或者可以单独但以协调的方式(使得每种试剂在重叠的时间线中在细胞中发挥其作用)接触。如下文更详细描述的,所述试剂的同时施用导致对被感染的细胞中cccDNA的抑制的协同作用。

[0076] 上述方法可以是体外方法,应用于维持在培养物中的被感染的细胞。在这样的实施方案中,所述方法可以包括筛选潜在的抗病毒剂以进一步有助于抑制cccDNA。

[0077] 可替代地,所述方法可以是对患有HBC感染或怀疑患有HBV感染或有患HBV感染的风险的受试者进行的体内方法。因此,在另一个方面,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中治疗或预防乙型肝炎病毒(HBV)感染的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物在受试者的被感染的细胞中诱导干扰素调节因子3(IRF3)活化。

[0078] 如本文所用,术语“治疗”是指对受试者(例如,人或非人哺乳动物,例如另一种灵长类动物、马、狗、小鼠、大鼠、豚鼠、兔子等)的疾病、病症或病状进行医学管理。治疗可以包括成功治疗或改善疾病或病状(例如,HBV感染)的任何标志。在本文中,术语“”是指预防或抑制病原体(例如乙型肝炎病毒)定植的感染。此外,术语“治疗”是指治疗用途,例如解决已经开始的感染。在一个实施方案中,术语“治疗”是指将感染治愈到没有活性病原体(例如乙型肝炎病毒)留在宿主中的程度。在另一个实施方案中,术语“治疗”还包括减缓或抑制体内感染的传播,例如减缓或抑制病原体(例如乙型肝炎病毒)的复制速率。该术语还包括减少细胞(或宿主组织或身体)中的致病性负担。在一些实施方案中,这包括降低身体细胞中的cccDNA水平。该术语还包括相对于宿主的内源性免疫应答在不施用所公开的试剂的情况下清除病原体所需的时间加速病原体的清除速率。症状的治疗或改善可以基于客观或主观参数,包括医生检查的结果。因此,术语“治疗”包括施用本公开内容中公开的试剂或组合物以减轻或阻止或抑制与疾病或病状(例如,HBV感染)相关的症状或病状的发展。术语“治疗效果”是指受试者中疾病或病状、疾病或病状的症状或疾病或病状的副作用的改善、减少或消除。术语“治疗有效”是指产生治疗效果并且可以容易地确定的组合物的量。

[0079] 在一个具体的实施方案中,所述组合物是或包含核酸分子,所述核酸分子包含病原体相关分子模式(PAMP)。所述PAMP可包含:包含末端三磷酸的5’臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;以及包含至少8个核酸残基的3’臂区,其中3’臂区的5’最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3’臂区是至少30%的尿嘧啶残基。包含在该方面中的PAMP和/或包含PAMP的核酸的其他实施方案和特征在上文进行了更详细的描述,在此不再重复。

[0080] 在另一个实施方案中,组合物是或包含诱导RIG-I信号传导的小分子试剂。在一些实施方案中,小分子试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。包含在该方面中的小分子试剂的其他实施方案和特征在上文进行了更详细的描述,在此不再重复。

[0081] 在一些实施方案中,组合物被配制成两种或更多种治疗剂(例如,包含第一试剂、

第二试剂等)的混合物。可替代地,所述方法可以包括向受试者施用单独的组合物(例如,独立地包含第一试剂、第二试剂等)。分开的施用可以是同时的或协调的,使得各个组合物的效果在受试者中在重叠的时间范围内实现。

[0082] 联合实施方案的一个代表性实例是一种方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的第一试剂和第二试剂(在相同或不同的组合物中),其中:

[0083] 第一试剂是或包含核酸分子,所述核酸分子包含:包含末端三磷酸的5'臂区;包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基;和

[0084] 第二试剂是或包含苯并噻唑衍生物分子,例如包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺的小分子。

[0085] 所述方法还可以包括向受试者施用其他抗病毒疗法,例如治疗HBV感染的已知疗法。在一些实施方案中,治疗方法进一步包括除了如上所述在被感染的细胞中诱导IRF3活化的至少一种试剂以外还向受试者施用治疗有效量的逆转录酶抑制剂。例如,所述方法可以进一步包括施用治疗量的NRTI,例如选自拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等的NRTI。

[0086] 在一个具体的实施方案中,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的第一试剂和第二试剂(在单一组合物中或在分开的组合物中),其中所述第一试剂是或包含核酸分子,所述核酸分子包含:

[0087] 包含末端三磷酸的5'臂区;

[0088] 包含至少8个连续的尿嘧啶残基的聚尿嘧啶核心;和

[0089] 包含至少8个核酸残基的3'臂区,其中3'臂区的5'最末端的核酸残基不是尿嘧啶,并且其中3'臂区是至少30%的尿嘧啶残基;和

[0090] 其中所述第二试剂是或包含NRTI,例如拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦、替诺福韦艾拉酚胺(TAF)、克来夫定、Besivo、日达仙、瑞德西韦等。在进一步的实施方案中,NRTI是恩替卡韦或瑞德西韦。

[0091] 在一些实施方案中,一种或多种组合物仅施用一次。可替代地,一种或多种组合物根据医学专业人员制定的方案多次施用。影响方案的因素包括观察到的cccDNA水平、对治疗的耐受性等。

[0092] 在另一个方面,本公开内容提供了配制用于治疗乙型肝炎病毒(HBV)的治疗组合物。该方面还包括施用所公开的治疗组合物以治疗和/或预防受试者的HBV感染的方法。

[0093] 该方面的治疗组合物包含RIG-I激动剂、用于细胞内递送的媒介物和药学上可接受的承载体。在一些实施方案中,RIG-I激动剂是包含病原体相关分子模式(PAMP)的核酸分子。核酸分子和PAMP的具体示例性实施方案在上文更详细地描述并且包含在此方面中。在其他实施方案中,RIG-I激动剂是或包含苯并噻唑衍生物分子。示例性实施方案在上文更详细地描述并且包含在此方面中。在一个实施方案中,RIG-I激动剂包含化学式N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺。

[0094] 可以将一种或多种活性剂掺入媒介物中以促进细胞内递送。多种治疗递送媒介物或系统是已知的并且可以应用于治疗组合物。递送媒介物或系统可以包括颗粒制剂,例如乳液、微粒、免疫刺激复合物(ISCOM)、纳米颗粒例如可以是颗粒和/或基质、微球、脂质体、

纳米胶囊等，其有利于抗原的递送。可以使用已知和常规技术进行此类递送媒介物的配制和使用。在一个实施方案中，所公开的含PAMP的核酸和任何任选的另外的治疗剂被配制成脂质体递送媒介物。脂质体是以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时，它们自发形成。脂质成分在形成封闭结构之前经历自重排，并捕获溶液，包括脂质双层内和/或之间的溶解的溶质。脂质体制剂的示例性应用描述于Yallapu,U.等人,Liposomal Formulations in Clinical Use:An Updated Review,Pharmaceutics 9(2):12(2017)，其通过引用整体并入本文。

[0095] 在任何上述组合物或治疗方面和实施方案中，根据已知方法适当地配制组合物或试剂用于所需的治疗施用。例如，可以根据已知方法适当地配制组合物以用于优选的施用途径。可以配制药物组合物用于通过任何全身施用途径(例如，肌内、皮内、皮下、真皮下、透皮、静脉内、腹膜内、颅内、鼻内、粘膜、肛门、阴道、口服或口腔途径，或者它们可以被吸入)递送。某些施用途径特别适用于旨在诱导至少固有免疫反应的元件的药物组合物。特别地，透皮施用、肌肉内、皮下和静脉内施用是特别合适的。

[0096] 适合引入治疗组合物的制剂根据施用途径而变化。适用于肠胃外施用(例如通过关节内(在节点内)、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、鼻内和皮下途径)的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质，以及可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。制剂可以以单位剂量或多剂量密封容器(例如安瓿和小瓶)呈现。

[0097] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和油中制备分散体。在一般储存和使用条件下，此类制剂可含有防腐剂以防止微生物生长。适合注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末(美国专利号5,466,468，具体通过引用整体并入本文)。在所有情况下，该形式都应该是无菌的，并且流动性应该达到易于注射的程度。它在制造和储存条件下应该是稳定的，并且应该被保存以防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0098] 如本文所用，“承载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、承载体溶液、悬浮液、胶体等。承载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、甘露醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和/或植物油。适当的流动性可以例如通过使用包衣例如卵磷脂、通过在分散体的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂来保持。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等，可以促进对微生物作用的预防。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可通过在组合物中使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现可注射组合物的延长的吸收。

[0099] 短语“药学上可接受的”是指当施用于受试者(例如人)时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0100] 一般定义

[0101] 除非本文特别定义，否则本文使用的所有术语都具有与本公开内容领域技术人员所理解的相同的含义。从业者关于本领域的定义和术语特别参考Ausubel,F.M.等人

(eds.),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(2010),Coligan,J.E.等人(eds.),Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,New York(2010),Mirzaei,H.和Carrasco,M.(eds.),Modern Proteomics-Sample Preparation,Analysis and Practical Applications in Advances in Experimental Medicine and Biology,Springer International Publishing,2016,和Comai,L等人,(eds.),Proteomic:Methods and Protocols in Methods in Molecular Biology,Springer International Publishing,2017。

[0102] 为方便起见,在此提供了本文、说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语。提供这些定义是为了帮助描述特定的实施方案,并不旨在限制要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求书限制。

[0103] 在权利要求书中使用的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,尽管本公开内容支持仅指替代方案和“和/或”的定义。

[0104] 除非特别指出,否则当在权利要求或说明书中与词语“包含”结合使用时,词语“一个”和“一种”表示一个或多个/一种或多种。

[0105] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含”、“包括”等应以包含性的意义解释,而不是排他性或穷举性的意义,即表示,“包括但不限于”的意义。使用单数或复数的词语也分别包括复数和单数。此外,当在本申请中使用时,词语“此处”、“上文”和“下文”以及类似含义的词语应指本申请的整体而不是本申请的任何特定部分。词语“约”表示在所述参考数字之上或之下的微小变化范围内的数字。例如,在一些实施方案中,术语“约”是指高于和/或低于指定的参考数字的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的范围内的数字。

[0106] 如本文所用,术语“多肽”或“蛋白质”是指其中单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当氨基酸是α-氨基酸时,可以使用L-旋光异构体或D-旋光异构体,优选L-异构体。如本文所用的术语多肽或蛋白质涵盖任何氨基酸序列并且包括修饰的序列例如糖蛋白。术语多肽特别旨在涵盖天然存在的蛋白质,以及重组或合成产生的蛋白质。

[0107] 公开了可用于所公开的方法和组合物、可与所公开的方法和组合物结合使用、可用于制备所公开的方法和组合物、或者是所公开的方法和组合物的产品的材料、组合物和组分。应当理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组群等时,特别考虑了各种个体和集体组合中的每一种,即使对于这些化合物的各自和每一种单一组合和排列的具体提及可能没有明确披露。该概念适用于本公开内容的所有方面,包括但不限于所述方法中的步骤。因此,任何前述实施方案的特定元件可以组合或替代其他实施方案中的元件。例如,如果存在可以执行的多种额外的步骤,则应当理解,这些额外的步骤中的每一个都可以使用所公开方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合来执行,并且每个这样的组合或子集的组合被具体考虑并且应该被认为是公开的。此外,应当理解,本文描述的实施方案可以使用任何合适的材料来实施,例如本文别处描述的材料或本领域已知的材料。

[0108] 本文引用的出版物和引用它们的主题在此特别通过引用整体并入。

[0109] 提供以下实施例以说明本公开内容的某些特征和/或实施方案。该实施例不应被解释为将本发明限制于所描述的特定特征或实施方案。

实施例

[0110] 实施例1

[0111] 这个实施例描述了RIG-I信号传导途径的诱导使cccDNA不稳定并阻止肝细胞中形成新的cccDNA的证明，提供了根除cccDNA和相应的乙型肝炎病毒感染的策略。

[0112] 引言

[0113] 急性病毒感染通常触发细胞内固有免疫活化，导致细胞内抗病毒防御的诱导。该过程用于控制病毒复制和从感染部位扩散，并调节适应性免疫反应以进行全身性病毒控制。固有免疫活化通过宿主细胞感知嵌入病毒复制产物(包括病毒核酸)中的病毒病原体相关分子模式(PAMP)而发生。PAMP由细胞模式识别受体(PRR)感知。感知病毒感染的PRR包括Toll样受体(TLR)、NOD样受体(NLR)、细胞内DNA传感器cGAS、STING、IFI16、DAI等，以及RIG-I样受体(RLR)，包括视黄酸诱导基因-I(RIG-I)和黑色素瘤分化抗原5(MDA5)。每个PRR检测来源于传入病毒或病毒复制产物的特定PAMP，而某些在病毒感染期间产生的宿主细胞核酸也可以触发PRR信号传导。TLR、RLR或STING信号传导的诱导驱动包括干扰素调节因子(IRF)3和NF-κB在内的潜伏转录因子的下游活化，以促进抗病毒效应基因和免疫调节基因(包括趋化因子、IFN和其他免疫调节细胞因子)的表达。值得注意的是，原代人肝细胞(PHH)的急性HBV感染既不会活化也不会抑制固有免疫的PRR信号传导，因此强化了HBV是一种“隐形”病毒的概念，如先前在非人灵长类动物感染模型中体内显示的那样。

[0114] 先前的研究表明，响应PAMP RNA的RIG-I信号传导可以指导固有免疫活化和抗病毒防御，其抑制丙型肝炎病毒(HCV)的复制，HCV也会导致慢性肝炎。HCV PAMP是具有HCV基因组3’非翻译区的100nt聚尿苷/胞嘧啶(多聚U/UC)基序。当作为5’ppp合成RNA引入细胞时，多聚U/UC PAMP特异性活化RIG-I以驱动IRF3活化和抗病毒固有免疫，从而在体外抑制HCV感染并在体内活化肝固有免疫。此外，已鉴定结合并活化RIG-I或诱导IRF3活化和固有免疫的小分子苯并噻唑或5’ppp RNA配体在治疗上抑制RNA病毒感染并增强免疫反应。总之，这些研究表明，RIG-I途径在肝细胞中起作用，其中RIG-I的靶向活化赋予了在肝脏中完全起作用的有效抗病毒作用。然而，目前尚不清楚RIG-I和IRF3的直接靶向和活化如何影响HBV感染。

[0115] 在这里，在体外评估了靶向的RIG-I活化在治疗HBV感染中的作用。由多聚U/UC PAMP RNA或RIG-I的小分子活化剂触发的RIG-I信号传导指导强大的IRF3活化和RIG-I依赖性抗病毒作用以抑制cccDNA水平。结果表明，通过IRF3的RIG-I反应有助于降低cccDNA的半衰期($t_{1/2}$)以赋予cccDNA衰变动力学，并阻断RC DNA形成并伴随抑制异位表达人钠/牛磺胆酸盐协同转运多肽(hNTCP)的HepG2细胞(HepG2-hNTCP)中、在分化的HepaRG(dHepaRG)细胞中和原代人肝细胞(PHH)中的HBsAg分泌。靶向RIG-I不会促进细胞毒性。值得注意的是，当与治疗性核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)、恩替卡韦、多聚U/UC PAMP联合使用时，治疗迅速耗尽了已建立的cccDNA库。因此，靶向RIG-I活化和活化IRF3引导的固有免疫活化的过程为治愈HBV提供了新的和有效的治疗方法。

[0116] 结果

[0117] RIG-I和IRF3激动剂在肝细胞中触发固有免疫活化

[0118] IRF3的小分子激动剂先前已被鉴定，它赋予固有免疫活化，导致IRF3靶基因的诱导和针对一系列RNA病毒的抗病毒作用(Bedard,K.M.,等人.(2012).Isoflavone agonists

of IRF-3dependent signaling have antiviral activity against RNA viruses.Journal of virology 86,7334-7344;Pattabhi,S.,等人.(2016).Targeting Innate Immunity for Antiviral Therapy through Small Molecule Agonists of the RLR Pathway.Journal of virology 90,2372-2387;Probst,P.,等人.(2017).A small-molecule IRF3 agonist functions as an influenza vaccine adjuvant by modulating the antiviral immune response.Vaccine 35,1964-1971)。基于公开的结构US 9884876,制备(N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺),在此称为F7,用于分析抗HBV活性(图1A)。类似地,在HCV基因组中鉴定出约100nt PAMP基序,该基序包含5'ppp和病毒RNA的多聚U/UC区,该区域被RIG-I特异性识别并赋予IRF3活化的RIG-I信号传导,导致抗病毒基因表达(Saito,T.等人(2008).Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA.Nature 454,523-527;和Schnell,G.等人(2012).Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I.PLoS pathogens 8,e1002839(图1A,下图)。评估了F7和多聚U/UC PAMP针对HBV感染的治疗作用。首先,HepG2-hNTCP细胞用10μM F7或200ng/ml的配制在脂质体中的多聚U/UC PAMP处理24小时。对照细胞用DMSO处理或用仙台病毒(SenV;RIG-I依赖性信号传导的有效活化剂)进行感染,或用在脂质体中的200ng/ml X-RNA转染,一种来自HCV基因组的具有与多聚U/UC PAMP相似的质量的非PAMP/非信号传导性的含5'ppp的100nt RNA基序(Saito等人(2008),同上)。与SenV对照类似,F7和多聚U/UC PAMP但非DMSO和X RNA处理特异性诱导固有免疫活化,如IRF3易位进入细胞核所示的(图1B)。免疫印迹分析表明,F7和多聚U/UC PAMP但非XRNA处理在HepG2-hNTCP和dHepaRG细胞中以剂量依赖性方式特异性诱导IRF3磷酸化和IRF3靶基因IFIT1(Fensterl,V.,和Sen,G.C.(2011).The ISG56/IFIT1 gene family.Journal of interferon&cytokine research:the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 31,71-78;以及Fensterl,V.,和Sen,G.C.(2015).Interferon-induced Ifit proteins:their role in viral pathogenesis.Journal of virology 89,2462-2468)的表达(图1C)。还评估了一组固有免疫反应基因(包括IFN、ISG和直接IRF3靶基因)响应F7或多聚U/UC PAMP的mRNA表达(图1D;图8A-8L)。虽然多聚U/UC PAMP处理也诱导I型和III型IFN和ISG表达,但F7处理仅诱导IRF3靶基因表达。这种差异与每个分子的信号传导特性和IFN表达的性质是一致的,因为IFN表达依赖于IRF3和NF-kB的活化,而F7特异性活化IRF3而不活化NF-kB(Bedard等人(2012),同上)。相反,多聚U/UC PAMP触发两种转录因子的RIG-I信号传导以诱导IRF3靶基因、IFN和因此ISG(Saito,T.等人.(2008),同上;Schnell,G.等人.(2012),同上)。值得注意的是,由多聚U/UC PAMP处理诱导的I型IFN、SAMHD1、APOBEC3A和APOBEC3G已证明针对HBV感染的抗病毒活性(Bonvin,M.,等人.(2006).Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication.Hepatology(Baltimore,Md)43,1364-1374;Chen,Z.,等人.(2014).Inhibition of Hepatitis B virus replication by SAMHD1.Biochemical and biophysical research communications 450,1462-1468;Lucifora,J.,等人.(2014).Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA.Science(New

York,NY)343,1221-1228)。总之,这些结果表明F7和多聚U/UC PAMP在处理的细胞中诱导固有免疫活化,其始于IRF3活化和IRF3靶基因的诱导。

[0119] IRF3活化抑制HBV cccDNA形成

[0120] 为了确定IRF3活化如何影响HBV感染和被感染的细胞中cccDNA的产生,在HBV感染后用F7或多聚U/UC PAMP(100ng/ml[=2.94nM]或200ng/ml[=5.87nM])处理HepG2-hNTCP细胞。环孢菌素A(CsA)处理被用作HBV进入抑制剂抗病毒对照(Watashi,K.等人.(2014).Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter,sodium taurocholate cotransporting polypeptide(NTCP).Hepatology(Baltimore,Md)59,1726-1737)。感染后3天(dpi)收获细胞并使用用于分离无蛋白质DNA的Hirt提取方法制备提取物,如图2A所示(Guo,H.等人.(2007).Characterization of the Intracellular Deproteinized Relaxed Circular DNA of Hepatitis B Virus:an Intermediate of Covalently ClosedCircular DNA Formation.Journal of Virology 81,12472-12484;Hirt,B.(1967).Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.Journal of molecular biology 26,365-369)。Southern印迹分析显示,与DMSO或X-RNA处理的对照的表达水平相比,F7和多聚U/UC PAMP处理抑制了HBV cccDNA的形成。此外,通过F7或多聚U/UC PAMP处理,无蛋白质松弛环状(PF-RC)DNA(cccDNA的前体)的水平也显著降低。由于F7和多聚U/UC PAMP都活化IRF3,这些结果将IRF3反应与HBV感染的肝细胞中cccDNA形成的抑制联系起来。

[0121] 为了进一步确定IRF3的活化如何影响HBV复制周期,在感染/处理时间进程中分析了病毒DNA、病毒RNA、细胞外HBV DNA和分泌的HBsAg的表达。如图9A所示,PF-RC DNA首先在1dpi检测到。在对照处理的细胞中,cccDNA合成发生在2dpi,并且PF-RC和cccDNA都在20dpi的时间进程中积累。然而,在2dpi内用F7或多聚U/UC PAMP处理的细胞中cccDNA的产生受到显著抑制。整个感染/处理时间进程中pgRNA的产生表明它从6dpi到20dpi在未处理对照细胞中积累,但在用F7或多聚U/UC PAMP处理的细胞中被显著抑制(图9B)。还测量了在HBV感染/处理时间进程中产生的与衣壳相关的细胞内HBV DNA逆转录中间体的水平。发现松弛环状(RC)DNA、双链线性(DL)DNA和单链(SS)DNA产物从6dpi到20dpi在对照/未处理细胞中积累。然而,F7或多聚U/UC PAMP处理显著降低了这些DNA种类的水平。有趣的是,传入的病毒衣壳相关HBV DNA的水平(从1-2dpi观察)不受处理的影响,而是在6dpi内它们的产生受到抑制(图9C)。总体上HBV DNA和RNA的抑制与用F7或多聚U/UC PAMP处理的细胞的培养上清液中分泌的HBsAg水平的显著降低相关(图9D)。重要的是,F7和多聚U/UC PAMP处理均导致从头HBV产生的阻滞,其由细胞外HBV DNA的减少揭示(图9E)。这些结果表明,F7和多聚U/UC PAMP处理在cccDNA合成后的步骤中影响HBV复制,从而影响病毒RNA的转录、逆转录的HBV DNA和后代病毒粒子的产生。

[0122] 为了评估F7和多聚U/UC PAMP对HBV的抗病毒活性,进行了剂量反应分析。为了确定90%的最大抑制浓度(IC_{90})和半最大抑制浓度(IC_{50})的值,以及F7和多聚U/UC PAMP的细胞毒性浓度CC_{50},使用了两种不同的细胞系,HepG2-hNTCP和dHepaRG细胞。用增加浓度的F7或多聚U/UC处理培养物,然后进行HBV感染,然后在3dpi时收获。Southern印迹和qPCR分析表明,随着F7(图2B和2C)和多聚U/UC PAMP(图2D和2E)浓度的增加,cccDNA水平线性降低。

在HepG2-hNTCP细胞中，F7的IC_{90}和IC_{50}值定义为约17.38μM和8.48μM，在分化的HepaRG细胞中定义为12.84μM和3.38μM。50％细胞毒性浓度(CC_{50})(通过处理的细胞的ATP释放测量)超过40μM(图10A和10B)。多聚U/UC PAMP的IC_{90}和IC_{50}值在HepG2-NTCP细胞中分别测定为约11.97nM和1.94nM，在dHepaRG细胞中分别为3.3nM和1.61nM，CC_{50}超过23.49nM(＝800ng/ml)(图10C和10D)。

[0123] 从头HBV cccDNA合成的抑制

[0124] 为了进一步确定F7和多聚U/UC对cccDNA生物合成的抑制作用，在HepG2-hNTCP和dHepaRG细胞中进行了添加时间实验。对于多聚U/UC PAMP，进行了感染前24小时(处理前)、1至3dpi(处理后)以及感染前24小时直到3dpi(处理前/处理后)的处理(图3A)。对于F7，进行了感染前24小时(处理前)、感染时开始24小时(处理时)、从1dpi到3dpi(处理后)或在感染前24小时开始处理并持续到3dpi(处理前/时/后)的处理(图3D)。包括CsA与病毒接种的同时处理作为阳性对照。用HBV接种培养物并在所述时间进程中收获培养物以用于使用Southern印迹和qPCR分析评估cccDNA水平。值得注意的是，发现在HepG2-hNTCP和HepaRG细胞中，在多聚U/UC PAMP方案中cccDNA的合成一致地受到显著抑制，并达到与CsA处理相似的水平(图3B和3C)。相比之下，F7在处理前或处理时施用一次时对HBV cccDNA水平几乎没有影响，但在感染后或从感染前到整个3天过程中施用时介导cccDNA水平的显著抑制(图3D-3F)。这些结果表明，多聚U/UC PAMP诱导固有免疫反应，其影响HBV感染后立即和持续的cccDNA合成，而F7指导影响病毒进入后的cccDNA合成的固有免疫反应。

[0125] IRF3激动剂的抗病毒作用分配到细胞核以抑制cccDNA合成

[0126] 为了确定受F7和多聚U/UC PAMP处理影响的HBV cccDNA合成的一个或多个步骤，我们在3dpi的时间进程中评估了cccDNA的水平。在4℃下用HBV接种细胞6小时，然后取出接种物，冲洗细胞并置于37℃培养基中以开始同步感染(时间0)，此时用F7(图4A)或多聚U/UC PAMP(图4C)处理细胞直至3dpi。在感染后3小时和6小时以及超过1-3dpi的时间进程中每天收获全细胞(W)、细胞核(N)和细胞质(C)提取物，并通过Southern印迹分析PF-RC和cccDNA丰度。如图4B所示，PF-RC DNA在感染后3小时(hpi)后在细胞质和全细胞裂解液级分中检测到，并在6hpi时在细胞核级分中检测到，但在F7处理2-3dpi后积累减少。在未处理的细胞中在1dpi检测到cccDNA，但在用F7处理的细胞中cccDNA积累延迟并减少。对于多聚U/UC PAMP处理，也在相似的时间进程中收获细胞(参见图4C)。对亚细胞级分中的HBV DNA的评估还表明，PF-RC DNA在3和6hpi早期存在于未处理细胞的全细胞和细胞质提取物中，其后水平在细胞核级分中积累。用多聚U/UC PAMP处理的细胞中细胞核PF-RC DNA水平从1-3dpi降低，伴随处理的细胞中cccDNA的减少(图4D)。这些结果表明，F7和多聚U/UC对HBV cccDNA生物合成的抑制作用在处理期间在1-3dpi发生在细胞核中，可能会影响HBV复制过程早期的PF-RC DNA向cccDNA的转化步骤。

[0127] IRF3活化单独和与ETV组合地限制HBV cccDNA的稳定性

[0128] 为了确定宿主对IRF3活化的反应如何抑制HBV cccDNA水平，评估了F7或多聚U/UC PAMP单一处理以及ETV/F7或ETV/多聚U/UC PAMP的组合对cccDNA衰变动力学的影响。为了评估cccDNA衰变，将HBV感染的细胞的F7和多聚U/UC PAMP处理与恩替卡韦(ETV)处理进行了比较，从3dpi开始，通过用新鲜ETV、F7或多聚U/UC PAMP每天更换培养基维持处理至20dpi(图5A)。ETV是一种核苷类似物，其防止病毒逆转录和复制新合成的HBV DNA，从而防

止通过从头形成补充cccDNA。ETV以100倍的IC_{50}应用于HBV感染的培养物(Langley,D.R.等人(2007).Inhibition of Hepatitis B Virus Polymerase by Entecavir.Journal of virology 81,3992-4001),从而允许在仅维持来自初始cccDNA库的水平的条件下测量cccDNA半衰期。然后在处理时间进程中收获细胞,并通过Southern印迹和qPCR测定分析DNA提取物。如图5B所示,在未处理的对照细胞中,cccDNA水平随着感染时间进程适度增加。来自ETV处理的培养物的细胞在整个时间进程中稳定地将cccDNA水平保持在与3dpi培养物相似的水平,表明在我们的体外培养系统中持续和稳定的超过20dpi的cccDNA,与报道的超过40天的cccDNA半衰期($t_{1/2}$)一致(图11,(Huang,Q.等人(2020).Rapid Turnover of HBV cccDNA Indicated by Monitoring Emergence and Reversion of Signature-Mutation in Treated Chronic Hepatitis B Patients.Hepatology;Ko,C.等人(2018).Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels.J Hepatol 69,1231-1241)。然而,如通过Southern印迹分析测量的,F7单一处理刺激了cccDNA的衰变(图5B)。通过F7处理增强的cccDNA衰变动力学也通过RT-PCR分析得到证实(图5D)。F7单一处理降低了cccDNA的$t_{1/2}$,而ETV与F7的组合进一步增强了它们的抗病毒作用以在20dpi时减少cccDNA丰度和持续存在达到几乎无法检测到的水平(图5B和5D)。还发现,如通过Southern印迹分析的,单次施用多聚U/UC PAMP的单一处理降低了cccDNA丰度,而它继续在用X RNA对照处理的细胞中积累(图5C)。qPCR测定也证实了多聚U/UC PAMP对cccDNA水平的抑制作用(图5D)。还发现,与单独的ETV或多聚U/UC PAMP相比,多聚U/UC PAMP与ETV组合降低cccDNA丰度和在整个处理时间进程中的持久性,其中在同时处理后在20dpi后几乎无法检测到cccDNA(图5C)。数学模型显示,与每种各自的同时处理相比,F7或多聚U/UC处理与ETV的组合使单一处理产生的cccDNA $t_{1/2}$从平均8.7天减少到6.5天(F7)和从7.7天减少到6.9天(多聚U/UC PAMP)(图5E和表2)。细胞的ETV和X RNA处理都对HBsAg的产生和分泌没有任何影响。然而,多聚U/UC PAMP和F7单一和联合处理抑制HBsAg分泌(图5F)。因此,F7和多聚U/UC PAMP赋予已建立的cccDNA的治疗性衰减。此外,F7和多聚U/UC PAMP与ETV的联合处理赋予加性抗病毒作用以抑制cccDNA $t_{1/2}$并持续数周(Huang,Q.等人(2020),同上;Ko,C.,等人(2018),同上)到少于7天。

[0129] 表2:从处理下cccDNA的衰变动力学估计的cccDNA的半衰期($t_{1/2}$)和cccDNA开始减少之前的延迟(τ)。

[0130]

处理	参数值	95%置信区间
F7		
$t_{1/2}$ (天)	8.7	[7.2, 14.0]
τ (天)	4.0	[1.4, 6.6]
F7+ETV		
$t_{1/2}$ (天)	6.5	[5.5, 8.5]
τ (天)	3.7	[1.6, 5.8]
多聚U/UC PAMP		
$t_{1/2}$ (天)	7.7	[7.4, 9.8]
τ (天)	3.8	[2.4, 5.2]
多聚U/UC PAMP+ETV		
$t_{1/2}$ (天)	6.9	[5.8, 10.5]
τ (天)	2.6	[1.0, 4.3]

[0131] IRF3活化对HBV cccDNA的抑制是RIG-I依赖性的

[0132] 为了确定HBV感染的细胞中通过F7或多聚U/UC PAMP处理实现的IRF3的活化和cccDNA的抑制是否依赖于RIG-I,而不是作为IRF3激动剂处理的脱靶效应发生,使用CRISPR/Cas9基因组编辑技术产生了表达非靶向指导RNA(HepG2-hNTCP-NT),或用于敲除(KO)RIG-I表达(HepG2-hNTCP-RKO)或MDA5(HepG2-hNTCP-MKO)的指导RNA的HepG2-hNTCP细胞。不同细胞群的免疫印迹分析表明,HepG2-hNTCP-RKO或HepG2-hNTCP-MKO细胞分别不表达可检测水平的RIG-I或MDA5(图12)。用F7(图6A)或多聚U/UC PAMP(图6B)处理细胞表明HepG2-hNTCP-RKO细胞对处理没有反应,而HepG2-hNTCP-NT对照细胞和HepG2-hNTCP-MKO细胞完全响应F7以积累磷酸化/活化的IRF3,同时伴随IFIT1的表达。HepG2-hNTCP-MKO细胞用作RLR KO对照以揭示F7和多聚U/UC PAMP对触发RIG-I依赖性IRF3活化的特异性(Saito等人(2008),同上)。接下来,用HBV感染每个细胞群,然后在1dpi用F7或多聚U/UC PAMP进行单次处理。在3dpi时收获细胞用于cccDNA水平的Southern印迹分析。每个细胞群的平行培养物用DMSO或单剂量X-RNA(阴性对照)或用CsA作为处理对照进行处理。F7处理降低了HepG2-hNTCP-NT和HepG2-hNTCP-MKO细胞中但非HepG2-hNTCP-RKO细胞中的cccDNA水平(图6C)。类似地,多聚U/UC PAMP抑制cccDNA依赖于RIG-I,因为在HepG2-hNTCP-NT和HepG2-hNTCP-MKO细胞中,cccDNA被多聚U/UC PAMP处理抑制,但在HepG2-hNTCP-RKO细胞中则没有(图6D)。这些结果表明,F7和多聚U/UC PAMP对HBV的抗病毒作用特异性地通过RIG-I发出信号,将各自定义为活化IRF3以抑制cccDNA的RIG-I激动剂。

[0133] IRF3活化的RIG-I信号传导抑制原代人肝细胞中的HBV感染

[0134] 为了验证通过多聚U/UC PAMP的IRF3活化的RIG-I信号传导的抗病毒作用,在将肝细胞标记基因的表达保持在与人肝脏组织相当的水平的非永生化和终末分化的原代人肝细胞(PHH)中评估了HBV感染。通过多聚U/UC PAMP剂量反应处理PHH培养物并评估固有免疫活化。用50-200ng/ml多聚U/UC PAMP处理PHH培养物诱导IRF3活化,其标志是磷酸丝氨酸386IRF3和IFIT1表达的积累。用100ng/ml X-RNA处理不会诱导PHH的固有免疫活化,但细胞对使用SenV对照的急性感染完全有反应(图7A),这表明PHH具有完整的RIG-I途径。此外,使用多聚U/UC PAMP而不是X-RNA的PHH处理强烈诱导固有免疫基因表达(图7B)。然后在用多聚U/UC PAMP处理的HBV感染的PHH中评估cccDNA水平。用HBV感染PHH培养物,并在1dpi时用多聚U/UC PAMP进行单次处理。在3dpi时收获细胞,提取DNA并进行Southern印迹分析。如图7C所示,使用多聚U/UC PAMP的处理将被感染的PHH中的cccDNA水平抑制到与CsA处理相似的水平。因此,触发IRF3的RIG-I信号传导和固有免疫活化的多聚U/UC处理指导HBV感染的PHH中抑制cccDNA的反应。这些结果证明了靶向RIG-I途径的治疗剂在HBV感染的相关原代细胞中控制病毒的功效。

[0135] 讨论

[0136] cccDNA在HBV感染的肝细胞核中的持久性是介导慢性HBV感染的关键,其中最近的分析表明,给定的cccDNA库在体内的$t_{1/2}$为约5-21周(Huang,Q.等人(2020),同上)。有问题的是,目前治疗慢性HBV感染的疗法既没有显著减少也没有消除cccDNA(Maynard,M.,等人(2005).Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure.J Hepatol42,279-281;Werle-Lapostolle,等人(2004).Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy.Gastroenterology 126,1750-1758;Zoulim,F.,and Durantel,D.(2015).Antiviral therapies and prospects for a cure of chronic hepatitis B.Cold Spring Harb Perspect Med 5)。HBV治疗剂的当前核苷类似物类别的成员被长期施用,通常是终生施用,以保持患者的病毒抑制。此外,这些疗法在完全关闭病毒复制的能力方面存在漏洞,因此细胞核cccDNA库(Huang,Q.等人(2020),同上)在长期治疗后仍然存在(Gish,R.等人(2012).Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance.Lancet Infect Dis 12,341-353;Werle-Lapostolle等人(2004),同上;Zoulim,F.,和Locarnini,S.(2009).Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues.Gastroenterology 137,1593-1608.e1591-1592),然而,重要的是,已经证明在急性HBV感染期间抑制cccDNA可以通过与APOBEC3脱氨酶的表达相关的由IFN-α、IFN-γ或肿瘤坏死因子-α指导的细胞因子驱动的非溶细胞机制发生(Lucifora等人(2014)同上;Xia,Y.等人(2016).Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form,cccDNA,Without Cytolysis.Gastroenterology 150,194-205)。肝内细胞因子反应的药理学诱导已被认为是慢性乙型肝炎的理想治疗方法(Chang,J.等人(2012).The innate immune response to hepatitis B virus infection:implications for pathogenesis and therapy.Antiviral research 96,405-413)。虽然这种方法利用由特定细胞因子驱动的固

有免疫和免疫调节信号传导程序来诱导其作用可以抑制cccDNA的基因的表达,但用于治疗慢性HBV的细胞因子疗法面临着来自广泛脱靶(细胞因子治疗的非肝作用)的全身毒性的障碍(Kwon,H.,和Lok,A.S.(2011).Hepatitis B therapy.Nature reviews Gastroenterology&hepatology 8,275-284;Locarnini,S.等人(2015).Strategies to control hepatitis B:Public policy,epidemiology,vaccine and drugs.Journal of hepatology 62,S76-86),从而强调了也可以与当前针对HBV的NA疗法相结合的靶标引导治疗策略的需要。

[0137] 这里证明了靶向RIG-I和RLR途径以活化IRF3(使用递送至肝细胞的RIG-I的F7小分子和多聚U/UC PAMP激动剂作为概念证明)指导了通过IRF3的特定的RIG-I依赖性固有免疫反应,其在HBV感染的细胞培养模型中有效抑制HBV cccDNA。此外,机制研究表明,施用F7或多聚U/UC PAMP抑制cccDNA的从头生物合成并增强cccDNA降解,而不是像当前的NA HBV药物那样抑制新合成的HBV rcDNA的产生。F7和多聚U/UC PAMP的施用诱导IRF3活化和IRF3靶基因的表达(图1A-1D)。因此,F7和多聚U/UC PAMP抑制cccDNA的潜在机制可能涉及IRF3靶基因的作用以阻断cccDNA合成并赋予促进cccDNA的去稳定和降解以从被感染的细胞中耗尽它的作用。值得注意的是,F7处理细胞不诱导I型或III型IFN的表达,因为这类化合物的RIG-I活化特性不会将信号传递给NF-kB,而是专门活化下游IRF3(Bedard等人(2012),同上;Probst等人(2017),同上)。因此,在F7的情况下,抑制cccDNA的抗病毒作用独立于IFN作用但通过IRF3反应基因发挥作用。这些结果表明,多聚U/UC PAMP还诱导强大的IRF3靶基因表达以及可诱导ISG的低水平IFN。其中包括APOBEC3基因,已知的抗HBV复制的抗病毒效应物(Bonvin等人(2006).Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication.Hepatology(Baltimore,Md)43,1364-1374;Turelli,P.等人(2004).Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G.Science303,1829)。IRF3活化驱动各种免疫调节细胞因子和趋化因子的表达和产生,包括CXCL10,一种T细胞的化学引诱物(Sankar,S.等人(2006).IKK-i signals through IRF3 and NFkappaB to mediate theproduction of inflammatory cytokines.Cell Signal 18,982-993;Zhai,Y.等人(2008).CXCL10 regulates liver innate immune response against ischemia and reperfusion injury.Hepatology 47,207-214),以及指导调节泛素化的因子的表达(Maelfait,J.,和Beyaert,R.(2012).Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling.Microbiol Mol Biol Rev 76,33-45)和多种细胞信号传导过程(Zhou,Y.等人(2017).Post-translational regulation of antiviral innate signaling.Eur J Immunol 47,1414-1426)。因此,除了APOBEC基因的已知作用外,IRF3靶基因被提出包括多种抗cccDNA效应物。然后,这些效应基因赋予多效性作用以i)抑制cccDNA扩增,和ii)使cccDNA不稳定和/或增强cccDNA降解。事实上,当用F7或多聚U/UC PAMP处理细胞时,观察到cccDNA $t_{1/2}$显著降低,而当细胞与其中任何一种加恩替卡韦共同处理时,这种降低进一步增强。此外,对于多聚U/UC PAMP,针对cccDNA的抗病毒作用还可能包括由低水平IFN诱导指导的IFN介导的作用(Isorce,N.等人(2016).Antiviral activity of various interferons and pro-inflammatory cytokines in non-transformed cultured hepatocytes infected with hepatitis B virus.Antiviral research 130,36-45;

Lucifora,J.等人(2014),同上;Phillips,S.等人(2017).Peg-Interferon Lambda Treatment Induces Robust Innate and Adaptive Immunity in Chronic Hepatitis B Patients.Frontiers in Immunology 8;Robek,M.D.等人(2005).Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication.Journal of Virology 79,3851-3854;Xu,F.等人(2018).Type III interferon-induced CBFβinhibits HBV replication by hijacking HBx.Cellular&Molecular Immunology)。有趣的是,与用F7处理相比,用多聚U/UC PAMP处理产生的IFN和特定ISG的这些作用可能有助于抑制cccDNA,导致半衰期适度缩短。从机制上讲,提出F7和多聚U/UC PAMP的抗病毒作用可能还包括改变细胞DNA修复机制,否则这些机制有助于cccDNA生物合成。由于HBV利用宿主DNA修复因子来修复RC-DNA的不连续性并将其转化为允许转录的cccDNA,已知几种参与cccDNA代谢的细胞DNA修复蛋白,包括TDP2(Koniger,C.等人(2014).Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111,E4244-4253),DNA连接酶(Long,Q.等人(2017).The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation.PLoS pathogens 13,e1006784),DNA拓扑异构酶(Sheraz,M.等人(2019).Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA.Journal of virology 93)和DNA聚合酶(polα,λ,κ)(Qi,Y.等人(2016).DNA Polymerase kappa Is a Key Cellular Factor for the Formation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Virus.PLoS pathogens 12,e1005893;Tang,L.等人(2019).DNA Polymerase alpha is essential for intracellular amplification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA.PLoS pathogens 15,e1007742)可能是受RIG-I/IRF3信号调节的候选者。

[0138] 目前的研究表明,RIG-I和IRF3可以被特异性靶向以活化RLR固有免疫程序用于通过抑制cccDNA来控制HBV感染,与没有治疗的情况下的数周或数月相比,将$t_{1/2}$减少到数天。因此,靶向固有免疫和RLR途径为针对HBV的新的抗病毒疗法提供了一种有效策略,其可以单独提供或与NA联合用于HBV治疗。确定由导致cccDNA消耗的RIG-I和IRF3指导的固有免疫靶点将有助于深入了解这些新型候选药物对HBV治愈的作用机制和独特的抗病毒特性。

[0139] 方法和材料

[0140] 表3:PCR资源。

[0141]

No	寡核苷酸名称	序列(5'→3') (SEQ ID NO: 在括号中)
1	HBV cccDNA Fwd	GCCTATTGATTGGAAAGTATGT (2)
2	HBV cccDNA Rev	GCTGAGGCGGTATCTA (3)
3	HBV pgRNA Fwd	CTCCTCCAGCTTATAGACC (4)
4	HBV pgRNA Rev	GTGAGTGGGCCTACAAA (5)
5	IFIT1 Fwd	AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA (6)
6	IFIT1 Rev	CTGAAACCGACCATAGTGGAAAT (7)
7	IFITM1 Fwd	TACTCCGTGAAGTCTAGGGACAG (8)
8	IFITM1 Rev	AACAGGATGAATCCAATGGTCA (9)
9	CXCL10 Fwd	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC (10)
10	CXCL10 Rev	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT (11)
11	RSAD2 Fwd	CGTGAGCATCGTGAGCAATG (12)
12	RSAD2 Rev	TCTTCTTTCCTTGGCCACGG (13)
13	RIG-I Fwd	Qiagen SABiosciences # PPH20774A
14	RIG-I Rev	

[0142]

15	MDA5 Fwd	Qiagen SABiosciences # PPH18927A
16	MDA5 Rev	
17	IFNα Fwd	TGCACCGAACTCTACCAGCA (14)
18	IFNα Rev	GTTTCTCCCACCCTCTCCTCC (15)
19	IFNβ Fwd	Qiagene SABiosciences # PPH00384F
20	IFNβ Rev	
21	IFNγ Fwd	Qiagene SABiosciences # PPH00380C
22	IFNγ Rev	
23	IFNλ3 Fwd	AAGGACTGCAAGTGCCGCT (16)
24	IFNλ3 Rev	GCTGGTCCAAGACATCCC (17)
25	SAMHD1 Fwd	TCACAGGCGCATTACTGCC (18)
26	SAMHD1-Rev	GGATTTGAACCAATCGCTGGA (19)
27	APOBEC3A Fwd	GAGAAGGGACAAGCACATGG (20)
28	APOBEC3A Rev	TGGATCCATCAAGTGTCTGG (21)
29	APOBEC3G Fwd	CCGAGGACCCGAAGGTTAC (22)
30	APOBEC3G Rev	TCCAACAGTGCTGAAATTCG (23)
31	GAPDH Fwd	ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG (24)
32	GAPDH Rev	GCCATCACGCCACAGTTTC (25)
33	MT-CO3* Fwd	CCCCACAAACCCCATTACTAAACCCA (26)
34	MT-CO3* Rev	TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG (27)

[0143] *MT-CO3:线粒体细胞色素c氧化酶亚基3

[0144] 实验模型和主题细节

[0145] 细胞培养:将稳定表达人肝癌细胞系C3A的人NTCP(HepG2的一个亚克隆)维持在补充了10%热灭活FBS、1x Glutamax(GIBCO)、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中,并用含有1μg/ml嘌呤霉素的培养基进行选择/扩增,如前所述(Guo,F.等人(2017).HBV core protein allosteric modulators differentially alter cccDNA biosynthesis from de novo infection and intracellular amplification pathways.PLoS pathogens 13,e1006658;Ko,C.等人(2014a).DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Is a Host Factor That Restricts Hepatitis B Virus Replication at the Transcriptional Level.Journal of virology 88,13689-13698)。支持以四环素(TET)诱导方式产生HBV的HepAD38细胞系如前所述进行维持(Watashi,K.等人(2013).Interleukin-1and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase(AID).The Journal of Biological Chemistry 288,31715-31727)。人肝祖细胞HepaRG细胞系在补充有10%FBS、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、氢化可的松21-半琥珀酸盐(Cayman)、人胰岛素(Sigma)和1 x Glutamax(GIBCO)的完全William's E培

养基中进行培养(Gripon,P.等人(2002).Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99,15655-15660)。从具有用PHH重构的人源化肝脏的嵌合小鼠中新鲜分离原代人肝细胞。将回收的PHH在补充有10％热灭活FBS、15μg/ml L-脯氨酸、25ng/ml胰岛素、50nM地塞米松、5ng/ml EGF和0.1mM L-抗坏血酸2-磷酸盐的DMEM中培养，如前所述(Ishida,Y.等人(2015).Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice.The American journal of pathology 185,1275-1285)。

[0146] 使用CRISPR系统生成HepG2-hNTCP-NT/RIG-I/MDA5 KO细胞系：为了表达人牛磺胆酸钠共转运多肽(hNTCP)，从dHepaRG细胞制备的cDNA克隆中扩增基因编码序列。通过PCR扩增添加羧基末端C9标签。用20μg/ml杀稻瘟素选择转导的细胞，并针对支持HBV感染的能力筛选生长最好的单细胞克隆。对于CRISPR/Cas介导的基因敲除，使用Benchling(Biology Software,2017,https://benchling.com)的CRISPR工具设计了指导RNA(gRNA)序列。使用In-Fusion克隆试剂盒(Takara)将gRNA靶寡核苷酸克隆到Cas9-t2a-pRRL慢病毒载体中。用于基因敲除的gRNA序列是gRIG-I:5’-GGGTCTTCCGGATATAATCC-3’(SEQ ID NO:28)和gMDA5:5’-GTGGTTGGACTCGGGAATTCG-3’(SEQ ID NO:29)(Esser-Nobis,K.等人(2019).Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity.Journal of virology 93)。转导后，在使用10μg/ml嘌呤霉素的连续选择下维持细胞，并通过蛋白质印迹确认敲除。

[0147] 方法细节

[0148] HBV感染：通过PEG浓度和随后的蔗糖梯度从HepAD38细胞的上清液中纯化HBV(基因型D)，如前所述(Ko,C.等人(2014).DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Is a Host Factor That Restricts Hepatitis B Virus Replication at the Transcriptional Level.Journal of Virology 88,13689-13698;Watashi,K.等人(2013)，同上)。对于HBV感染，将细胞接种到胶原蛋白包被的平板中。一天后，在含有4％聚乙二醇8000(PEG-8000)的DMEM中用HBV感染细胞。在每个图例中标明了感染复数(表示为病毒基因组当量/细胞)。24小时后取出接种物，将被感染的培养物保持在含有2.5％DMSO的完全DMEM中直至收获，如前所述(Ni,Y.等人(2014).Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes.Gastroenterology 146,1070-1083)。

[0149] 试剂：F7是一种基于在IRF3激动剂的高通量筛选中鉴定的苯并噻唑核心结构的小分子(US9884876;Probst等人(2017)，同上)。F7(N-(6-苯甲酰氨基-1,3-苯并噻唑-2-基)萘-2-甲酰胺)(参见图1A)结构获自US 9884876并由Medchem Source,Inc.从头合成，用于本发明的研究。如前所述生成仙台病毒(SenV)株Cantell的工作储备液(Loo,Y.M.等人(2008).Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity.Journal of virology 82,335-345)。Mirus Trans-IT mRNA转染试剂用于使用X-RNA和PAMP-RNA处理细胞。环孢菌素A(C1832)和恩替卡韦(SML1103)购自Sigma Aldrich。

[0150] 体外转录：多聚U/UC PAMP-RNA和X-RNA各自由用于多聚U/UC PAMP RNA(正向：5’-

TAATACGACTCACTATAGGCCATCCTGTTTTTTTTCCCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTTTTTTTTTTCCTCTTTTTTTTCCTTTTCTTTCCTTT-3’(SEQ ID NO:30),反向:5’-AAAGGAAAGAAAAGGAAAAAAAAGAGGAAAAAAAAAAGGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAGGGAAAAAAAACAGGATGGCCTATAGTGAGTCGTATTA-3’(SEQ ID NO:31))和X-RNA(正向:5’-TAATACGACTCACTATAGGTGGCTCCATCTTAGCCCTAGTCACGGCTAGCTGTGAAAGGTCCGTGAGCCGCTTGACTGCAGAGAGTGCTGATACTGGCCTCTCTGCAGATCAAGT-3’(SEQ ID NO:32),反向:5’-ACTTGATCTGCAGAGAGGCCAGTATCAGCACTCTCTGCAGTCAAGCGGCTCACGGACCTTTCACAGCTAGCCGTGACTAGGGCTAAGATGGAGCCACCTATAGTGAGTCGTATTA-3’(SEQ ID NO:33))的T7启动子连接的互补寡核苷酸合成,如前所述(Kell,A.等人(2015).Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition of Hepatitis C Virus Transmitted/Founder Variants by RIG-I Is Dependent on U-Core Length.Journal of Virology 89,11056-11068;Saito,T.等人(2008),同上)。根据制造商的说明,使用T7 RNA聚合酶和T7 MEGAshortscript试剂盒(Ambion)生成RNA产物。使用梯度PCR程序(95℃2分钟,温度逐渐降低1℃/30秒至50℃)将10μg寡核苷酸混合物退火。退火后,如制造商所述,将反应混合物组装在具有7.5mM的每种核苷酸、10x反应缓冲液、2μg模板DNA和T7酶的无RNA酶的微量离心管中,并在37℃下孵育反应4小时以允许体外转录。然后使用Turbo DNA酶处理去除DNA模板,并通过苯酚-氯仿提取去除未掺入的核苷酸和蛋白质。如制造商所述,通过使用乙醇和乙酸铵沉淀RNA,并重新悬浮在无核酸酶的水中。使用Nanodrop分光光度计通过吸光度测定RNA浓度。在变性2%甲醛琼脂糖凝胶上评估RNA质量和纯度。

[0151] 逆转录定量实时qPCR(RT-qPCR)分析:使用TRIZOL试剂和制造商的方案(Invitrogen)从细胞中提取总细胞RNA。使用iScript select cDNA合成试剂盒(Biorad,Inc.)通过随机和寡核苷酸(dT)引发从纯化的RNA合成cDNA。对于HBV cccDNA表达分析,使用DNeasy试剂盒(QIAGEN)提取总DNA。对于选择性cccDNA PCR分析,分离的DNA在37℃的10μl反应体积中用10单位的T5外切核酸酶(NEB)处理30分钟,然后在95℃下热灭活5分钟并用无核酸酶的水稀释4倍。对于细胞外HBV DNA定量,使用外部HBV质粒标准品对PCR进行编程(Ko,C.,等人(2018),同上)。通过使用ΔΔCT方法进行的RT-qPCR定量所有靶基因的相对mRNA水平,并将表达水平标准化至管家基因。使用Applied Biosystems 7300热循环仪进行的SYBR green方法(Applied Biosystems)进行实时PCR测定。表3提供了用于人类和HBV基因的RT-qPCR分析的引物序列信息。

[0152] HBV DNA的Southern印迹分析:对从细胞质病毒衣壳中分离的DNA进行Southern印迹分析,完全如前所述(Ko,C.等人(2014).DDX3DEAD-Box RNA Helicase Is a Host Factor That Restricts Hepatitis BVirus Replication at the Transcriptional Level.Journal of Virology 88,13689-13698;Ko,C.等人(2014b).Residues Arg703,Asp777,and Arg781 of the RNase H Domain of Hepatitis B Virus Polymerase Are Critical for Viral DNA Synthesis.Journal of Virology 88,154-163)。为了检测无蛋白质形式的HBV-DNA,包括cccDNA,使用了一种改进的Hirt提取方法,如前所述(Cai,D.等人(2013).A southern blot assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA from cell cultures.Methods in Molecular Biology(Clifton,NJ)1030,151-161;Guo,H.等人(2007).Characterization of the Intracellular

Deproteinized Relaxed Circular DNA of Hepatitis B Virus:an Intermediate of Covalently Closed Circular DNA Formation.Journal of Virology 81,12472-12484)。用质粒安全的ATP依赖性DNA酶(Epicentre)消化Hirt提取的无蛋白质DNA制剂。提取的病毒DNA形式在1.2％琼脂糖凝胶上分离,通过向上毛细管转移来转移到带正电荷的尼龙膜(GE Healthcare,Amersham),然后与地高辛标记的HBV特异性DNA探针杂交。通过DIG发光检测试剂盒(Roche)检测DNA信号。

[0153] 免疫印迹分析:基本上按照所述进行免疫印迹分析(Lee,S.等人(2016).Hepatitis B virus X protein enhances Myc stability by inhibiting SCF(Skp2) ubiquitin E3 ligase-mediated Myc ubiquitination and contributes to oncogenesis.Oncogene 35,1857-1867)。在蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Sigma Aldrich)的存在下,用含有0.1％十二烷基硫酸钠的RIPA缓冲液裂解细胞。裂解物通过SDS-PAGE分离,然后电转移到硝酸纤维素膜上。使用适当的一抗在4℃下对膜探测过夜,然后使用相应的HRP偶联二抗探测。本研究使用了以下一抗:兔抗IRF3磷酸丝氨酸386(Cell Signaling)、兔抗IRF3(Cell Signaling)、兔抗IFIT1(抗体972;在兔中针对IFIT1 437-490 aa肽序列产生)、兔抗RIG-I(抗体969;在兔中针对RIG-I aa 1-227肽序列产生)、兔抗MDA5(Enzo Life Sciences)、兔抗核纤层蛋白B1(Abcam)、小鼠抗钙联蛋白(Abcam)和小鼠抗α-微管蛋白(Cell Signaling)。

[0154] 免疫荧光分析:基本上如所述的进行免疫荧光分析(Lee,S.等人(2016),同上)。简而言之,将接种在胶原蛋白包被的24-mm盖玻片上的细胞用3％多聚甲醛固定,并用PBS中的0.2％Triton-X 100透化。然后将细胞与对IRF3特异的小鼠单克隆抗体AR1(Rustagi,A.等人(2013).Two new monoclonal antibodies for biochemical and flow cytometric analyses of human interferon regulatory factor-3 activation,turnover,and depletion.Methods(San Diego,Calif)59,225-232)和兔抗人NTCP(Invitrogen)一起孵育,然后分别是Alexa Flour 594-或488-偶联的特异性二抗(Invitrogen)和4',6-双脒基-2-苯基吲哚(DAPI)孵育。免疫染色后,用prolong Gold anti-fade试剂(Life Technologies)封固盖玻片并通过Nikon Elipse-Ti共聚焦显微镜收集图像。

[0155] 细胞毒性测定:使用CellTiter-Glo对HepG2-C3A-hNTCP和dHepaRG细胞的培养物进行细胞毒性评估,如所述的(Edwards,T.C.等人(2019).Inhibition of HBV replication by N-hydroxyisoquinolinedione and N-hydroxypyridinedinone ribonuclease H inhibitors.Antiviral research 164,70-80)。将细胞接种在DMEM培养基中的96孔培养板中,并在存在或不存在连续稀释的化合物或多聚U/UC PAMP的情况下孵育。根据制造商的说明,使用CellTiter-Glo™试剂(Promega)以ATP含量作为细胞活力的量度来测量每种细胞的细胞毒性。使用发光读板器(Berthold)读取板,并将每个孔产生的相对发光单位(RLU)数据计算为与未处理对照相比的百分比信号。并且值表示为CC_{50}值(50％细胞毒性浓度;与未处理的细胞相比,分别导致吸光度降低50％的化合物或多聚U/UC PAMP的浓度)。测试一式三份进行,每个实验重复三次。为了计算选择性指数(SI),大于40的CC_{50}值赋予40的最大值。化合物的选择性指数(SI)计算如下:$SI=CC_{50}/IC_{50}$。

[0156] HBV进入测定和细胞分级分离:在4℃下,在4％PEG的存在下用HBV接种细胞6小时。为了评估HBV进入,通过用包含蛋白酶K的PBS洗涤去除接种物,并在附着后将细胞转移到37

℃。孵育和处理后，将细胞在低渗缓冲液(100mM HEPES、15mM $MgCl_2$、100mM KCL和Nonidet P-40)中裂解，并用dounce匀浆器匀浆。通过离心(6,000×g，在4℃下5分钟)将细胞质级分与细胞核沉淀分离。将细胞核沉淀重悬于提取缓冲液(20mM HEPES、15mM $MgCl_2$、420mM NaCl、0.2mM EDTA和25％(v/v)甘油，包括DTT和蛋白酶抑制剂混合物)中。将每个细胞级分与1％SDS(v/v)混合，并使用Hirt提取方法提取无蛋白质DNA。

[0157] ELISA:对于ELISA，收集来自细胞上清液，以10,000x g离心5分钟，回收液体级分用于分析。按照制造商的说明，使用乙型肝炎病毒s抗原(HBsAg)检测试剂盒(AlphaLISA;PerkinElmer)对回收的上清液进行HBsAg ELISA。

[0158] cccDNA半衰期分析模型:为了分析cccDNA在处理下的衰变，采用以下数学模型:如果$t \leq \tau$，$C(t)=C(0)$，否则$C(t)=C(0)e^{-\lambda(t-\tau)}$，其中C(t)是处理后时间t时cccDNA的量，C(0)是处理开始时的cccDNA，λ是cccDNA的衰变率，以及τ是治疗导致cccDNA衰变前的延迟。通过同时拟合四个处理中每个处理下的三个重复的数据，使用MATLAB R2017b估计λ和τ。cccDNA的半衰期计算为ln(2)/λ并在表2中报告。使用MATLAB中的函数nlparci，该函数基于最小二乘估计量的渐近正态逼近方法(Vandeginste,B.(1989).Nonlinear regression analysis:Its applications,D.M.Bates and D.G.Watts,Wiley,New York,1988.ISBN 0471-816434.Price:£34.50.Journal of Chemometrics 3,544-545)，参数λ和τ的95％置信区间被估计并报告在表2中。

[0159] 统计分析:使用Graphpad软件进行统计分析，并进行多重比较。连续变量报告为平均值±标准偏差(SD)。对于所有测试，p值≤0.05被认为具有统计学意义。

[0160] 尽管已经说明和描述了说明性实施方案，但是应当理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在其中做出各种改变。

序列表

<110> 华盛顿大学

Gale, Jr., Michael J.

Lee, Sooyoung

<120> 用于治疗乙型肝炎病毒感染的组合物和方法

<130> UWOTL-1-72750

<150> US 62/909,321

<151> 2019-10-02

<160> 125

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 105

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuucucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuu 105

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

gcctattgat tggaaagtat gt 22

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

gctgaggcgg tatcta 16

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
ctcctccagc ttatagacc 19
<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
gtgagtgggc ctacaaa 17
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
agaagcaggc aatcacagaa aa 22
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
ctgaaaccga ccatagtgga aat 23
<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
tactccgtga agtctaggga cag 23
<210> 9
<211> 22

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
aacaggatga atccaatggt ca 22
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10
gtggcattca aggagtacct c 21
<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
tgatggcctt cgattctgga tt 22
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12
cgtgagcatc gtgagcaatg 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
tcttctttcc ttggccacgg 20
<210> 14

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
tgcaccgaac tctaccagca 20
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 15
gtttctccca ccctctcctc c 21
<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
aaggactgca agtgccgct 19
<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
gctggtccaa gacatccc 18
<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
tcacaggcgc attactgcc 19

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
ggatttgaac caatcgctgg a 21
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 20
gagaagggac aagcacatgg 20
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 21
tggatccatc aagtgtctgg 20
<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
ccgaggaccc gaaggttac 19
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23

tccaacagtg ctgaaattcg 20

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

acaactttgg tatcgtggaa gg 22

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

gccatcacgc cacagtttc 19

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 26

ccccacaaac cccattacta aaccca 26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

tttcatcatg cggagatgtt ggatgg 26

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 28
gggtcttccg gatataatcc 20
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29
gtggttggac tcgggaattc g 21
<210> 30
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 30
taatacgact cactataggc atcctgttt ttttcccttt ttttttttct ttttttttt 60
ttttttttt ttttttttt tttctccttt ttttttcctc tttttttcct tttctttcct 120
tt 122
<210> 31
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 31
aaaggaaaga aaaggaaaaa aagaggaaaa aaaaaggaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
aaaaaaaaaa aaagaaaaaa aaaaagggaa aaaaacagga tggcctatag tgagtcgtat 120
ta 122
<210> 32
<211> 115
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 32
taatacgact cactataggt ggctccatct tagccctagt cacggctagc tgtgaaaggt 60
ccgtgagccg cttgactgca gagagtgctg atactggcct ctctgcagat caagt 115

<210> 33
<211> 115
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 33
acttgatctg cagagaggcc agtatcagca ctctctgcag tcaagcggct cacggacctt 60
tcacagctag ccgtgactag ggctaagatg gagccaccta tagtgagtcg tatta 115
<210> 34
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 34
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuucucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuu 105
<210> 35
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 35
acuguuccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu 60
uuuuuucccu cuuucuuccc uucucaucuu auucuacuuu cuuucuu 107
<210> 36
<211> 131
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 36
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuucucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuucccccc ccccccccccc 120
ccccccccccc c 131
<210> 37
<211> 105

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 37
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuucucc uuuuuuuuuc cccccccccc cccccccccc ccccc 105
<210> 38
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 38
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuu 105
<210> 39
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 39
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuvuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuu 105
<210> 40
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 40
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu cuccuuuuuu uuuccucuuu 60
uuuuccuuuu cuuuccuuuc cccccccccc cccccccccc ccccc 105
<210> 41
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的

<400> 41

ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuc uccuuuuuuu 60

uuccucuuuu uuuccuuuuc uuuccuuucc cccccccccc ccccc 105

<210> 42

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 42

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 43

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

cccccccccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 44

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucccccc cccccccccc 60

cc 62

<210> 45

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuvuuuuu uuuuuuuuuu 60

uu 62

<210> 46

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuuuuu uuuuuuuuuu 60

uu 62

<210> 47

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 47

uuccuuccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 48

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 48

uuuuuuuuug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 49

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 49

uuuuuuuuug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 50

<211> 62

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 50
gguuuuccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuuuuu uuuuuuuuuu
uu 62
<210> 51
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 51
ggccauccug uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uucucuccuu uuuuuuuccu
cu 62
<210> 52
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 52
ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuucuuuu uuuuuuuuuu ucuucuccuu uuuuuuuccu
cu 62
<210> 53
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 53
ggccauccug uuuuuuuuuu cccuuuuuuu uuucccuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu
cu 62
<210> 54
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的

<400> 54

ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuucc ccccuuuuuu uuuucuccuu uuuuuuuccu 60

cu 62

<210> 55

<211> 105

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuucucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuu 105

<210> 56

<211> 35

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

ggccauucuu uuuuuuuuuu uuuucuuucu ucuuu 35

<210> 57

<211> 116

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

ggccauuccc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ucucuucuuu ucuuuauucc uucuuu 116

<210> 58

<211> 101

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

ggccguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuucuuuucc ccuuuuuuau uuuucuuucu u 101

<210> 59
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 59
ggccauccug uuuuuuuguu uuuucuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuucu uuuuuucccu uuuuuuuauu uuauuuucuu uuggu 105
<210> 60
<211> 131
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 60
ggccaucccc cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuccu cuuuuuuucc 120
uuuucuucuu u 131
<210> 61
<211> 116
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 61
ggccguucug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuccuuu uuuuuauucc ucuucu 116
<210> 62
<211> 123
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 62
ggccaucccc uuuguuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuau uucuccuucu 120
uuu 123
<210> 63

<210> 87
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 63
ggccauuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuuuuu uuuuccuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu ccuuuucuuu cuucuuu 87
<210> 64
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 64
ggccauuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuuuuu uuuuccuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu ccuuuucuuu cuucuuu 87
<210> 65
<211> 96
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 65
agccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uucuuuccuu 60
uccuucuuuu uuuccuuucu uuuucccuuc uuuaau 96
<210> 66
<211> 101
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 66
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuggu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuucc uuuccuucuu uuuuuuuuuu ucccucuuua u 101
<210> 67
<211> 87
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 67
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuucuuu uccuucuuuu 60
ucccuuuuuc uuucuuccuu cuuuaau 87
<210> 68
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 68
ggccauccug uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuaau uccuuuucuu 100
<210> 69
<211> 109
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 69
ggccaaccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuccuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuc cuuccuuuu 109
<210> 70
<211> 34
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 70
ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuucuuu cuuu 34
<210> 71
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 71
ggccauuuuu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuu uuuuuuccuu uuuuucuuuu 60

uuuuucuuuu cuuu 74

<210> 72

<211> 81

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 72

ggccauucuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucguuucu uuuucuucuu 60

uuuguuuucu cuucuccuuu u 81

<210> 73

<211> 107

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 73

ggccauuccc cuuuuuuuuu uuuuuccgcu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uucuuuuuuu uuccuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu ucuuuuu 107

<210> 74

<211> 109

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 74

ggccaucccc cuuuuuuuuu uuuuccgcuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uuuuuuuuuu 60

ucuuuuuuuu uuccuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucu uuucuuuuu 109

<210> 75

<211> 35

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 75

ggccauucuu uuuuuuuuuu uuuucuuucu ucuuu 35

<210> 76

<211> 48

<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 76
ggccaucccc uucuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuccuuu ucuucuuu 48
<210> 77
<211> 100
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 77
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
ucuccuuuuu uuuuccucuu uuuuuccuuu ucuuuccuuu 100
<210> 78
<211> 112
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 78
ggccguccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucu ucuuucuuuc uu 112
<210> 79
<211> 145
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 79
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuucuuuu uuuuuuuuuu uuuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuc cuucuuuuuu 120
ccuuucuuuu ccuuccuucu uuaau 145
<210> 80
<211> 95
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 80

ggccauuccu guuuuuuuuu uuuuuuucuu uuguuuuuuu uguuuuuuuu uuuuuuuuuc 60

cuuucuuuuu uuuuuuuuuu ccuuucuucu uuaau 95

<210> 81

<211> 72

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 81

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuccuu cuuuuuuccu uucuuuuccu 60

uccuucuuua au 72

<210> 82

<211> 87

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 82

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuucuuu uccuucuuuu 60

ucccuuuuuc uuucuuccuu cuuuaau 87

<210> 83

<211> 143

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 83

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuucuuuuuu uuuuuuuuuu uccuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucuuuccu ucuuuuuucc 120

uuucuuuucc uuccuucuuu aau 143

<210> 84

<211> 108

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 84

ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuucccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuucuuu ccuucuuuuu uuuccuuucu uuuccuuccu ucuuuaau 108

<210> 85

<211> 82

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

ggcauccugu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuucuuuucu uu 82

<210> 86

<211> 130

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

acacuccauu ucuuuuuuug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuucuu uuucuuuccu uucuuuucug acuucuaauu 120

uuccuucuua 130

<210> 87

<211> 129

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

guccuucugu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuccu uacccuuucc uucuuuucuu ccuuuuuuuu 120

ccuuacuuu 129

<210> 88

<211> 57

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 88

gggucccccuu guuuuuuuuu uuucuuuccu ucuuuccuuu ccuaaucuuu cuuucuu 57

<210> 89

<211> 96
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 89
agccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uucuuuccuu 60
uccuucuuuu uuuccuuucu uuuucccuuc uuuaau 96
<210> 90
<211> 115
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 90
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuccuuucc uuuuuuuuuu uuuuucccuu uuuau 115
<210> 91
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 91
ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu 60
cuucuuuuuc uuuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uucuuuc 107
<210> 92
<211> 96
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 92
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucu 60
uuuucccucu uuuucuucuc uuuuuccuuc uuuaau 96
<210> 93
<211> 111
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 93
gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuu 60
uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucuca ucuuauucua cuuucuuucu u 111
<210> 94
<211> 107
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 94
gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu 60
uuuuuucccu cuuucuuccc uucucaucuu auucuacuuu cuuucuu 107
<210> 95
<211> 92
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 95
gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuucuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uccuucuuuc 60
uuucuuucuu accuuacuuu acuuucuuuu cu 92
<210> 96
<211> 111
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 96
gcuaacaguu ucucuuuuuu uuuuuuuccu uuuuuauuuu uauuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuauu uucuuuuccu uucuuucuca ccuuacauua cuuucuuucu u 111
<210> 97
<211> 77
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 97

gcuaauuucc uuauuguuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuc cauuuccuuc cuucuuacuu 60
cacuuuaccu ucuuucu 77

<210> 98
<211> 124
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 98

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuccuuu ccuuucuuuc uuaccuuacu uuacauucuu 120
uucu 124

<210> 99
<211> 119
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 99

gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuccuu ccuuucucac cuucuuuuac uucuuuccu 119

<210> 100
<211> 93
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 100

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuucuuuucu 60
uuccuuuccu ucuuacucua cuuuacuuuu ucu 93

<210> 101
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 101

gcuaacuguu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc uuuuccuucu ucuuucuuac cuuauuuucc 120

uucuuucuu 129

<210> 102

<211> 86

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 102

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucu uuuuuuuucu uuucuuuccu 60

ucuuaccuua cuuuacuuuc uuuucu 86

<210> 103

<211> 133

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 103

gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuc cuuuuuccuu uuccuucucu uuuuaccuua 120

cuuuacuuuu cuu 133

<210> 104

<211> 144

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 104

gcuaacuguc ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuucuuu uuuucucuuu uccuucuuuc 120

uuaccuuauu uuacuuucuu uccu 144

<210> 105

<211> 119

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 105

gcuaacuguc ccuuuuuuuu uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu 60

uuuuuuuuuu uguuucuuuu ccuucucauu uccuucuuau cuuaauuacu uccuuuccu 119

<210> 106
<211> 88
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 106
gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuccu ucuuccuuuc 60
cuucuuaccu uacuuuauuu ucuuuccu 88
<210> 107
<211> 101
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 107
gcuaacuguu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uucuuucuuu ucuuuucuca ccuuacuuua cuuccuuucu u 101
<210> 108
<211> 86
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 108
gcuaguuuuc uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuguuuuu uuuuuuuuuc cucuuuuucc 60
guauuuuuuu uuuuuccucu uuucuu 86
<210> 109
<211> 105
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 109
ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
uuuuuucucc uuuuuuuuuc cucuuuuuuu ccuuuucuuu ccuuu 105
<210> 110
<211> 79
<212> RNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 110
ccauuuuucu uuuuuuuuuu uuguuuguuu uuuuuuuuuu uuucuuuccu ucuuuccuga 60
cuuuuaauuu uccuucuua 79
<210> 111
<211> 116
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 111
ccauuuuucu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuugu 60
uuguuuuuuu uuuuuuuuuu cuuuccuucu uuccugacuu uuaauuuucc uucuua 116
<210> 112
<211> 84
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 112
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuacccu uuuuucucuu 60
uuuuuuuuuu ccuucuucuu uaau 84
<210> 113
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 113
ggccauuucc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu acccuuuuuu cucuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
ccuucuucuu uaau 74
<210> 114
<211> 38
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 114
ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuuuuauuu ucuuuaau 38
<210> 115
<211> 53
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 115
ggccauuuuc uuuuuuuuuu cucuuuuuuu uuuuuuuuuu uauuuucuuu aau 53
<210> 116
<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 116
ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuccuuuuuu uuuuuuccuc uuuuuuuuuu 60
uuuuuuuuuu auuuucuuua au 82
<210> 117
<211> 82
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 117
ggccauuuuc uguuuuuuuu uuuucuuuuu uuuuuuuuuu uuccuuuuuu uuucucuuuu 60
uuuuuuuuuu auuuucuuua au 82
<210> 118
<211> 85
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 118
ggccauccug uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuguuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuucc 60
uuuuuuuuuu uuuauuuucu ucuuu 85
<210> 119
<211> 59

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 119
gguccuaagu uuuuuuuuuu uucuuccuuc cuucuuuccu uuucuaauuu uccuucuuu 59
<210> 120
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 120
gguccuaagu uguuuuuuuu uuuuuuuccu uccuucuuuc ccuuuucuaa uuuuccuucu 60
uu 62
<210> 121
<211> 74
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 121
gguccuaagu uguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuccuuu ccuuccuucu uuccuuuucu 60
aauuuuccuu cuuu 74
<210> 122
<211> 95
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 122
ggccauuucu guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuguuuccuu 60
cuuuuuccuu uucuuuuuuu uuuucucccu uuaau 95
<210> 123
<211> 70
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 123

ggccauuucu guuuuuuuuu uuuuuguuuc cuucuuuuuc cuuuucuuuu uuuuuuuuuc 60

ucccuuuaau 70

<210> 124

<211> 70

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 124

ggccauccug uuuuuuuccc uuuuuuuuuu ucuccuuuuu uuuuccucuu uuuuuccuuu 60

ucuuuccuuu 70

<210> 125

<211> 53

<212> RNA

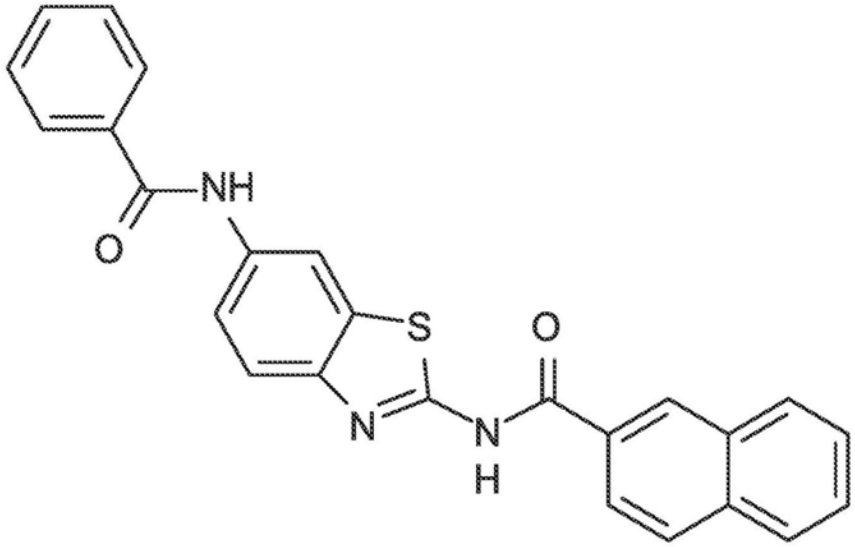
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 125

ggccauuuuc uuuuuuuuuu cucuuuuuuu uuuuuuuuuu uauuuucuuu aau 53


NH
O
S
O
N
N
H

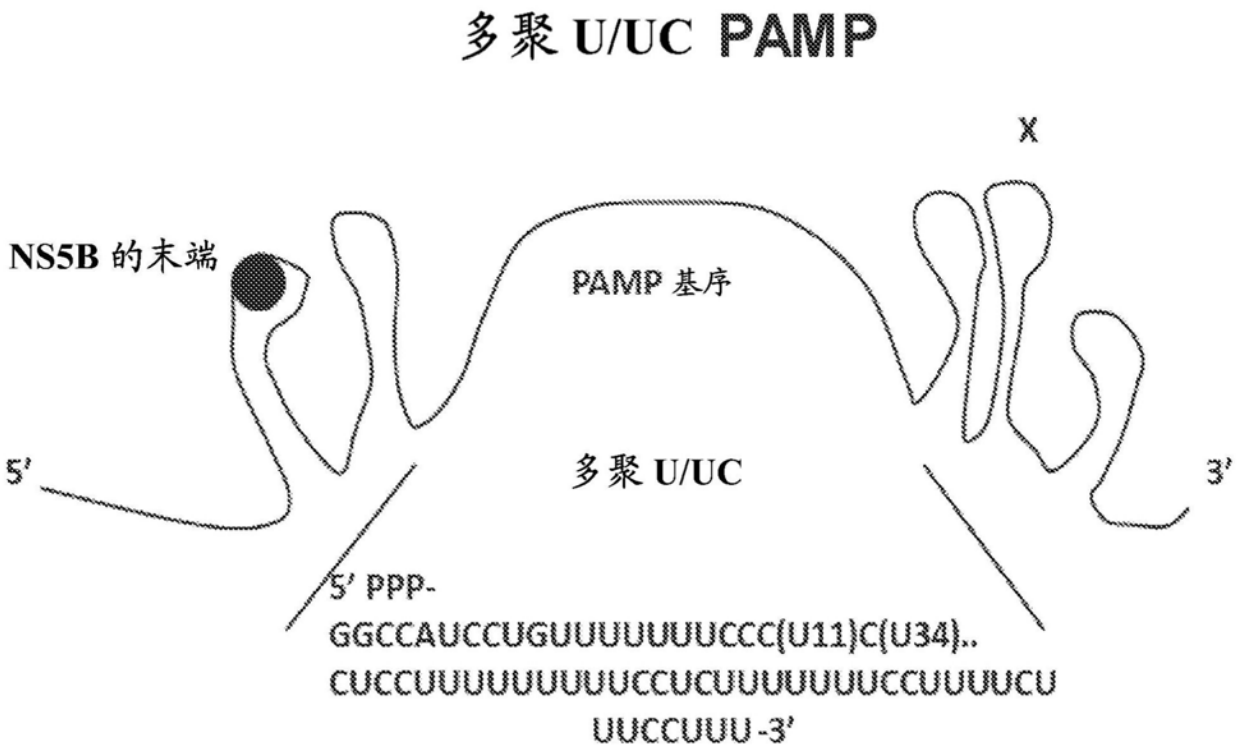

多聚 U/UC PAMP
X
NS5B 的末端
PAMP 基序
5′
多聚 U/UC
3′
5′ PPP-
GGCCAUCCUGUUUUUUUCCC(U11)C(U34)..
CUCCUUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCCUUUUCU
UUCCUUU-3′

图1A

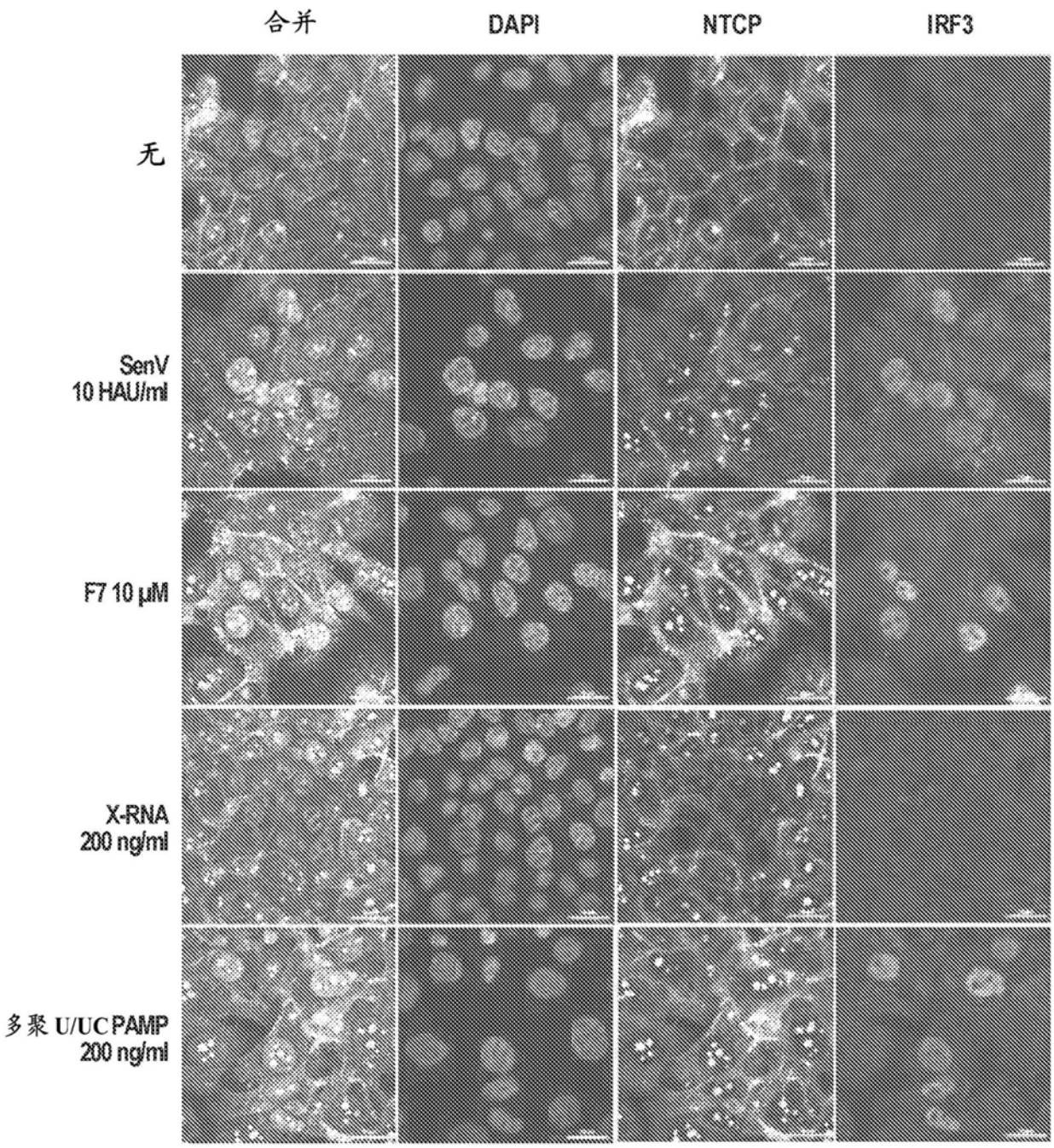

合并
DAPI
NTCP
IRF3
无
SenV
10 HAU/ml
F7 10 μM
X-RNA
200 ng/ml
多聚 U/UC PAMP
200 ng/ml

图1B

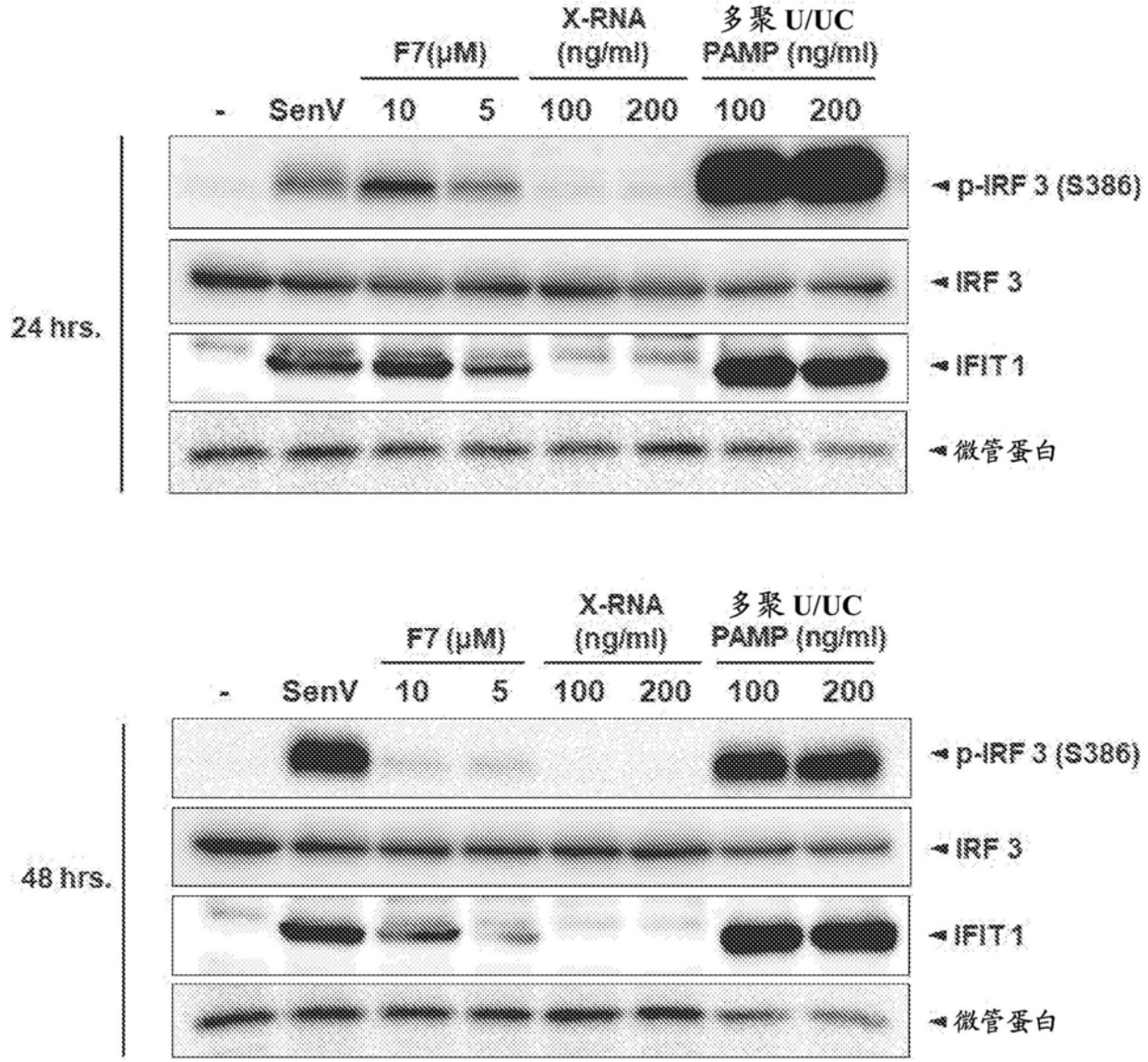

F7(μM)
X-RNA (ng/ml)
多聚 U/UC PAMP (ng/ml)
- SenV 10 5 100 200 100 200
24 hrs.
p-IRF 3 (S386)
IRF 3
IFIT 1
微管蛋白
F7 (μM)
X-RNA (ng/ml)
多聚 U/UC PAMP (ng/ml)
- SenV 10 5 100 200 100 200
48 hrs.
p-IRF 3 (S386)
IRF 3
IFIT 1
微管蛋白

图1C

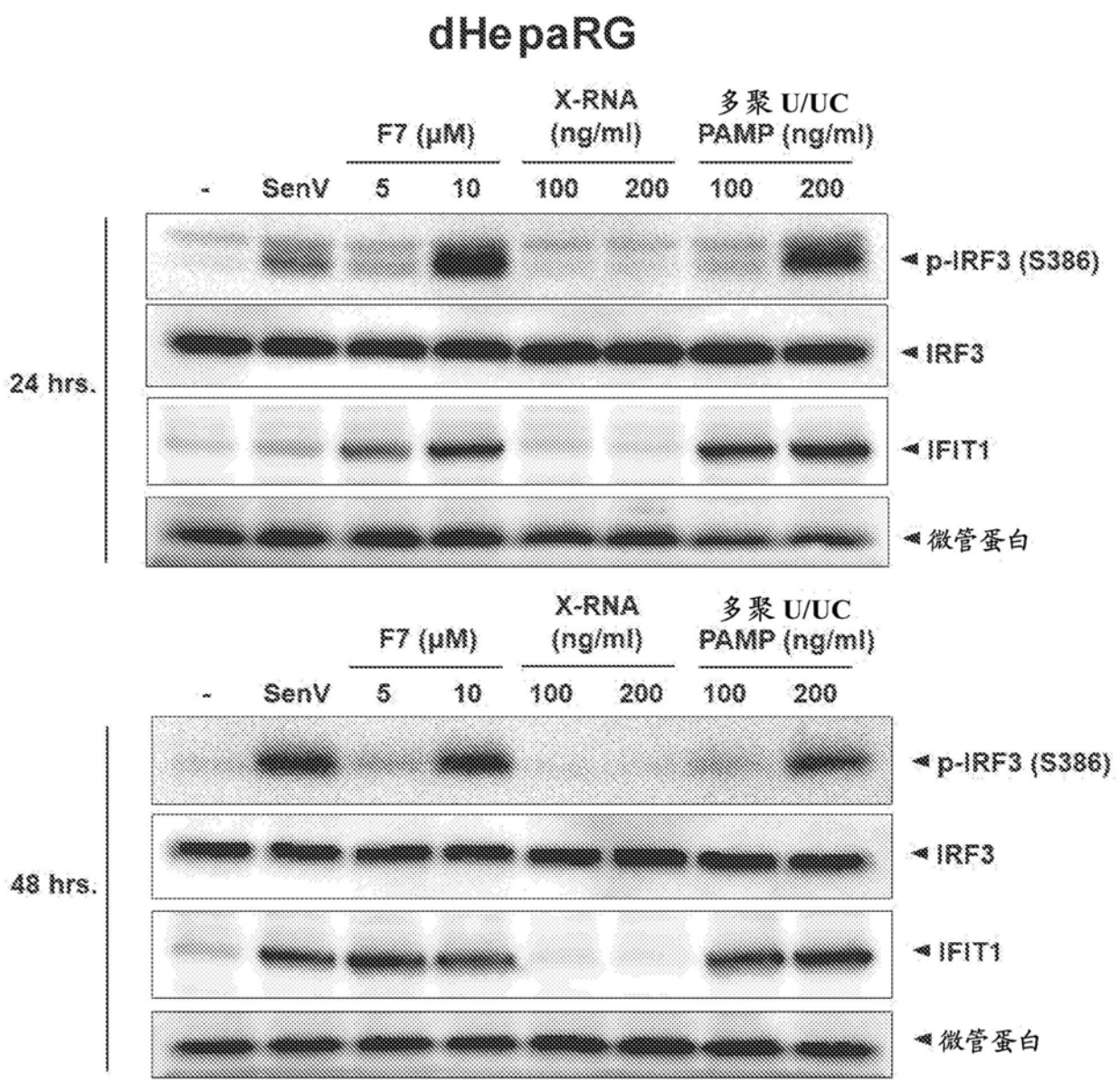

dHepaRG
F7 (μM)
X-RNA (ng/ml)
多聚 U/UC PAMP (ng/ml)
-
SenV
5
10
100
200
100
200
24 hrs.
p-IRF3 (S386)
IRF3
IFIT1
微管蛋白
48 hrs.

图1C续

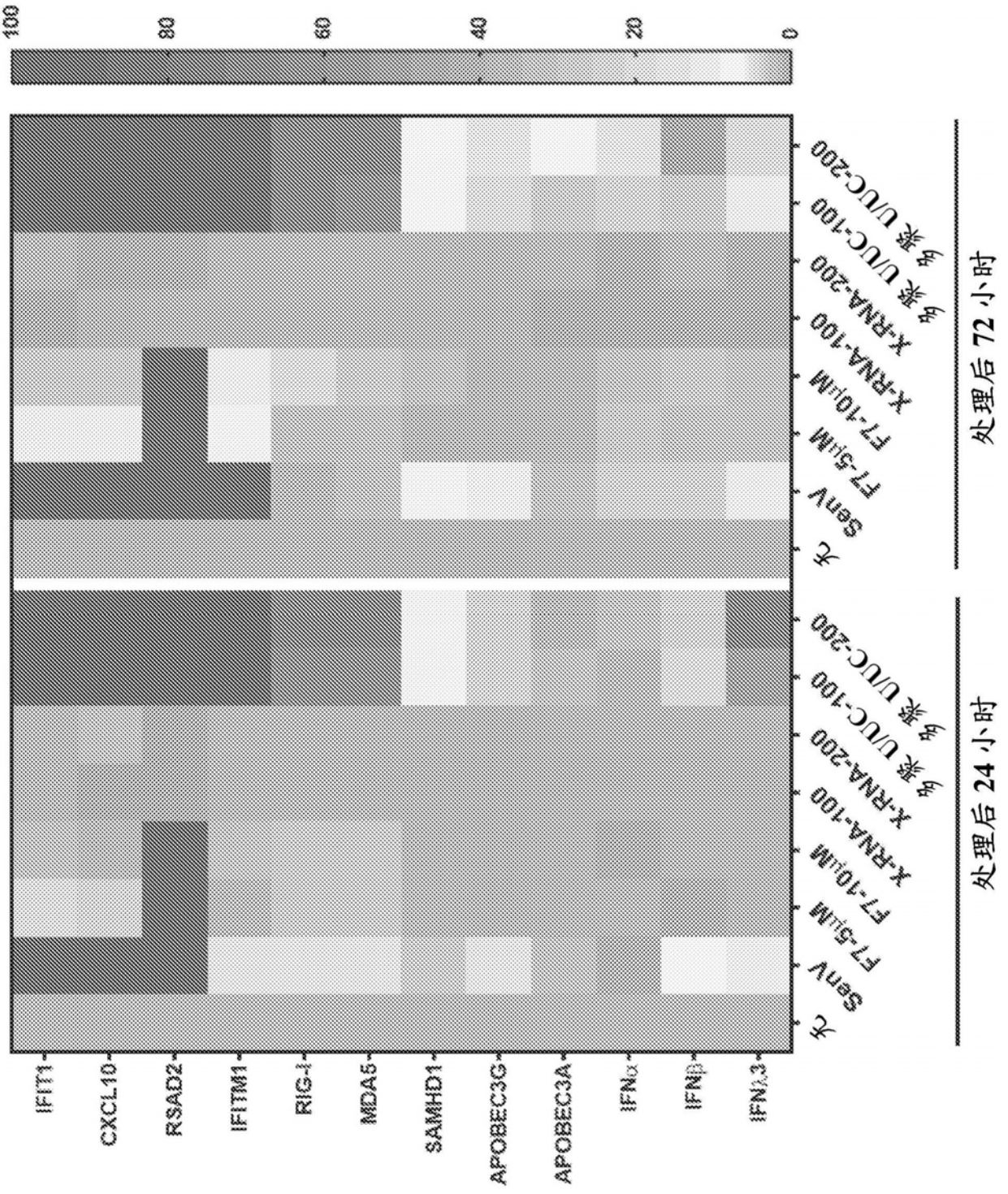

100
80
60
40
20
0
IFIT1
CXCL10
RSAD2
IFITM1
RIG-I
MDA5
SAMHD1
APOBEC3G
APOBEC3A
IFNα
IFNβ
IFNλ3
无
Sendai
F7-5μM
F7-10μM
X-RNA-100
X-RNA-200
鲍曼 U/UC-100
鲍曼 U/UC-200
处理后 24 小时
处理后 72 小时

图1D

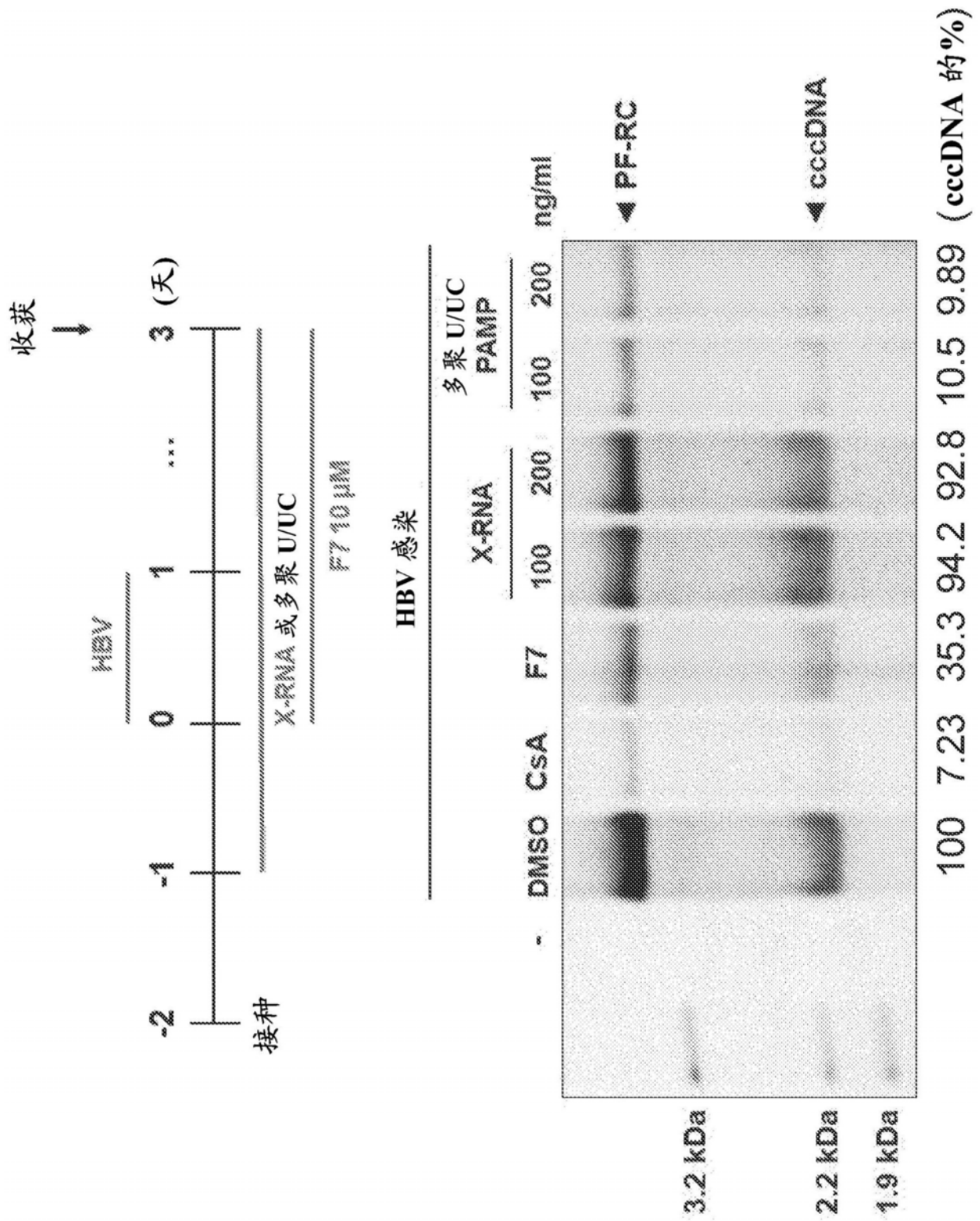

收获
HBV
-2
-1
0
1
...
3 (天)
接种
X-RNA 或多聚 U/UC
F7 10 μM
HBV 感染
多聚 U/UC
PAMP
X-RNA
- DMSO CsA F7 100 200 100 100 200 ng/ml
100 7.23 35.3 94.2 92.8 10.5 9.89 (cccDNA 的%)
PF-RC
cccDNA
3.2 kDa
2.2 kDa
1.9 kDa

图2A

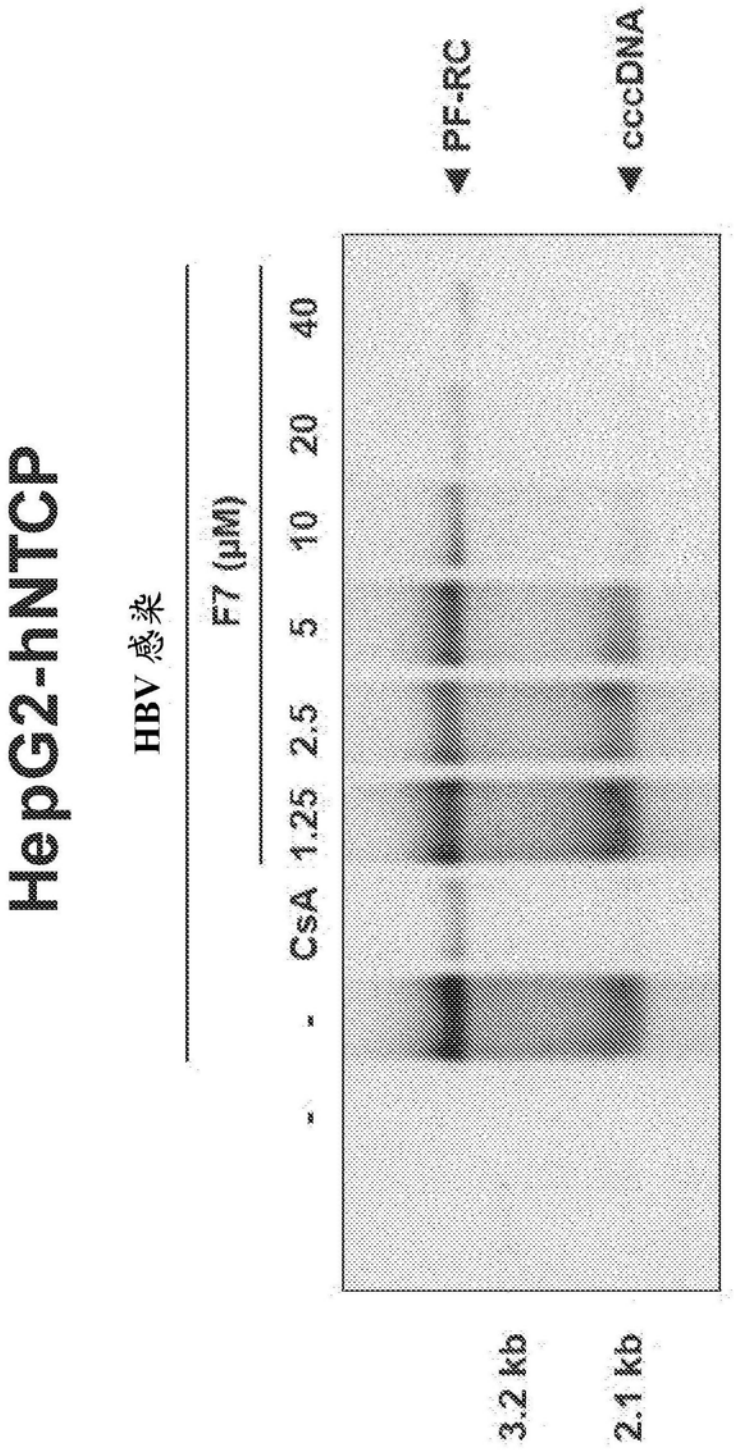

HepG2-hNTCP
HBV 感染
F7 (μM)
- - CsA 1.25 2.5 5 10 20 40
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.1 kb

图2B

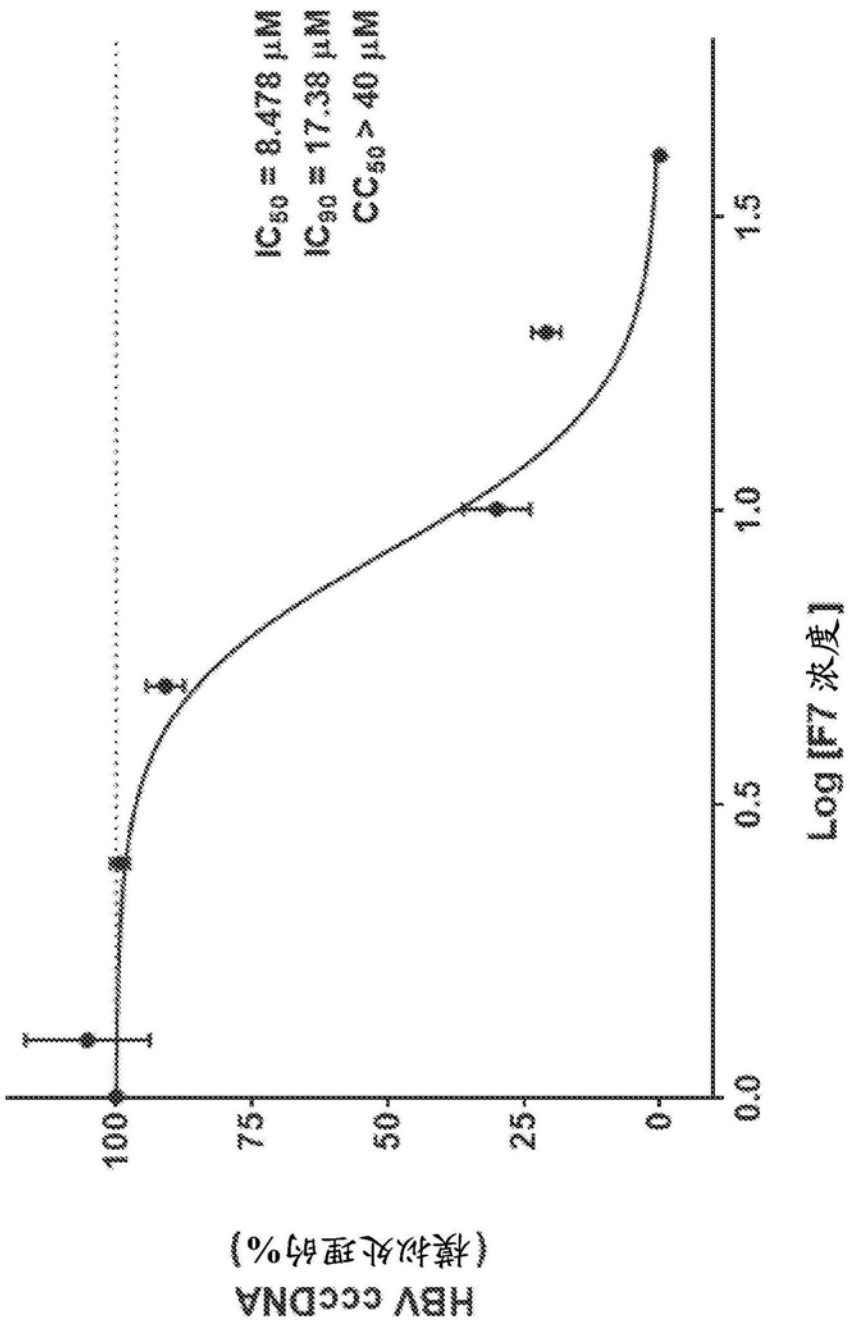

IC50 = 8.478 μM
IC90 = 17.38 μM
CC50 > 40 μM
HBV cccDNA
(模拟处理的%)
100
75
50
25
0
0.0
0.5
1.0
1.5
Log [F7 浓度]

图2B续

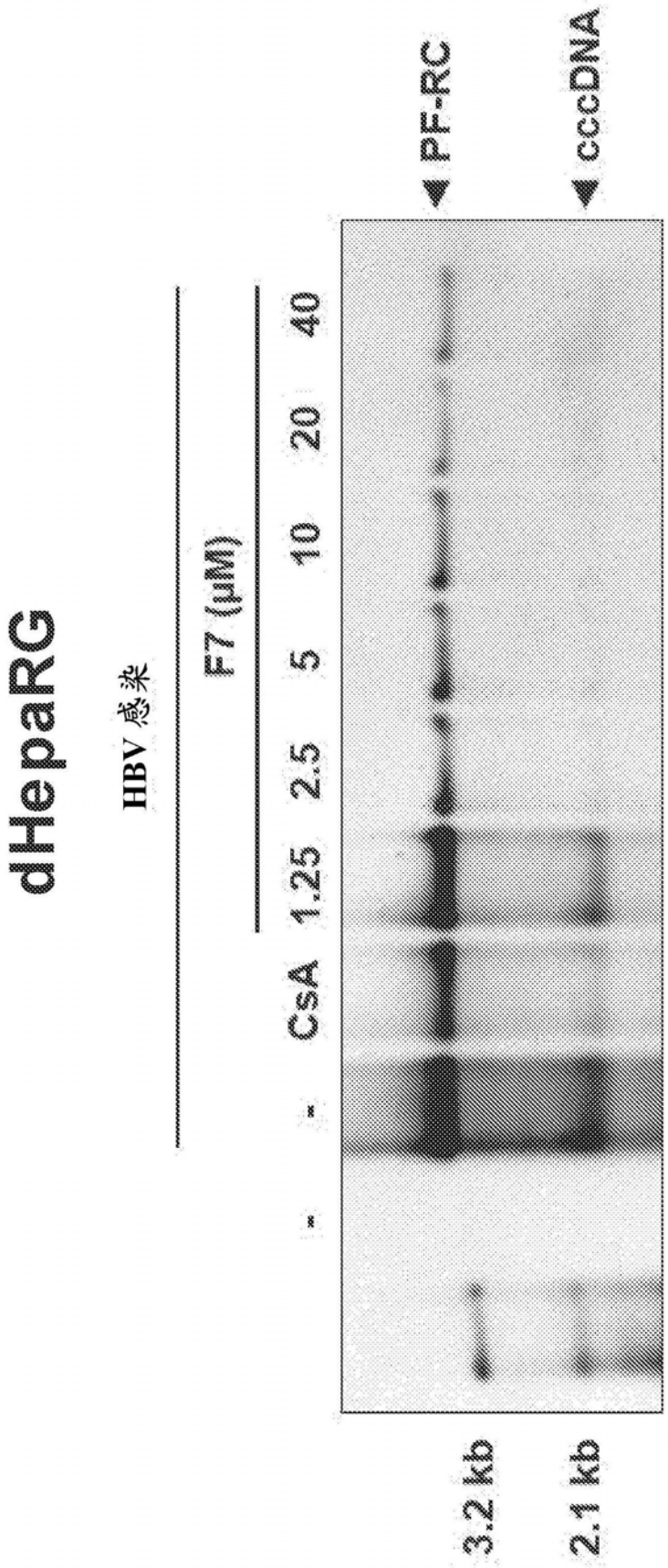


图2C

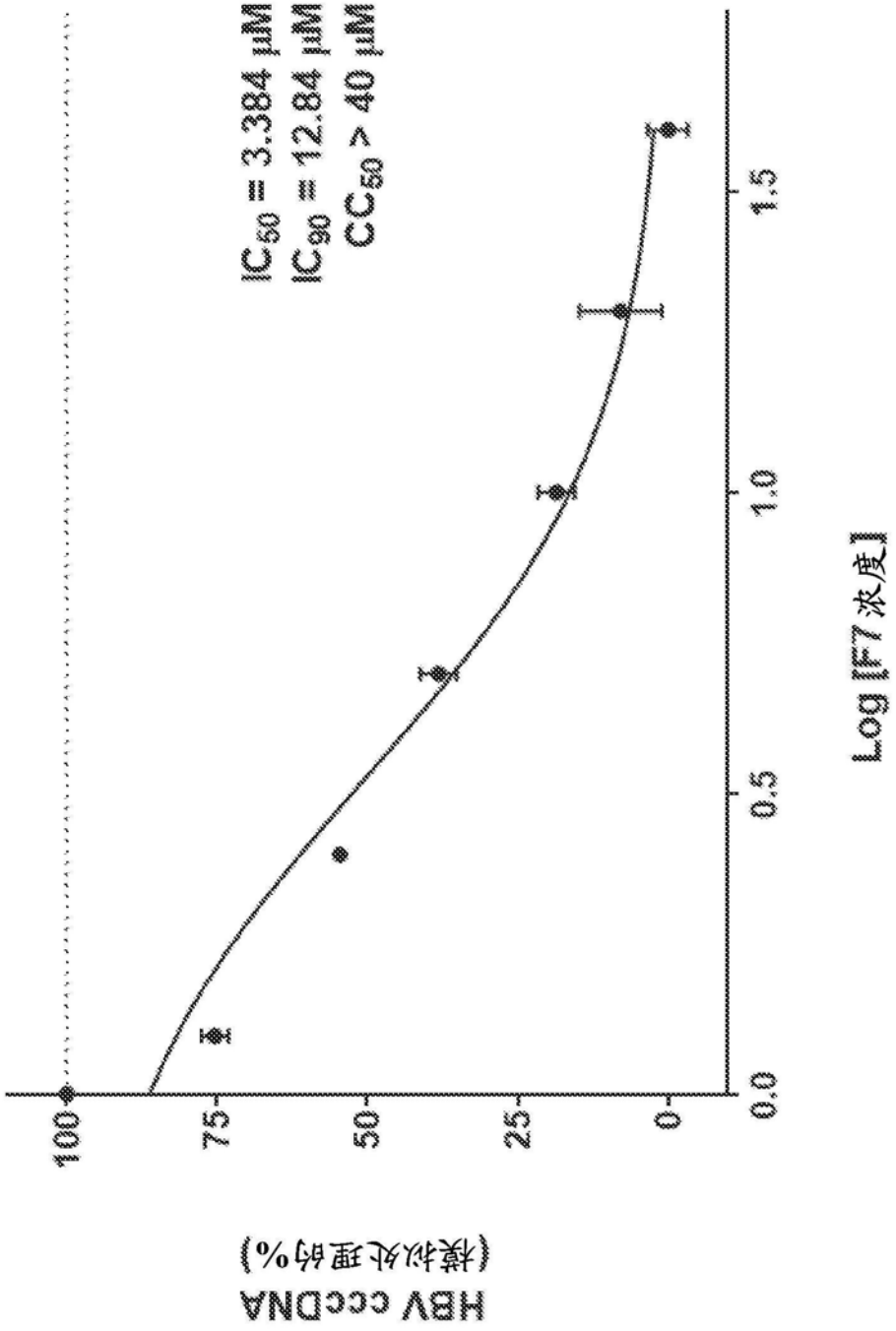

IC50 = 3.384 μM
IC90 = 12.84 μM
CC50 > 40 μM
HBV cccDNA
(模拟处理的%)
100
75
50
25
0
0.0
0.5
1.0
1.5
Log [F7 浓度]

图2C续

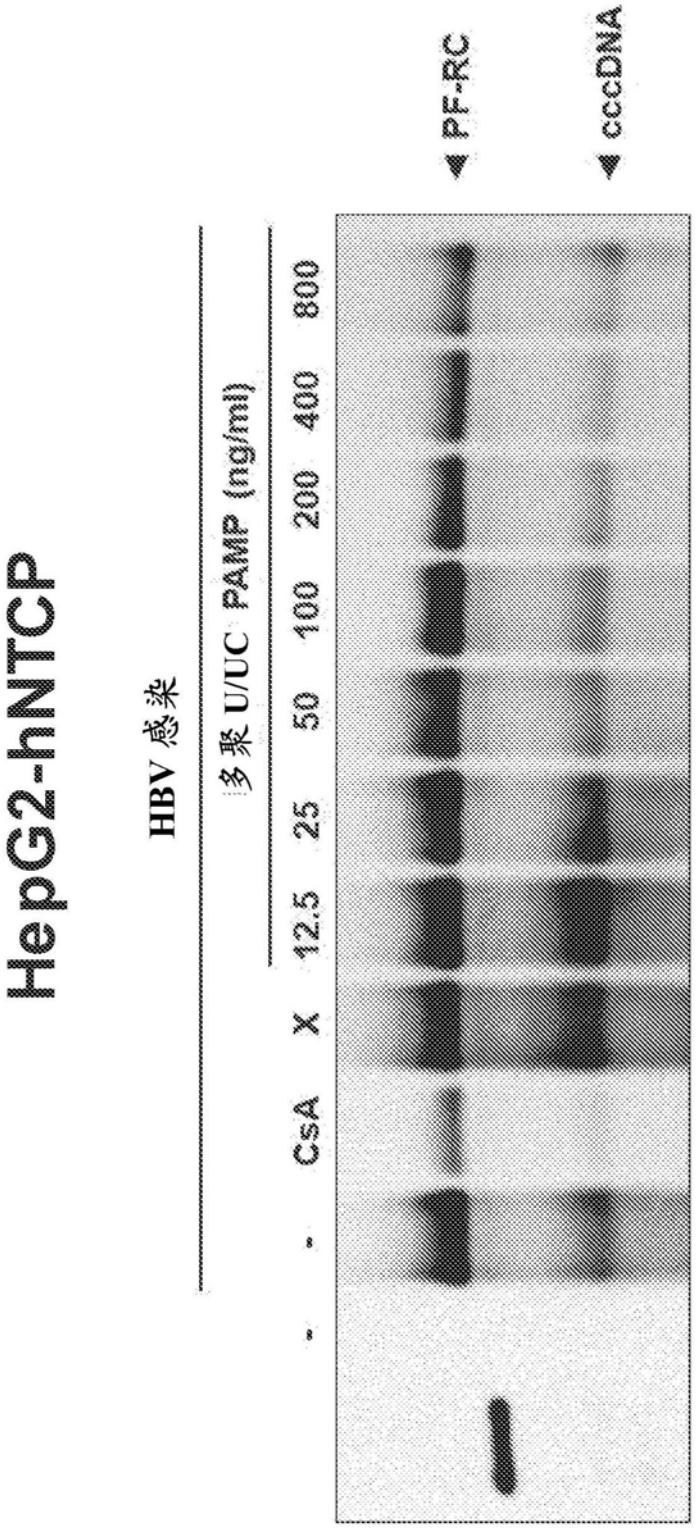

HepG2-hNTCP
HBV 感染
多聚 U/UC PAMP (ng/ml)
- - CsA X 12.5 25 50 100 200 400 800
PF-RC
cccDNA

图2D

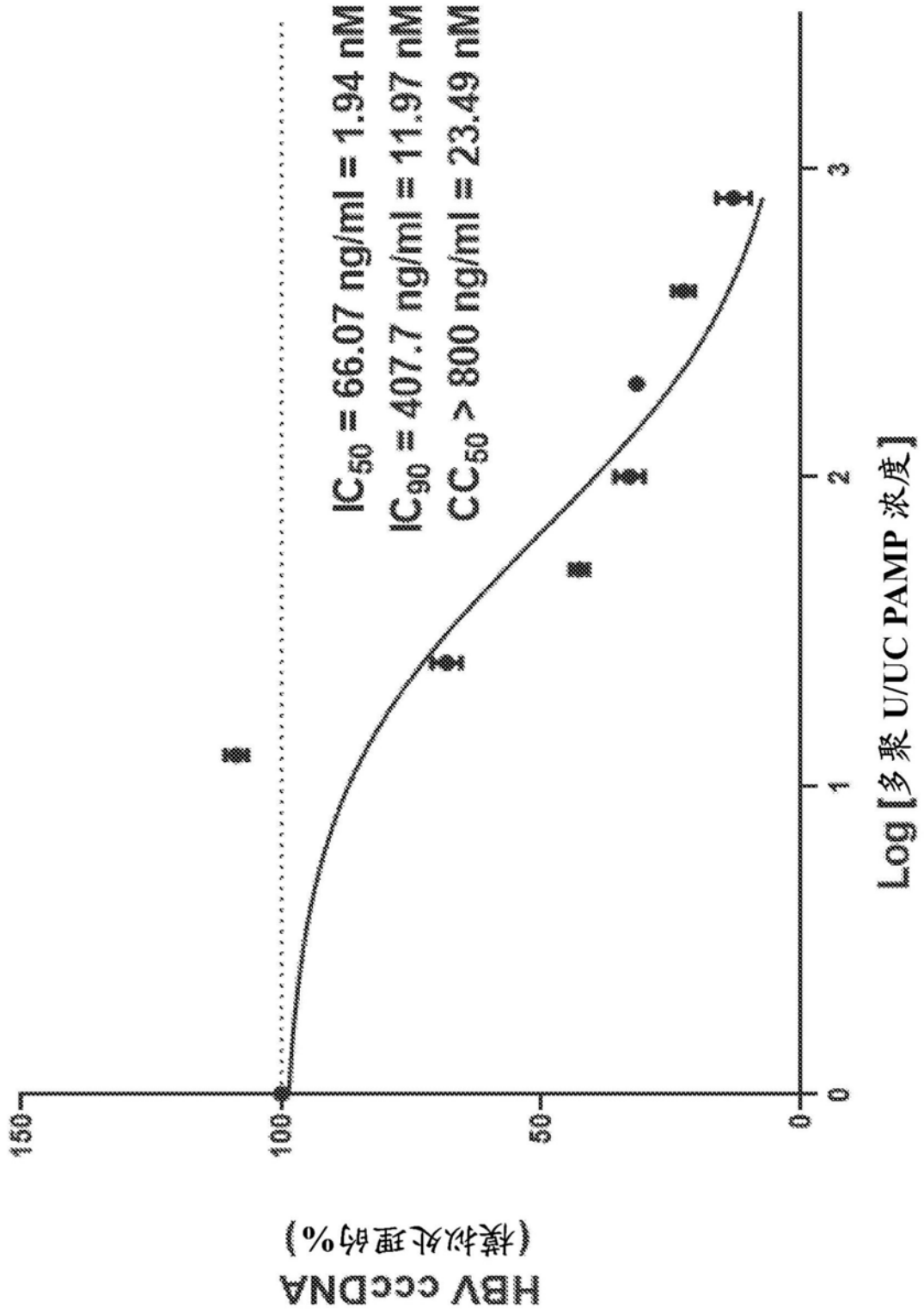

HBV cccDNA
(模拟处理的%)
150
100
50
0
0
1
2
3
Log【多聚 U/UC PAMP 浓度】
IC_{50} = 66.07 ng/ml = 1.94 nM
IC_{90} = 407.7 ng/ml = 11.97 nM
CC_{50} > 800 ng/ml = 23.49 nM

图2D续

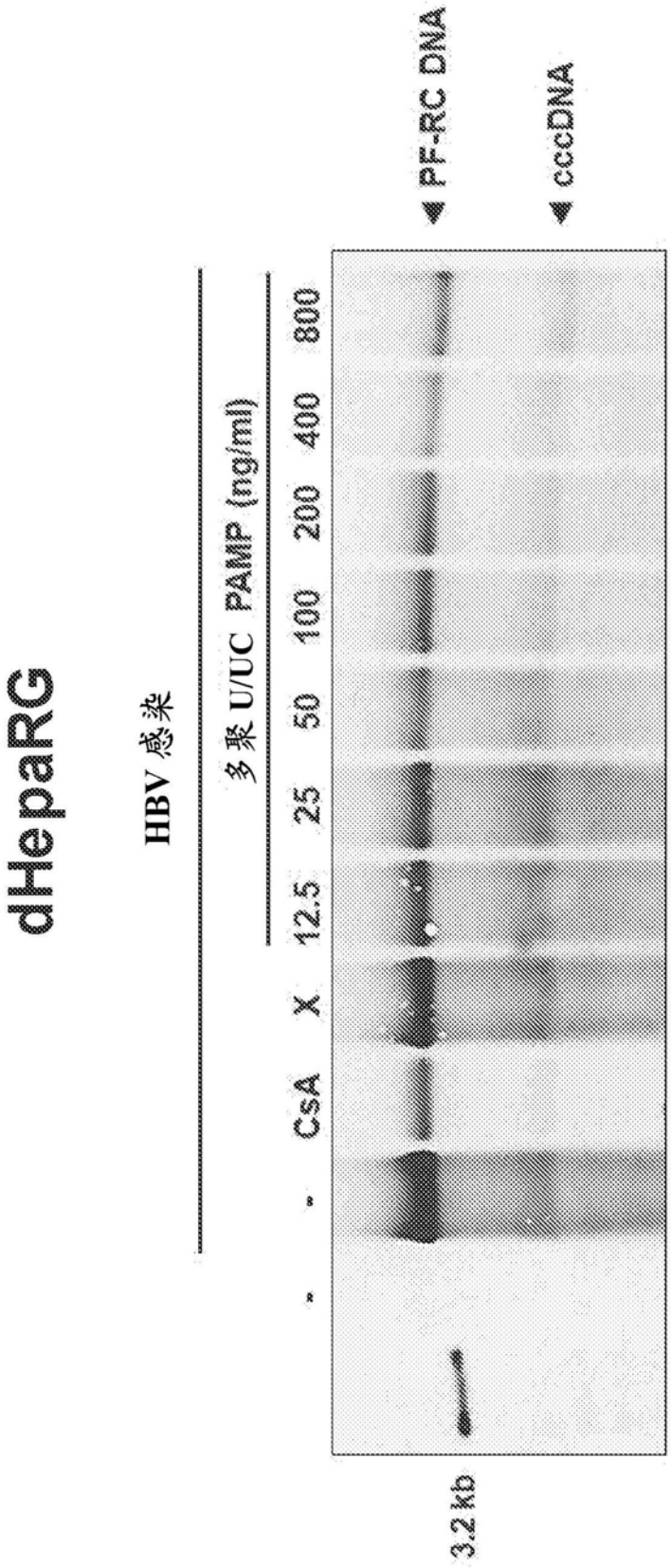

dHepaRG
HBV 感染
多聚 U/UC PAMP (mg/ml)
- - CsA X 12.5 25 50 100 200 400 800
PF-RC DNA
cccDNA
3.2 kb

图2E

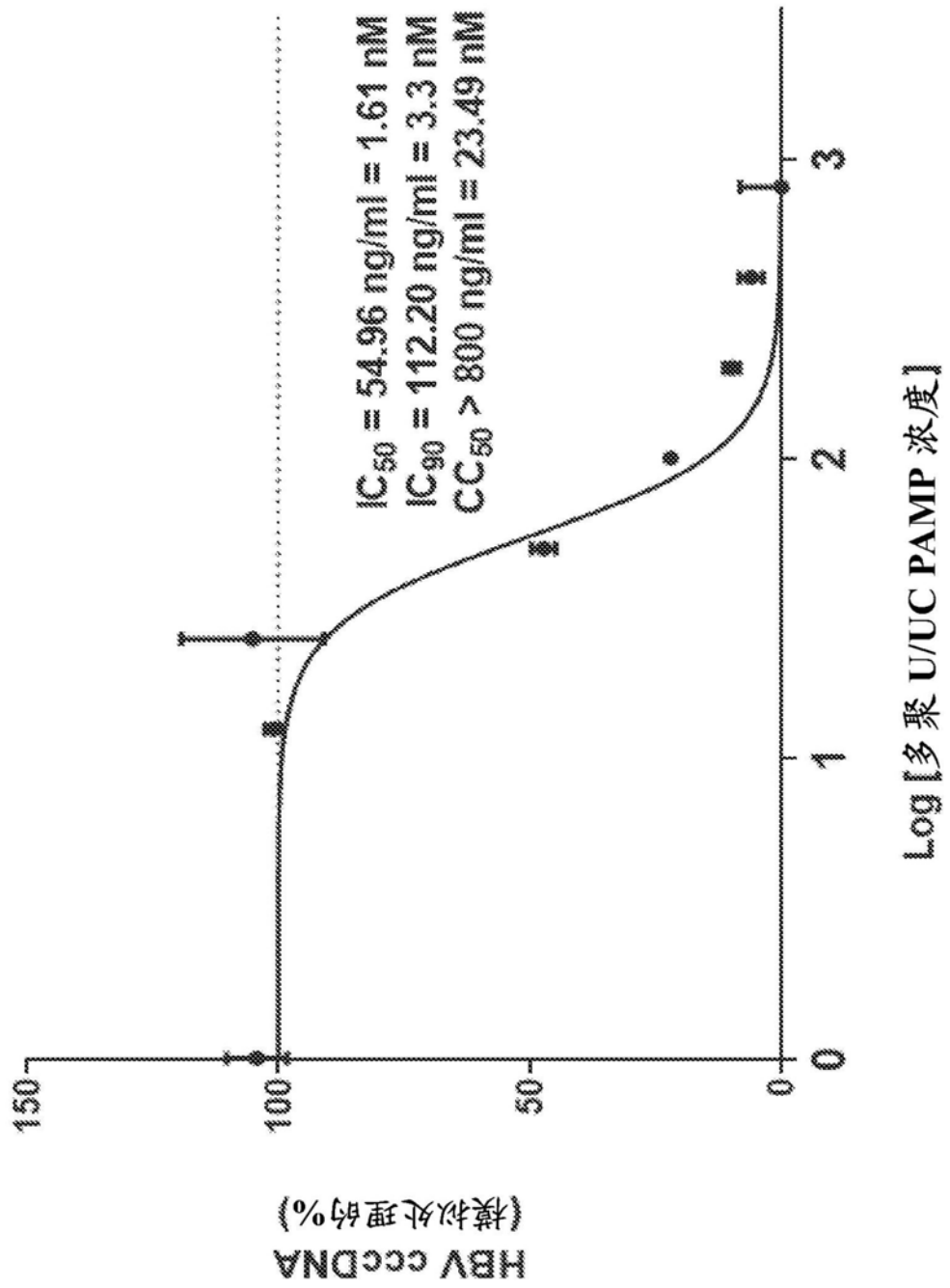

IC50 = 54.96 ng/ml = 1.61 nM
IC90 = 112.20 ng/ml = 3.3 nM
CC50 > 800 ng/ml = 23.49 nM
HBV cccDNA
(模拟处理的%)
150
100
50
0
0
1
2
3
Log[多聚 U/UC PAMP 浓度]

图2E续

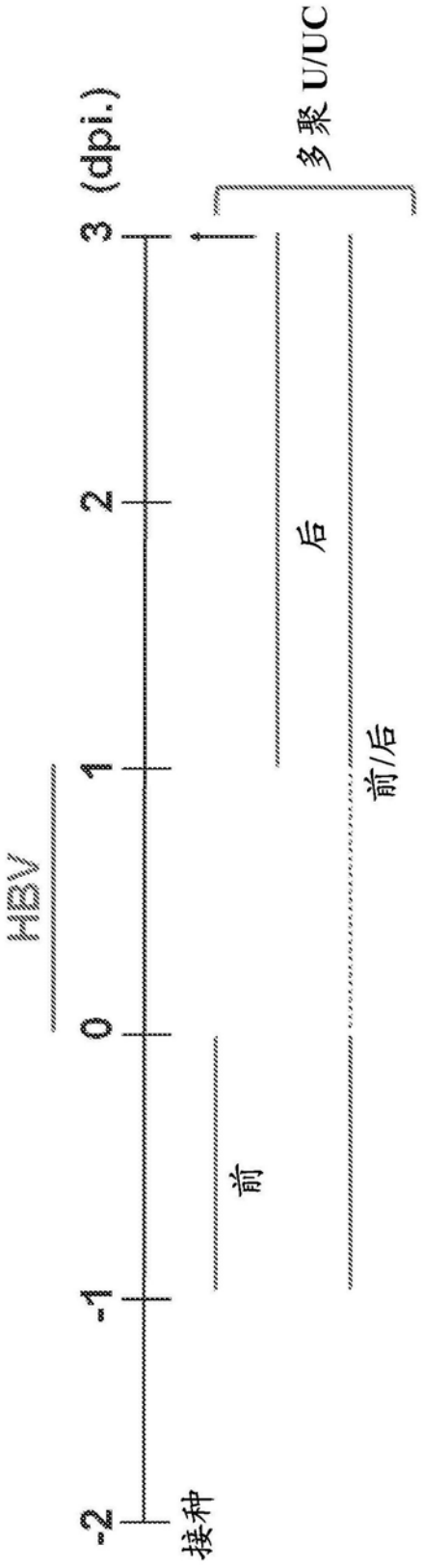


图3A

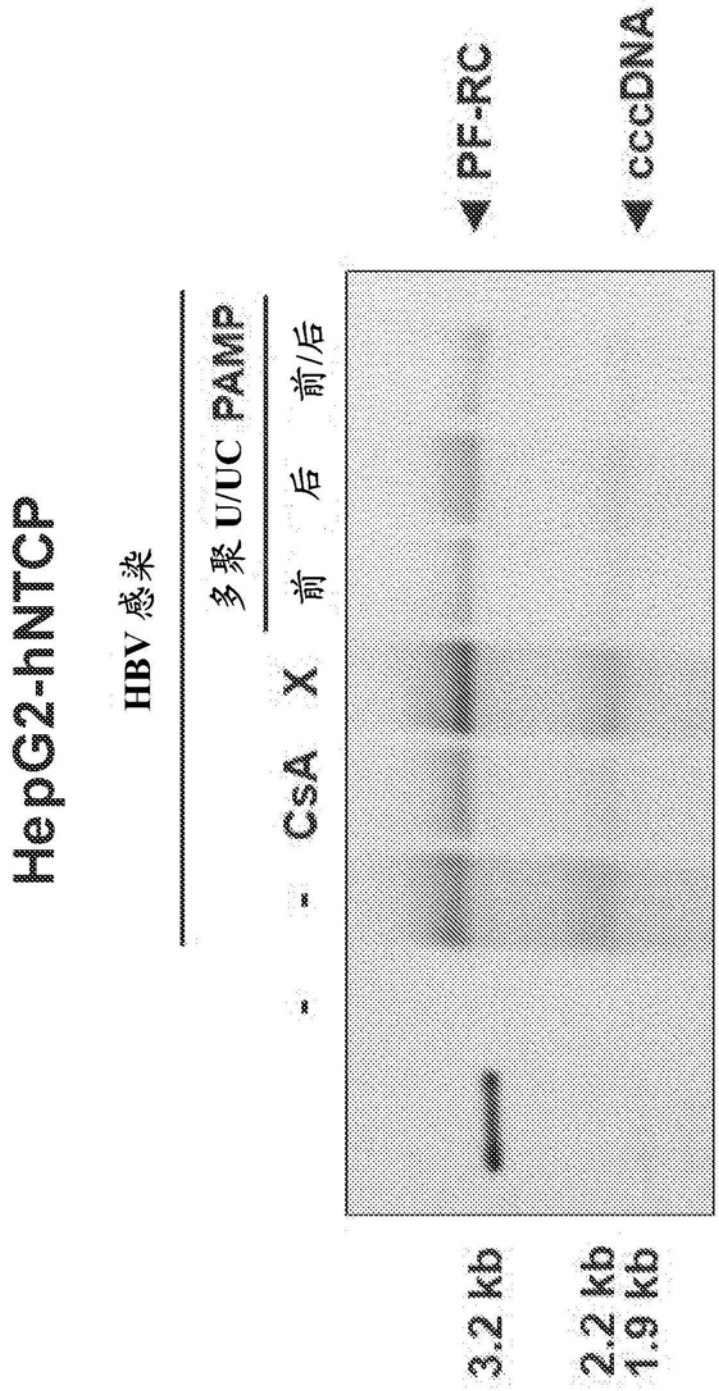

HepG2-hNTCP
HBV 感染
多聚 U/UC PAMP
- - CsA X 前 后 前/后
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb

图3B

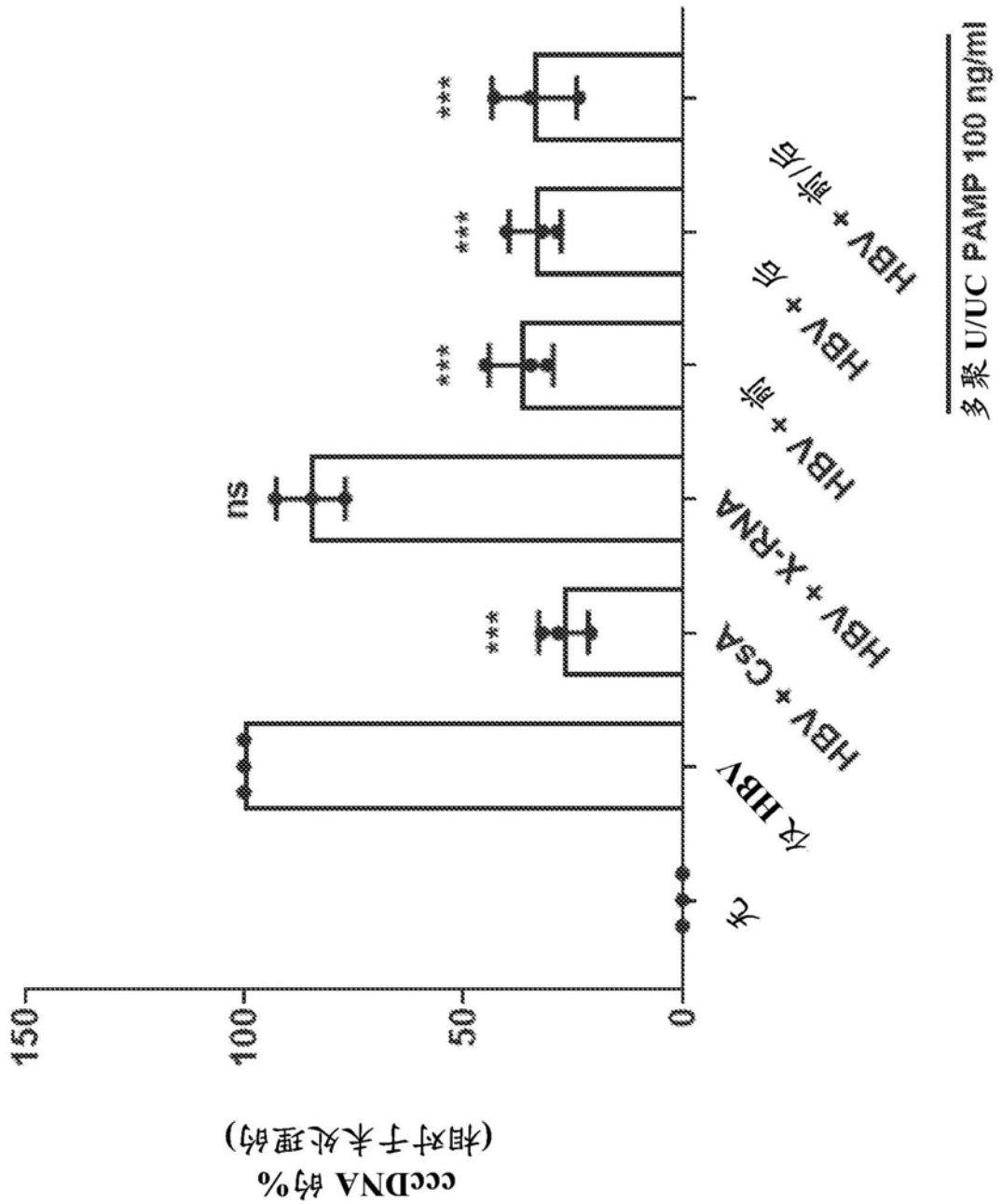

cccDNA 的%
(相对于未处理的)
150
100
50
0
未
仅 HBV
HBV + CSA
HBV + X-RNA
HBV + 聚
HBV + 京
HBV + 索/京
ns
***
多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml

图3B续

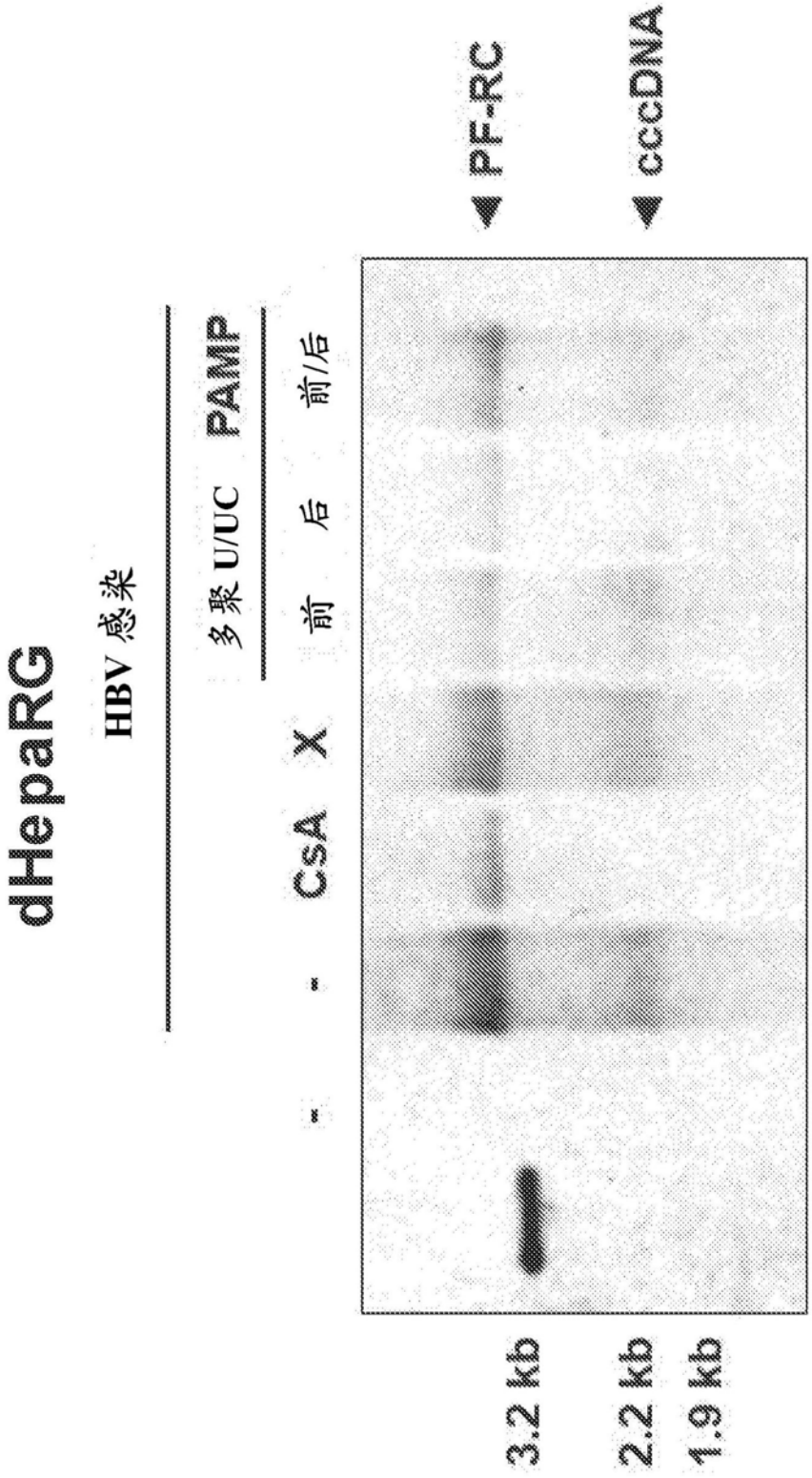

dHepaRG
HBV 感染
多聚 U/UC PAMP
- - CsA X 前 后 前/后
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb

图3C

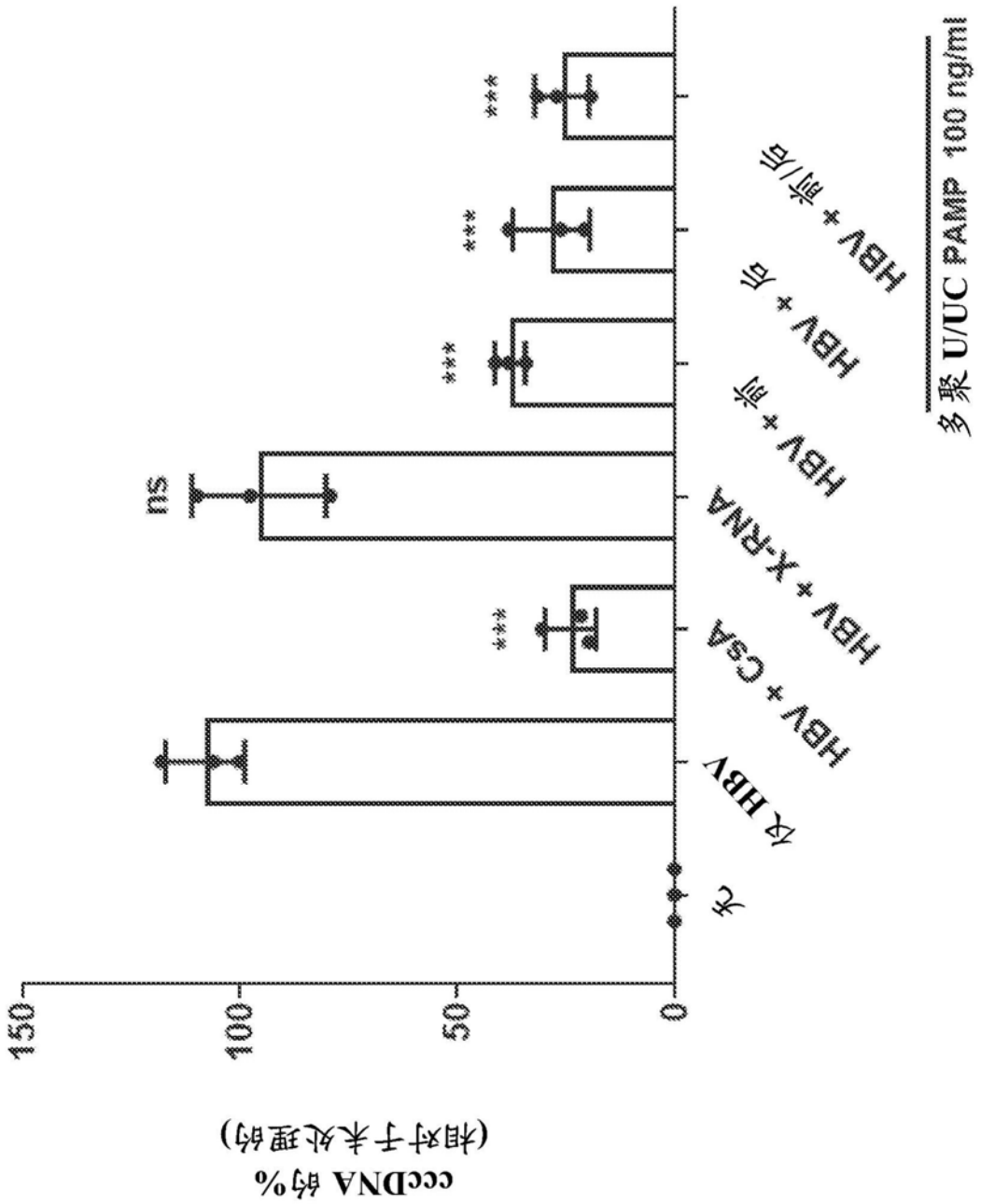

cccDNA 的%
(相对于未处理的)
150
100
50
0
未
仅 HBV
HBV + CsA
HBV + X-RNA
HBV + 靠
HBV + 卓
HBV + 靠/卓
多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
ns
***
***
***
***

图3C续

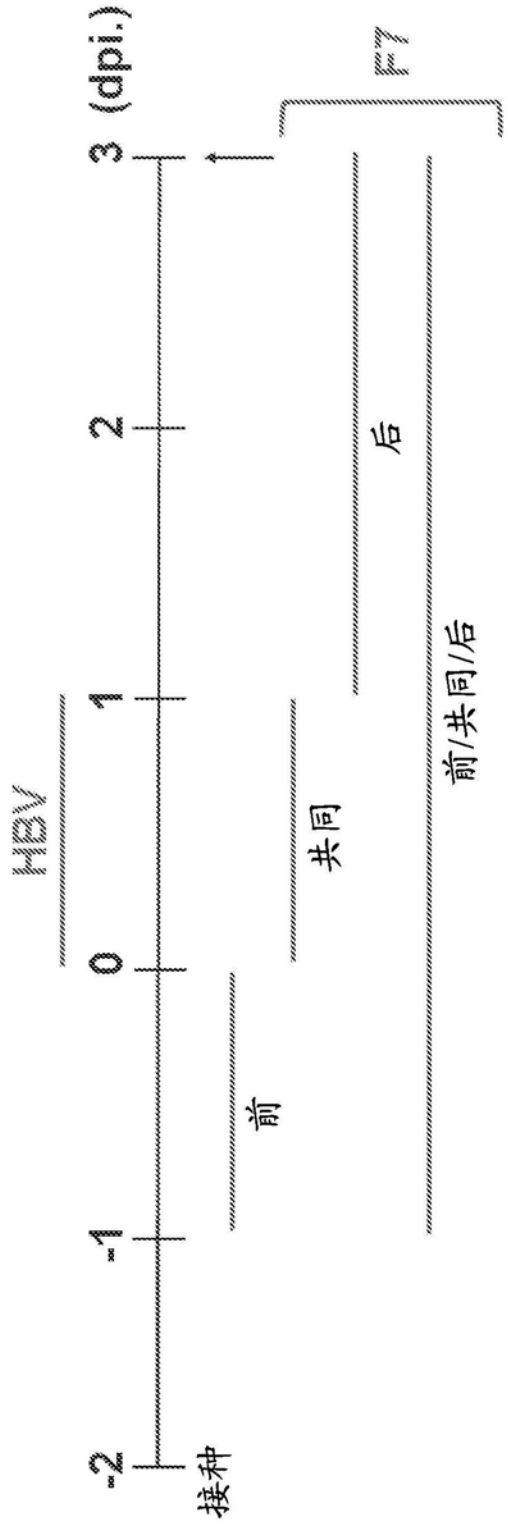


图3D

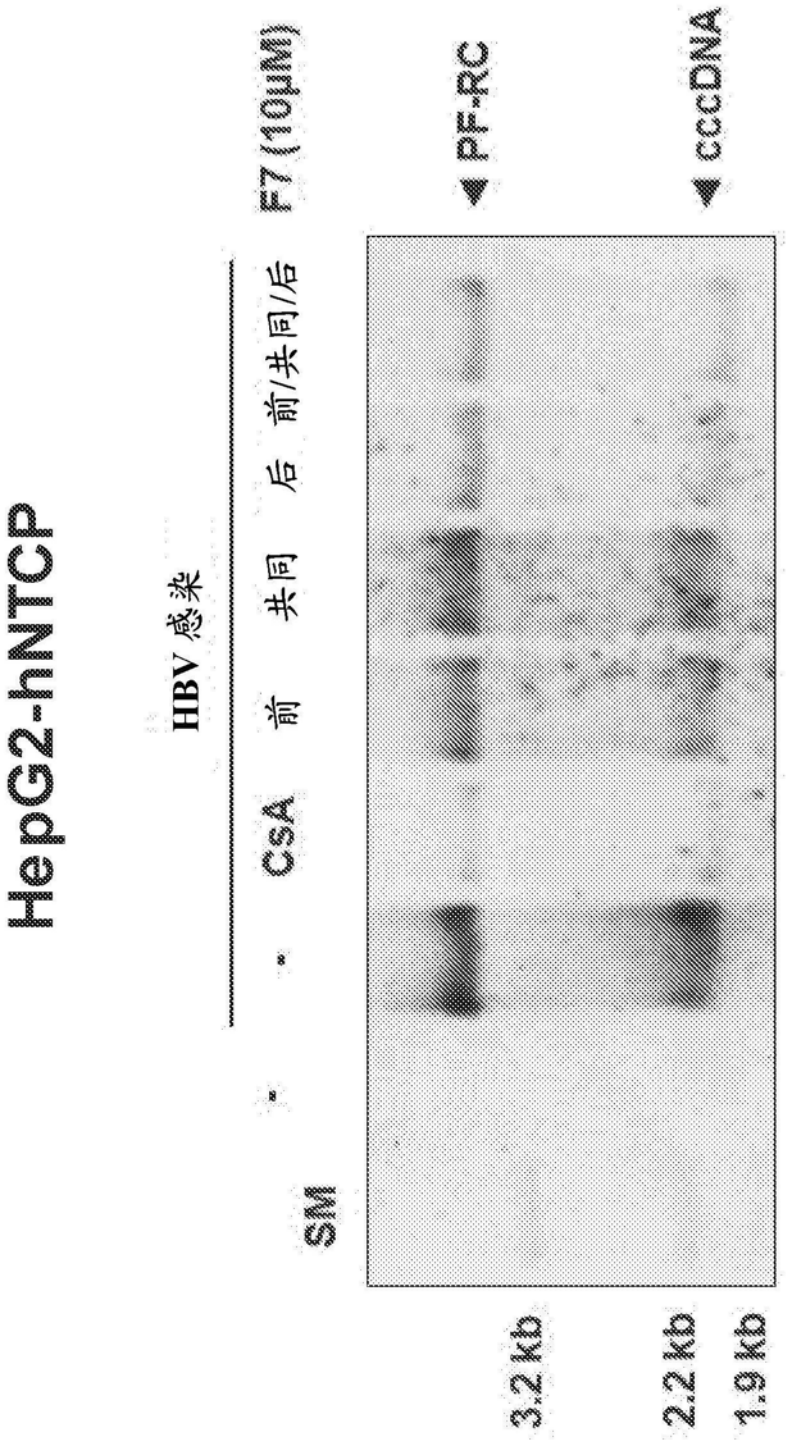

HepG2-hNTCP
HBV 感染
SM
-
-
CsA
前
共同
后
前/共同/后
F7 (10μM)
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb

图3E

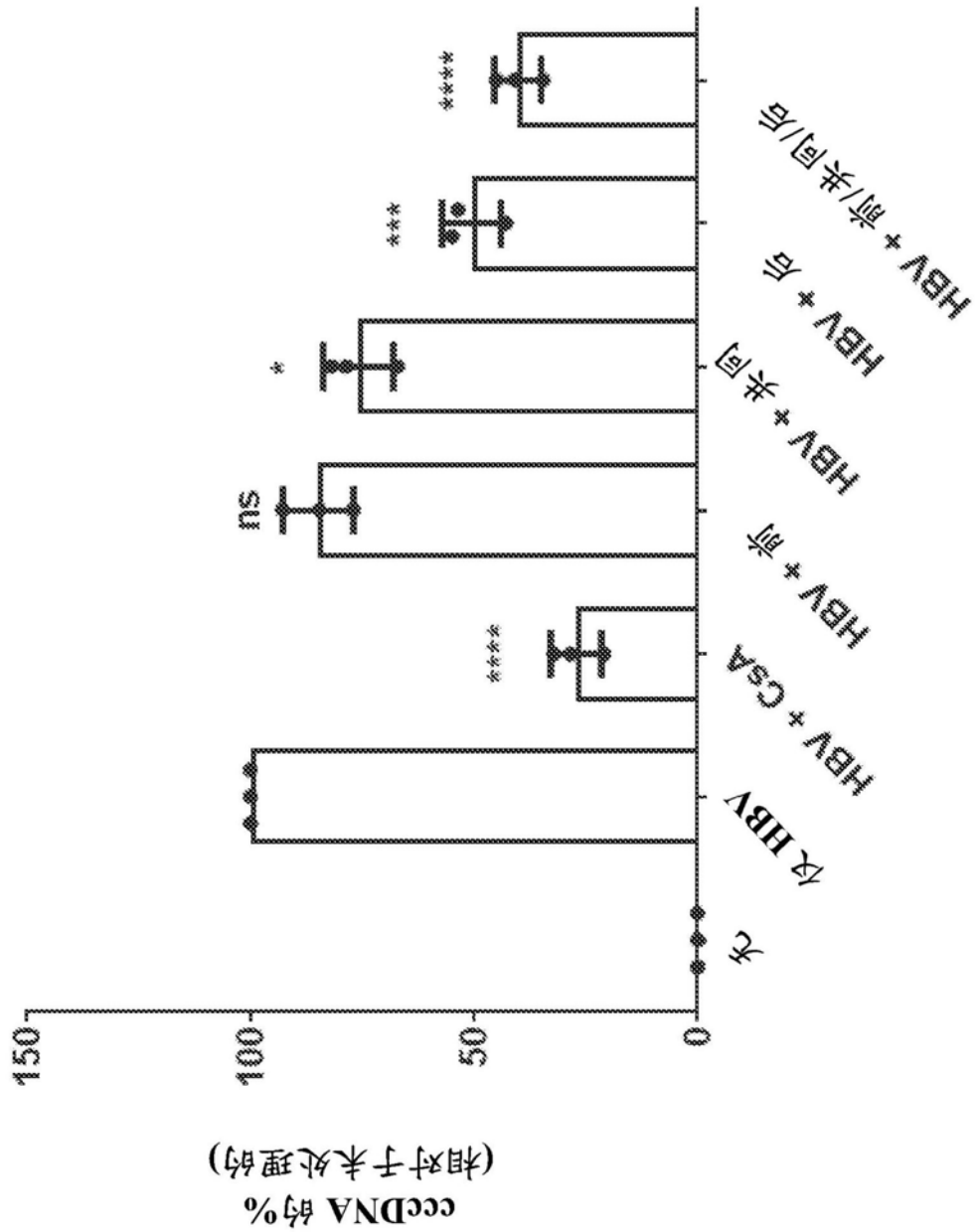

cccDNA 的%
(相对于未处理的)
150
100
50
0
无
仅 HBV
HBV + CsA
HBV + 新
HBV + 来阿
HBV + 布
HBV + 新/来阿/布
****
***
*
ns
****

图3E续

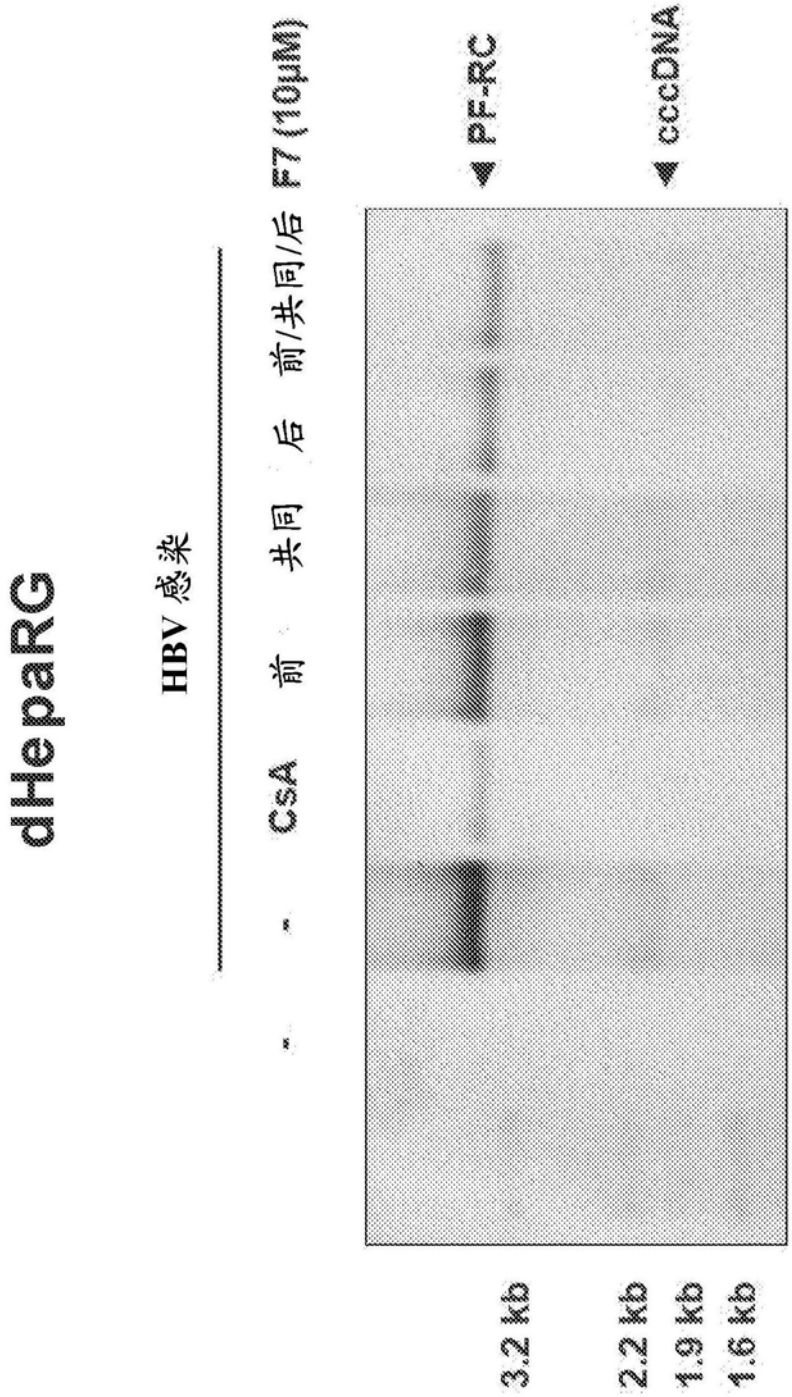

dHepaRG
HBV 感染
- - CsA 前 共同 后 前/共同/后 F7 (10μM)
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb
1.6 kb

图3F

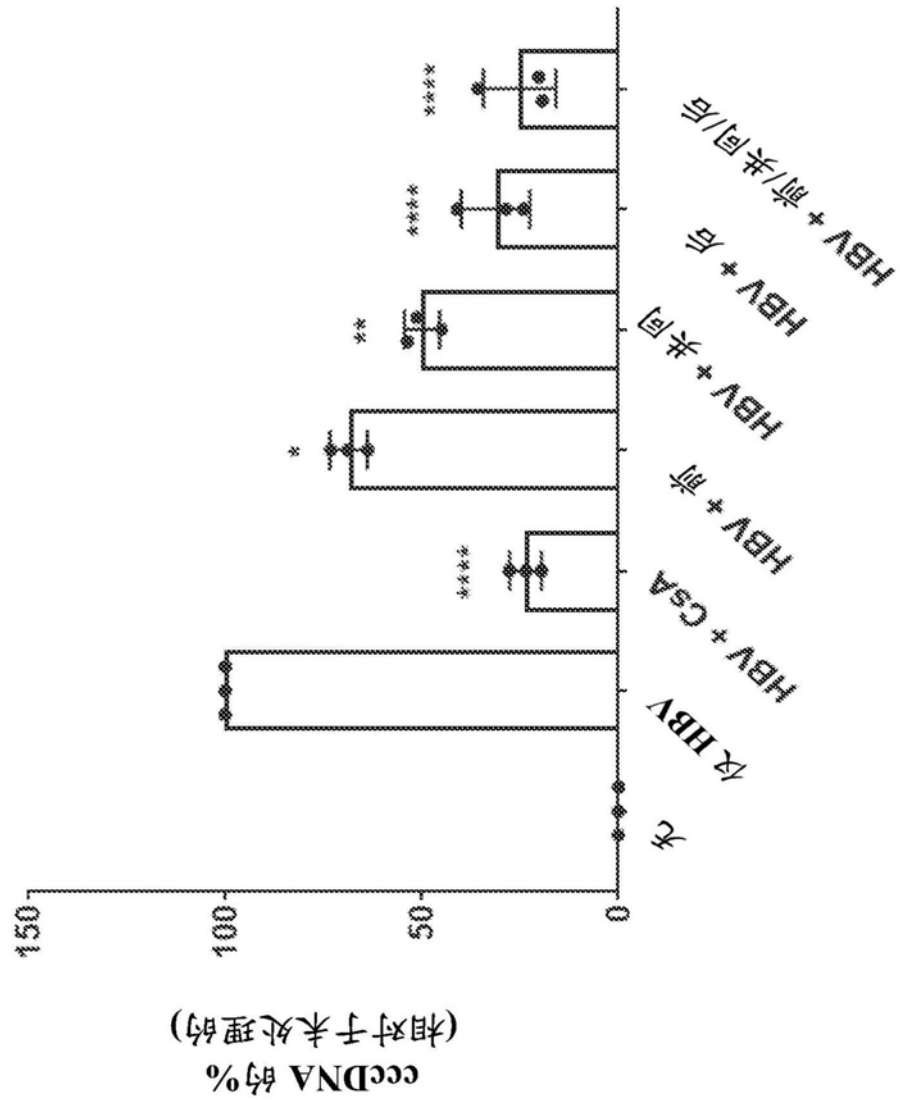

cccDNA 的%
(相对于未处理的)
150
100
50
0
未
仅 HBV
HBV + CsA
HBV + 前
HBV + 未同
HBV + 后
HBV + 前/未同/后
****
**
*
****
****

图3F续

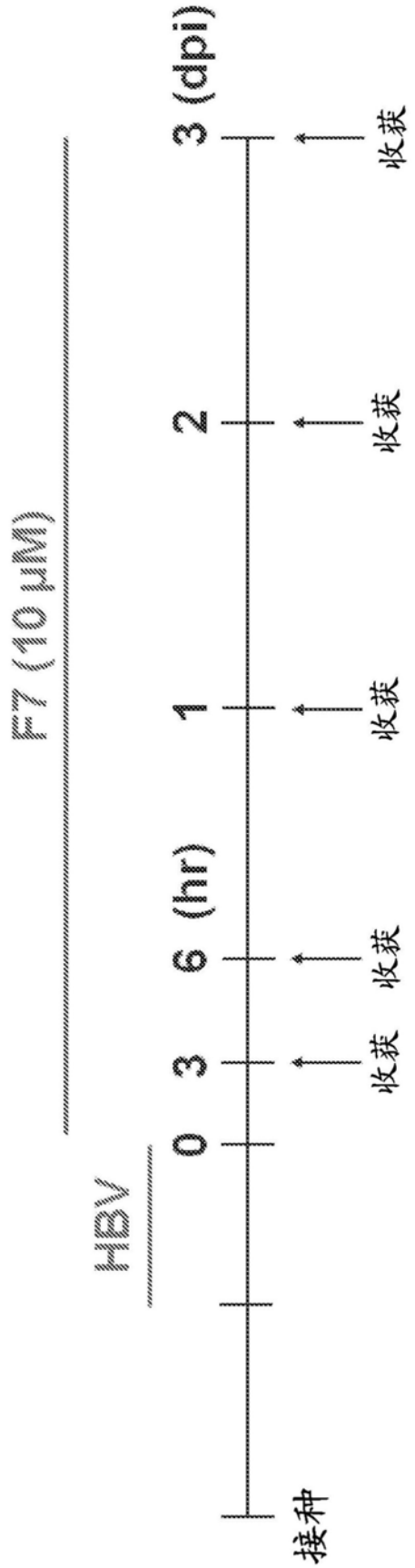


图4A

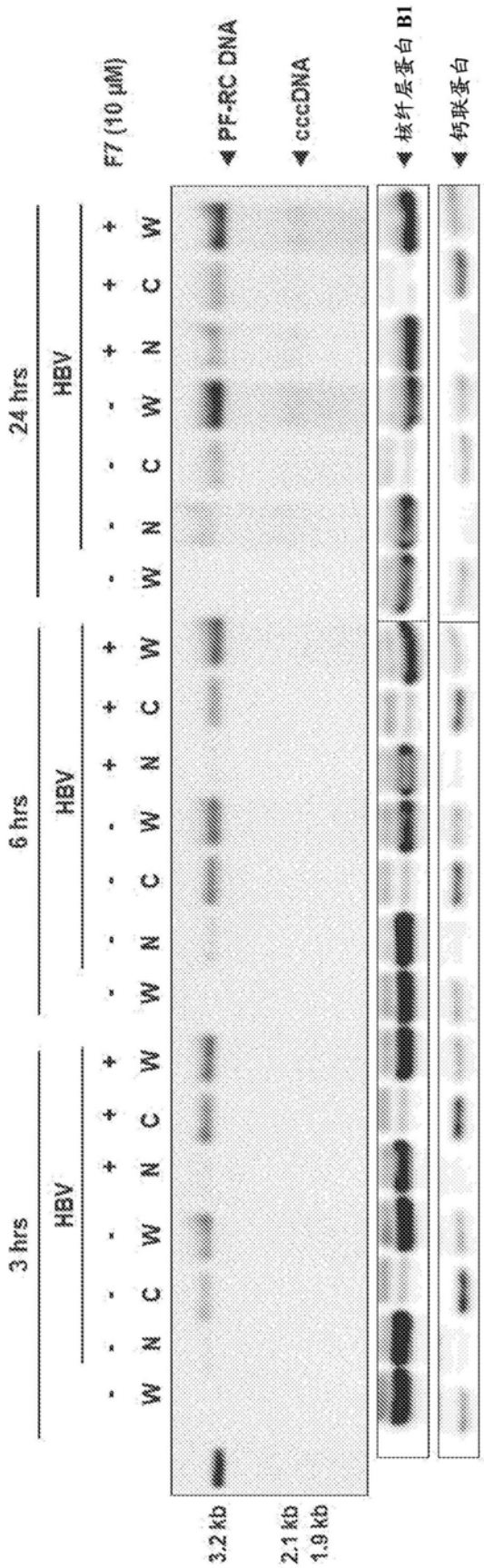

3 hrs
6 hrs
24 hrs
HBV
W N C W N C W
- - - + + + +
F7 (10 μM)
PF-RC DNA
cccDNA
核纤层蛋白 B1
钙联蛋白
3.2 kb
2.1 kb
1.9 kb

图4B

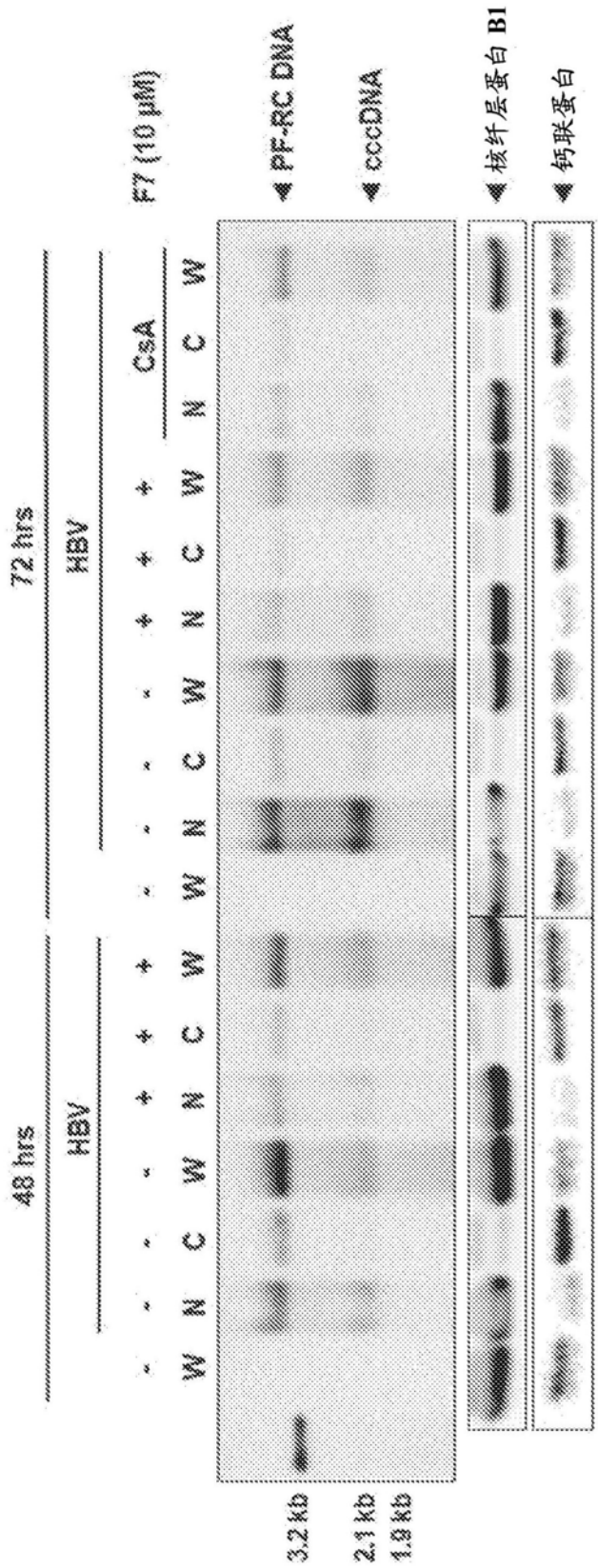

48 hrs
72 hrs
HBV
HBV
CsA
F7 (10 μM)
W N C W N C W N C W N C W N C W
PF-RC DNA
cccDNA
核纤层蛋白 B1
钙联蛋白
3.2 kb
2.1 kb
1.9 kb

图4B续

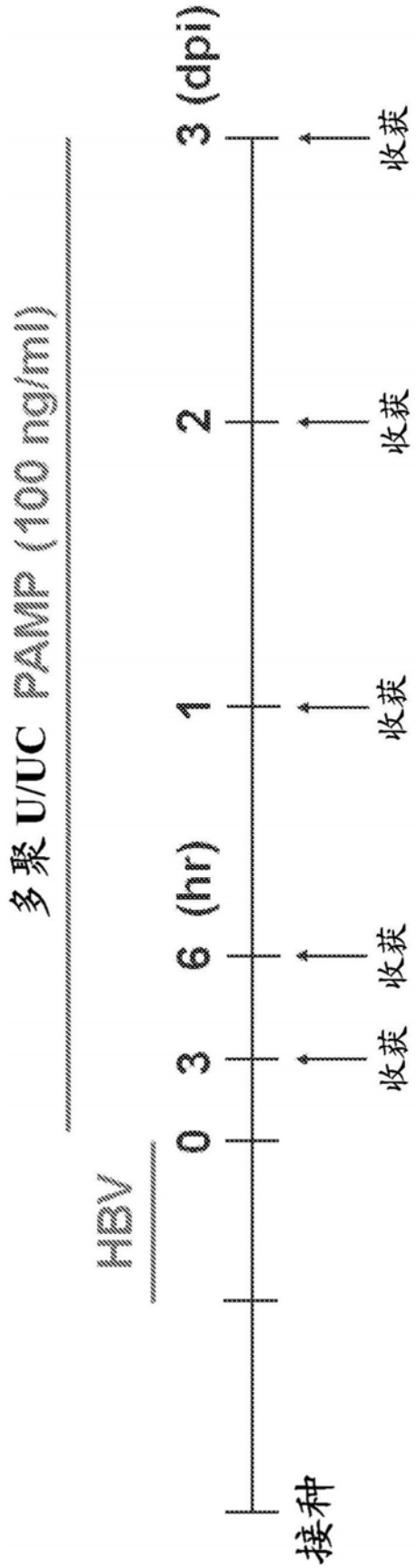


图4C

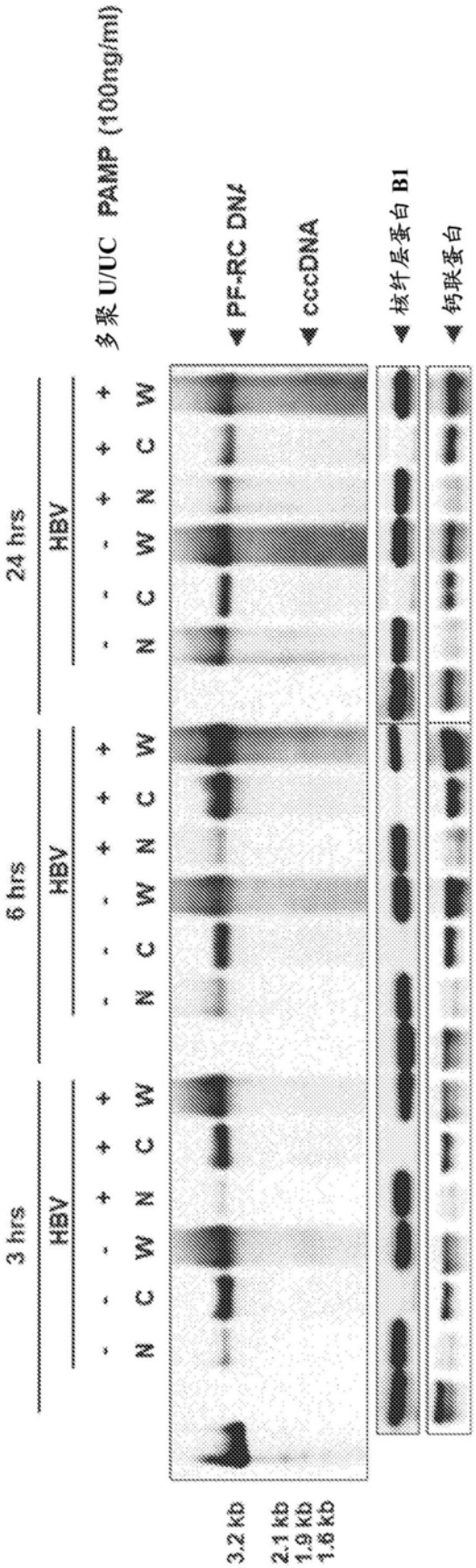

3 hrs
6 hrs
24 hrs
HBV
N C W N C W
- - - + + +
多聚 U/UC PAMP (100ng/ml)
PF-RC DNA
cccDNA
核纤层蛋白 B1
钙联蛋白
3.2 kb
2.1 kb
1.9 kb
1.6 kb

图4D

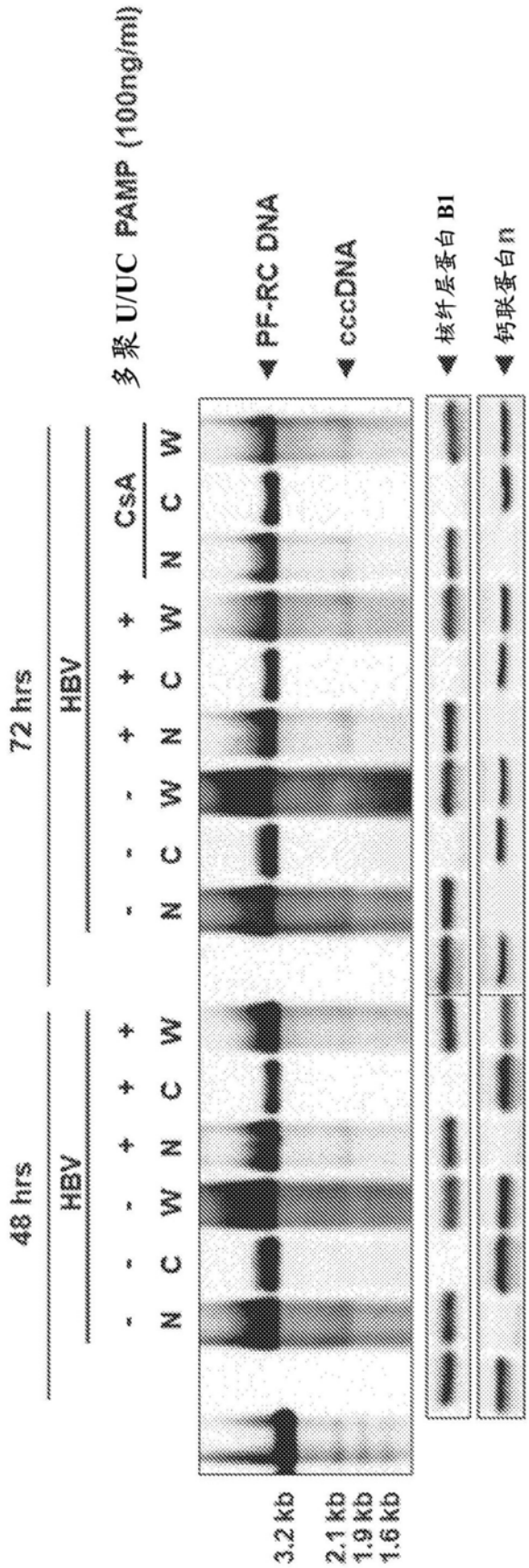

48 hrs
72 hrs
HBV
HBV
CsA
多聚 U/UC PAMP (100ng/ml)
N C W N C W
- - - + + + - - - + + +
N C W N C W
- - - + + +
PF-RC DNA
cccDNA
核纤层蛋白 B1
钙联蛋白 n
3.2 kb
2.1 kb
1.9 kb
1.6 kb

图4D续

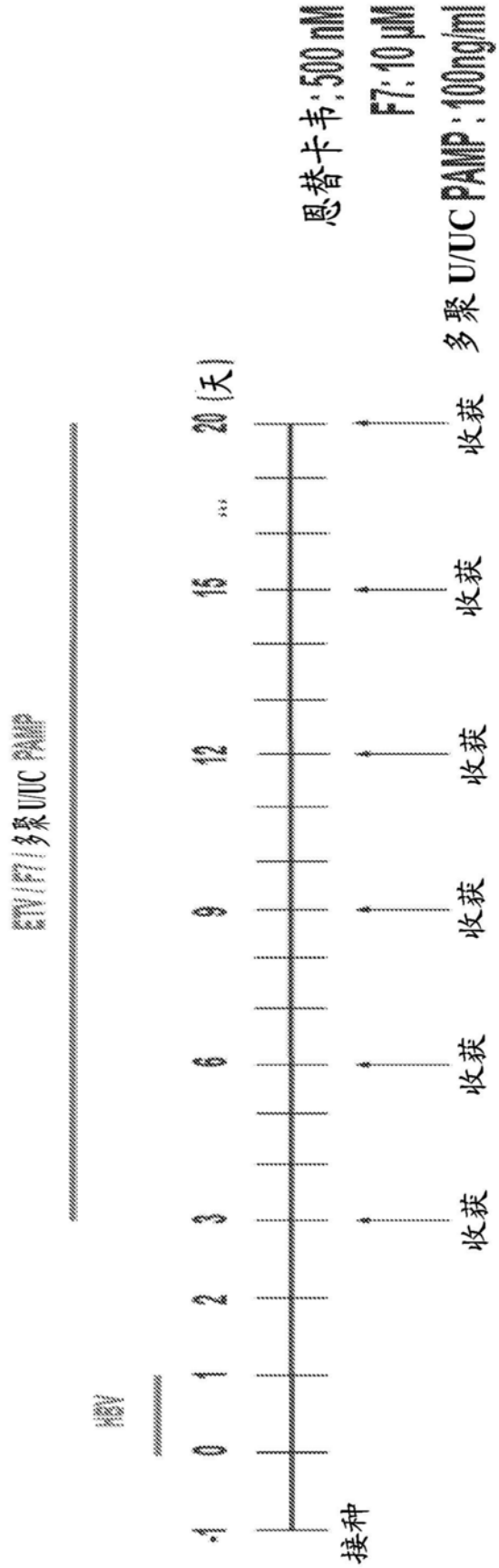

恩替卡韦;500 nM
F7;10 μM
多聚 U/UC PAMP;100ng/ml
-1
0
1
2
3
6
9
12
16
20(天)
接种
收获
收获
收获
收获
收获
ETV/F7/多聚U/UC PAMP

图5A

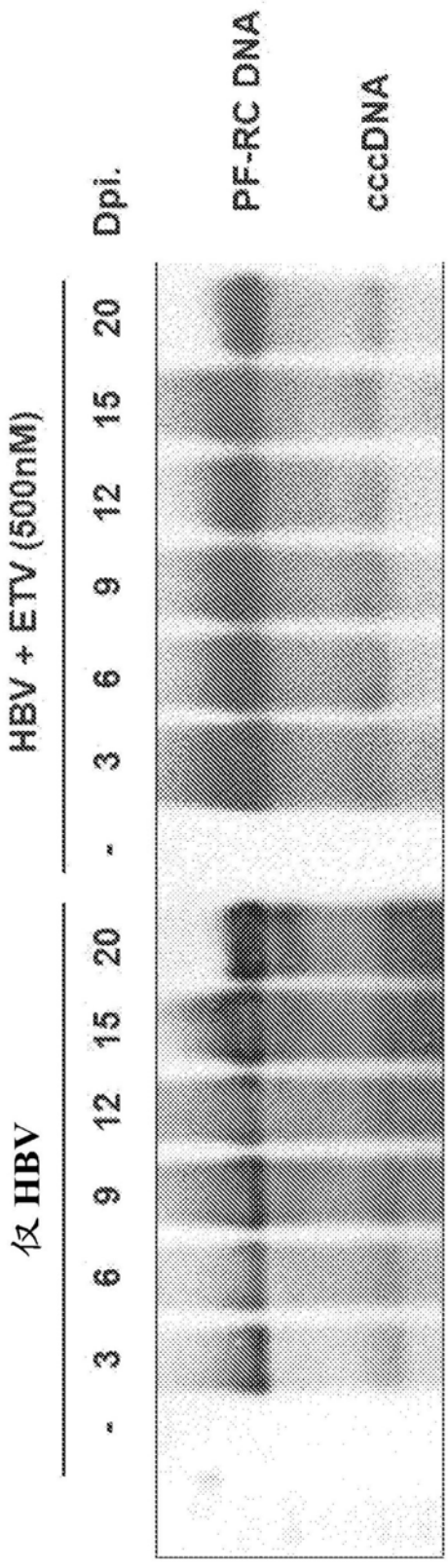


图5B

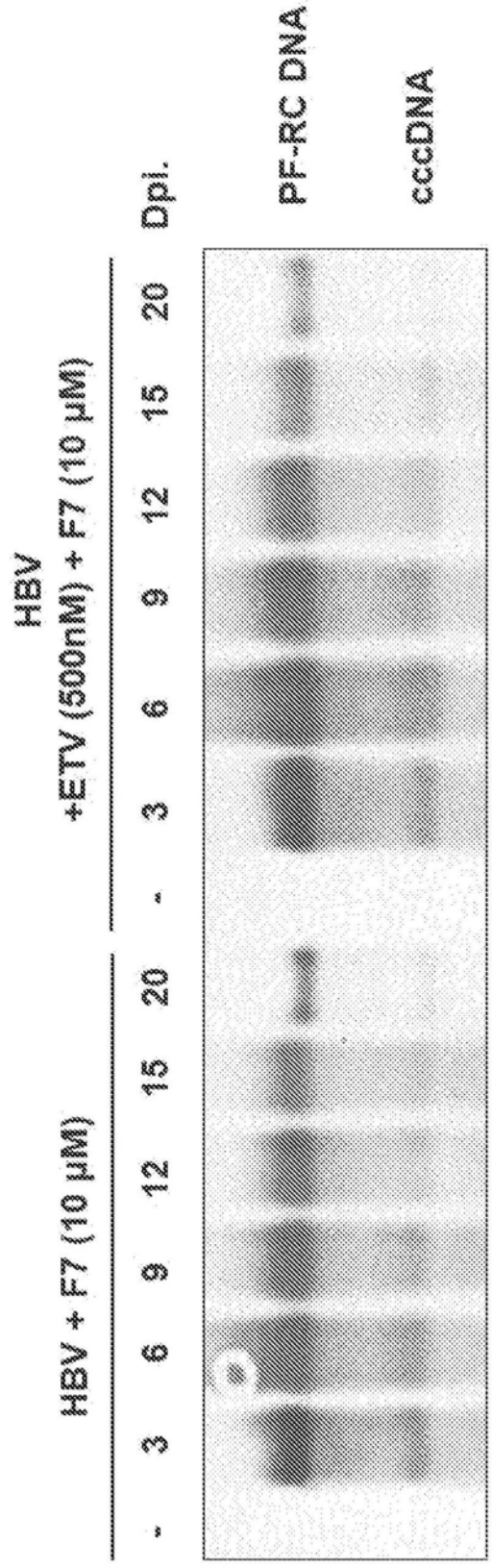

HBV
HBV + F7 (10 μM)
+ETV (500nM) + F7 (10 μM)
Dpi.
-
3
6
9
12
15
20
PF-RC DNA
cccDNA

图5B续

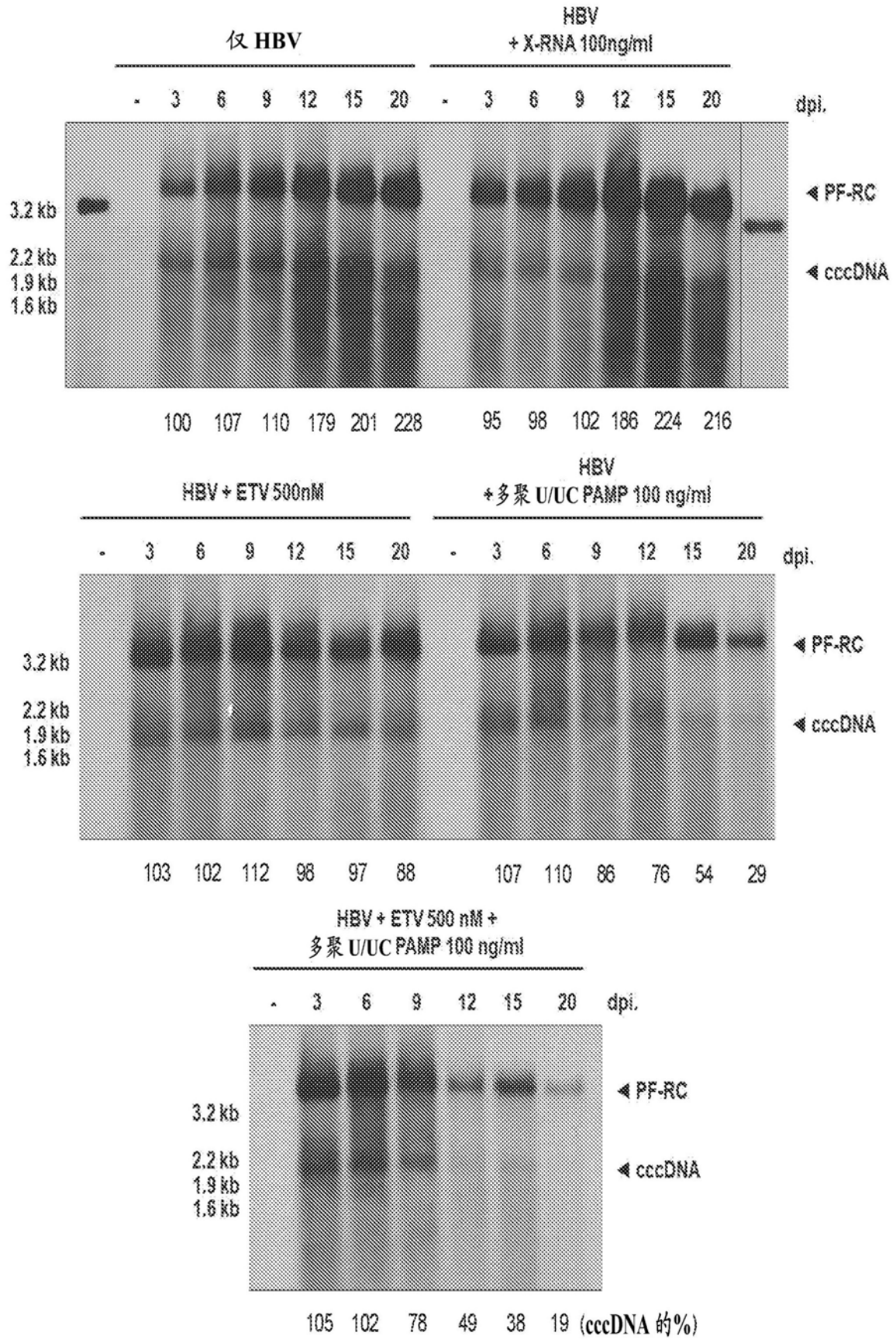

仅 HBV
HBV
+ X-RNA 100ng/ml
- 3 6 9 12 15 20 - 3 6 9 12 15 20 dpi.
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb
1.6 kb
◀ PF-RC
◀ cccDNA
100 107 110 179 201 228 95 98 102 186 224 216
HBV + ETV 500nM
HBV
+多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
- 3 6 9 12 15 20 - 3 6 9 12 15 20 dpi.
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb
1.6 kb
◀ PF-RC
◀ cccDNA
103 102 112 98 97 88 107 110 86 76 54 29
HBV + ETV 500 nM +
多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
- 3 6 9 12 15 20 dpi.
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb
1.6 kb
◀ PF-RC
◀ cccDNA
105 102 78 49 38 19 (cccDNA 的%)

图5C

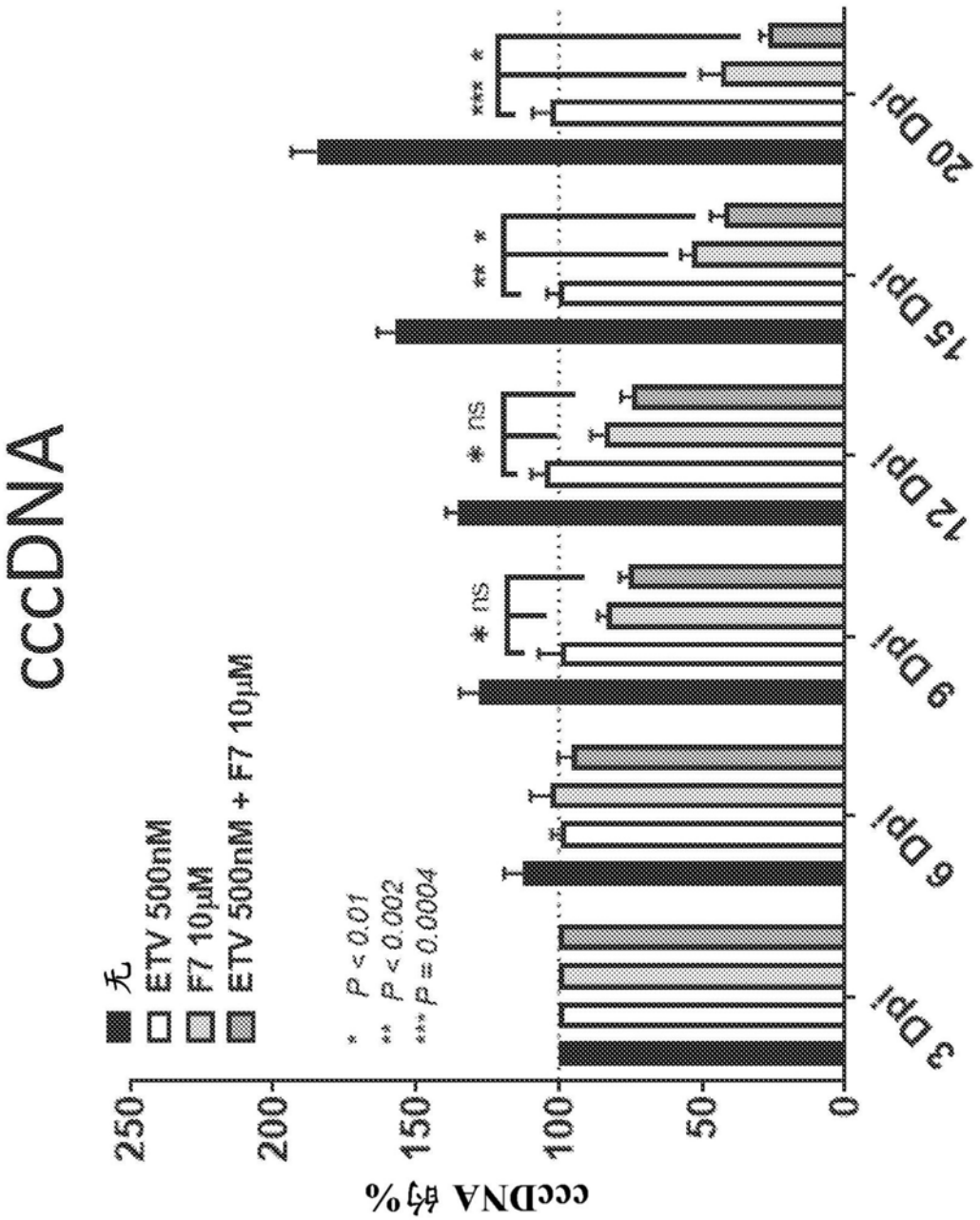

cccDNA
无
ETV 500nM
F7 10μM
ETV 500nM + F7 10μM
* P < 0.01
** P < 0.002
*** P = 0.0004
cccDNA 的%
250
200
150
100
50
0
3 DPI
6 DPI
9 DPI
12 DPI
15 DPI
20 DPI
ns
*
**
***

图5D

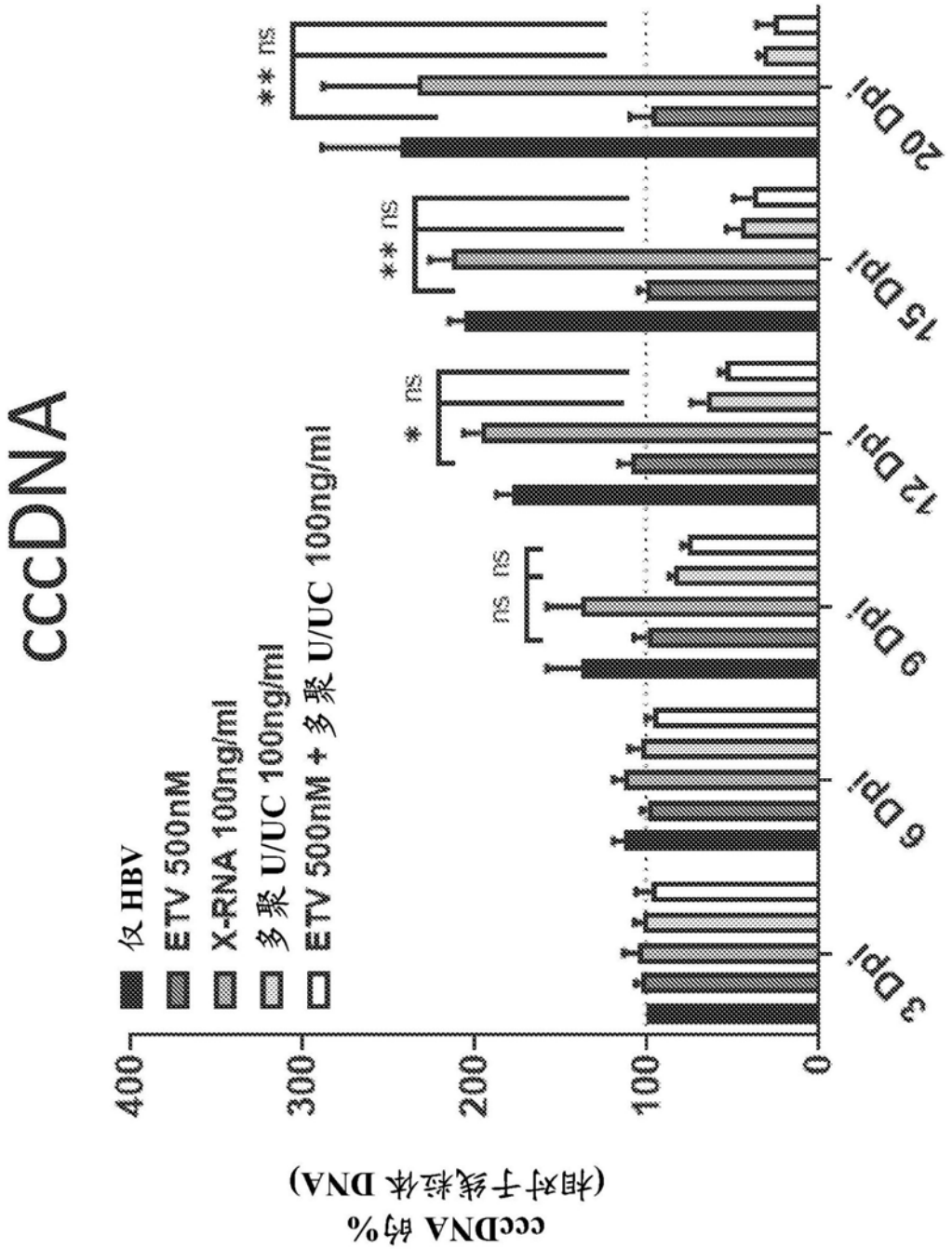

cccDNA
仅 HBV
ETV 500nM
X-RNA 100ng/ml
多聚 U/UC 100ng/ml
ETV 500nM + 多聚 U/UC 100ng/ml
cccDNA 的%
(相对于线粒体 DNA)
400
300
200
100
0
3 DPI
6 DPI
9 DPI
12 DPI
15 DPI
20 DPI
ns
*
**

图5D续

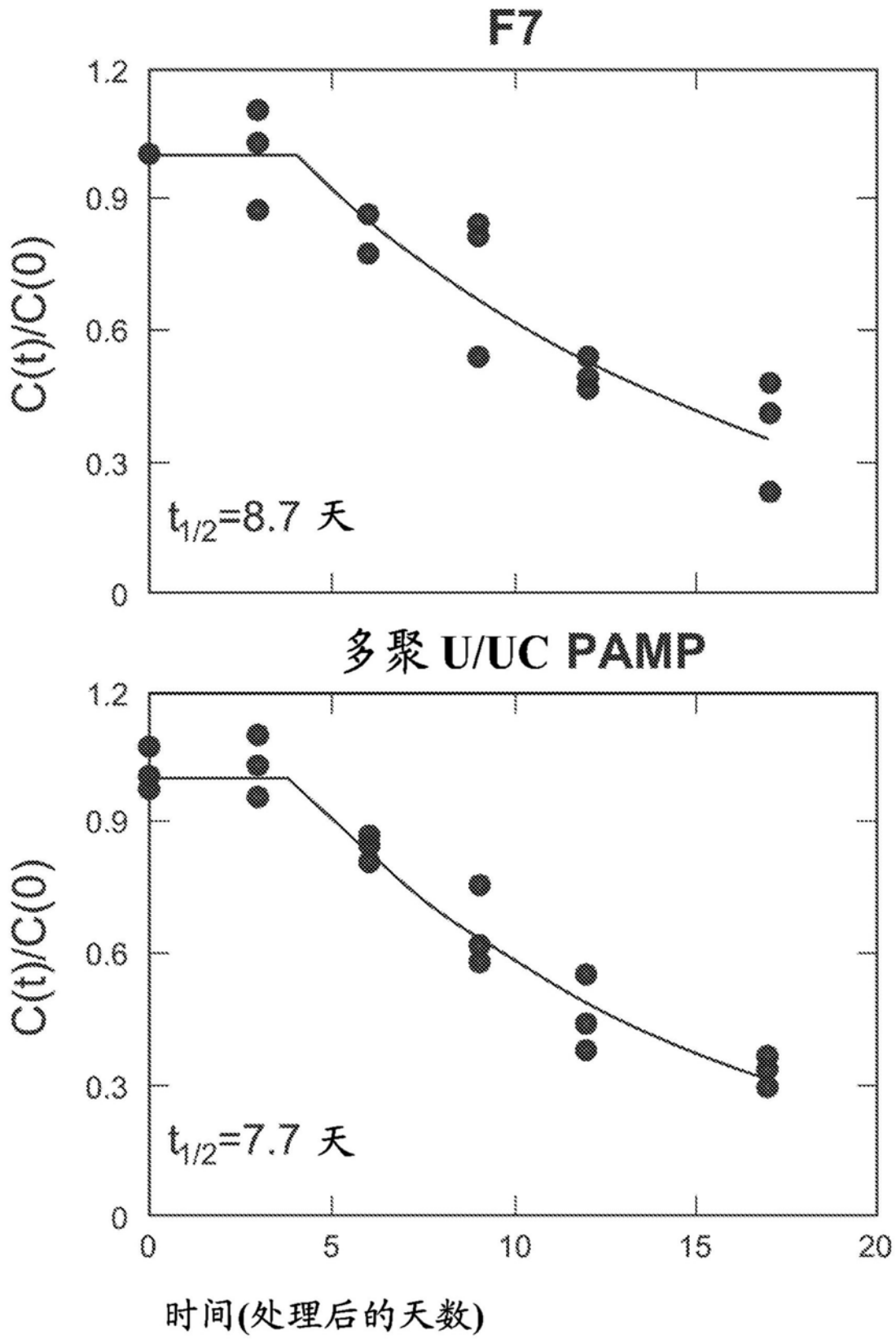

F7
C(t)/C(0)
1.2
0.9
0.6
0.3
0
$t_{1/2}$=8.7 天
多聚 U/UC PAMP
C(t)/C(0)
1.2
0.9
0.6
0.3
0
$t_{1/2}$=7.7 天
0
5
10
15
20
时间(处理后的天数)

图5E

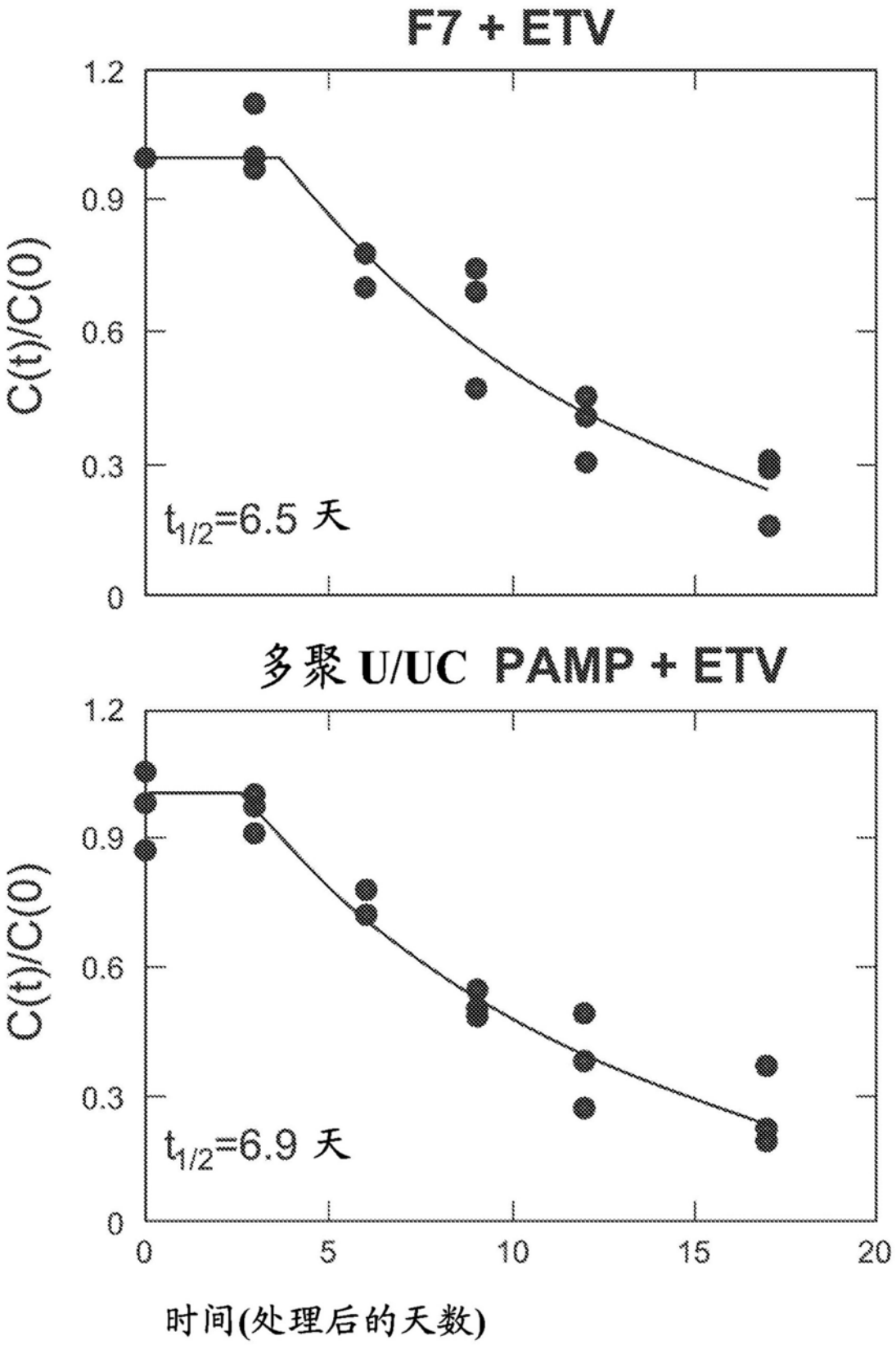

F7 + ETV
C(t)/C(0)
1.2
0.9
0.6
0.3
0
$t_{1/2}$=6.5 天
多聚 U/UC PAMP + ETV
C(t)/C(0)
1.2
0.9
0.6
0.3
0
$t_{1/2}$=6.9 天
0
5
10
15
20
时间(处理后的天数)

图5E续

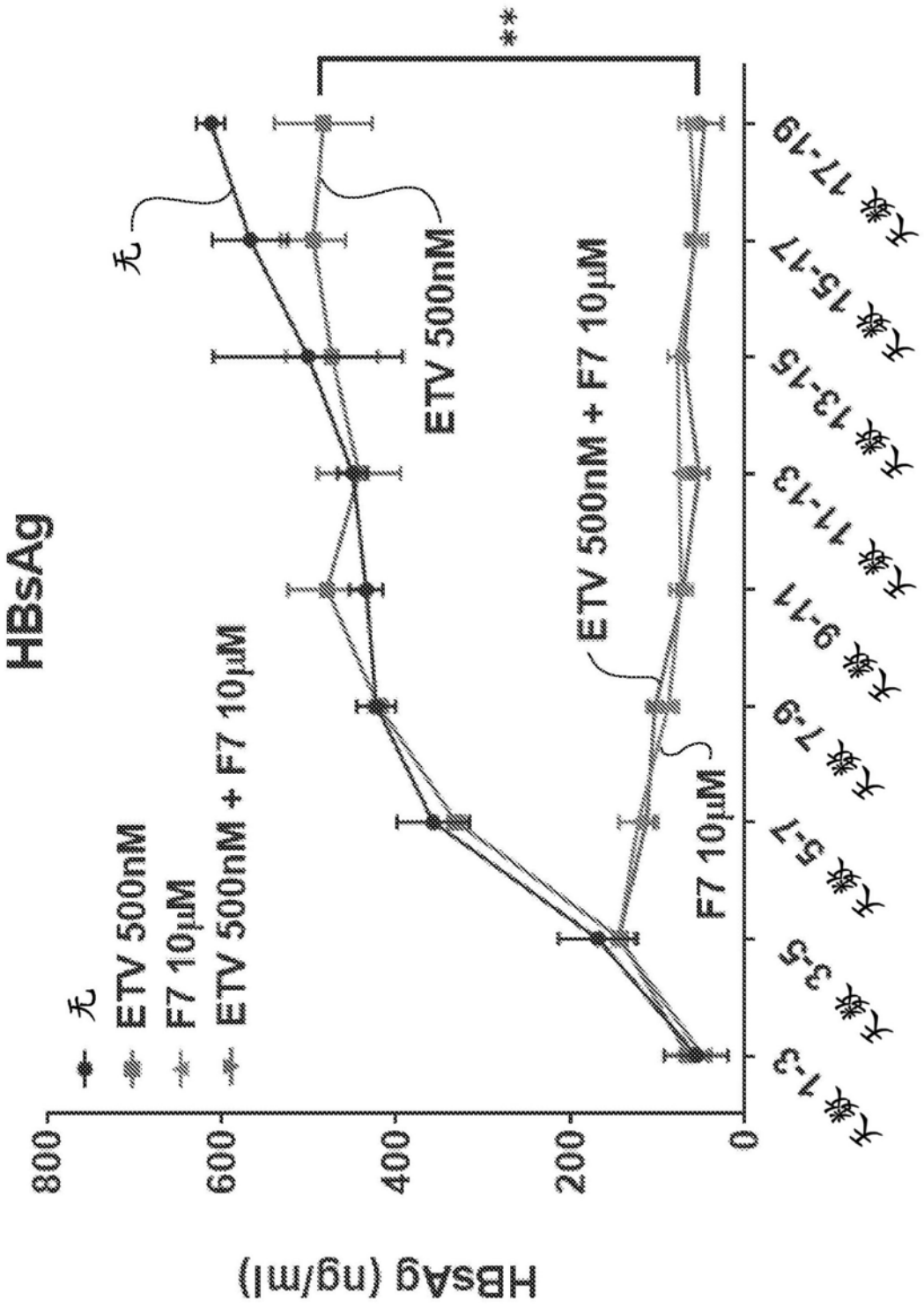

HBsAg
无
ETV 500nM
F7 10μM
ETV 500nM + F7 10μM
HBsAg (ng/ml)
800
600
400
200
0
**
ETV 500nM
ETV 500nM + F7 10μM
F7 10μM
实施 1-3
实施 3-5
实施 5-7
实施 7-9
实施 9-11
实施 11-13
实施 13-15
实施 15-17
实施 17-19

图5F

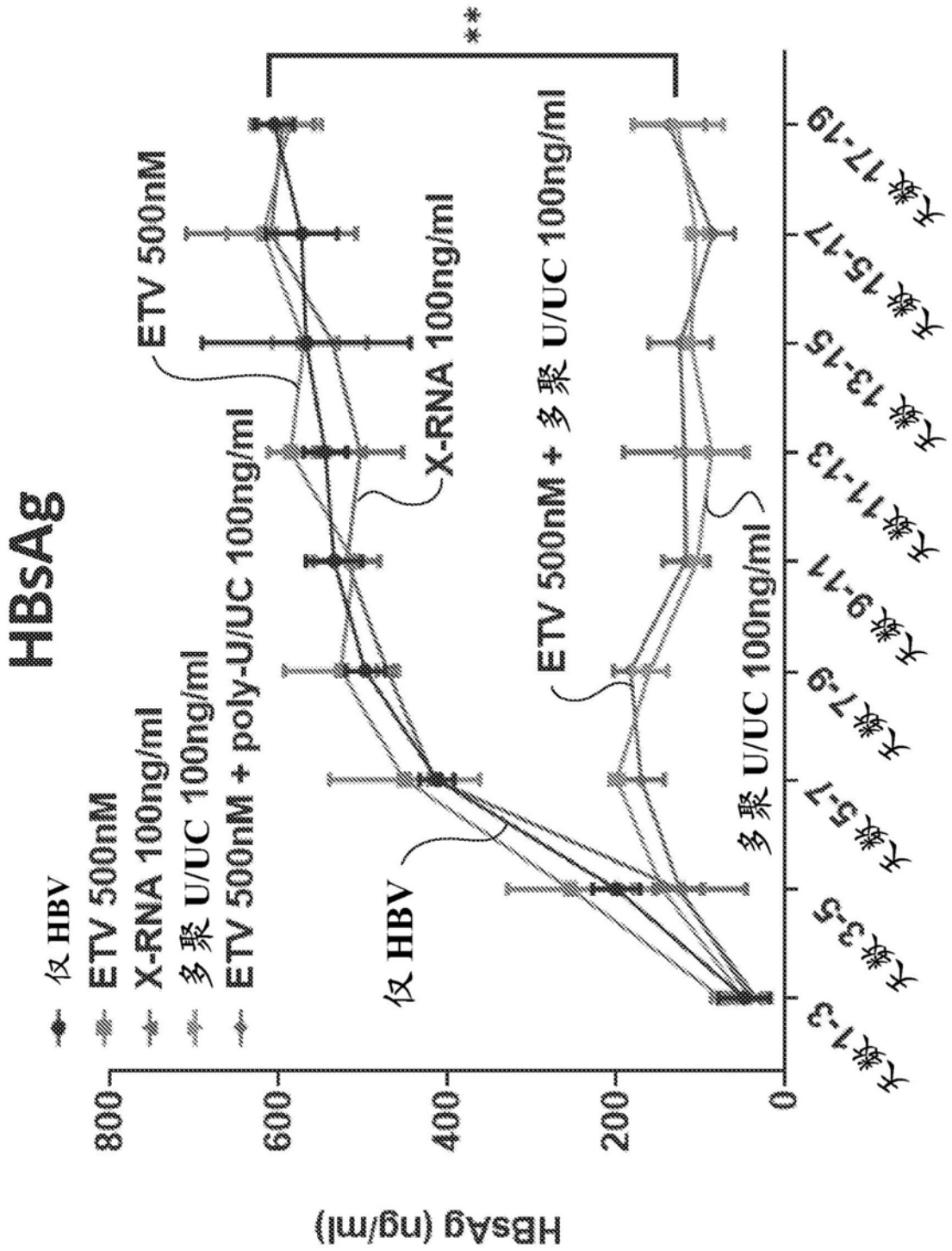

HBsAg
仅 HBV
ETV 500nM
X-RNA 100ng/ml
多聚 U/UC 100ng/ml
ETV 500nM + poly-U/UC 100ng/ml
HBsAg (ng/ml)
800
600
400
200
0
**
ETV 500nM
X-RNA 100ng/ml
仅 HBV
ETV 500nM + 多聚 U/UC 100ng/ml
多聚 U/UC 100ng/ml
天数1-3
天数3-5
天数5-7
天数7-9
天数9-11
天数11-13
天数13-15
天数15-17
天数17-19

图5F续

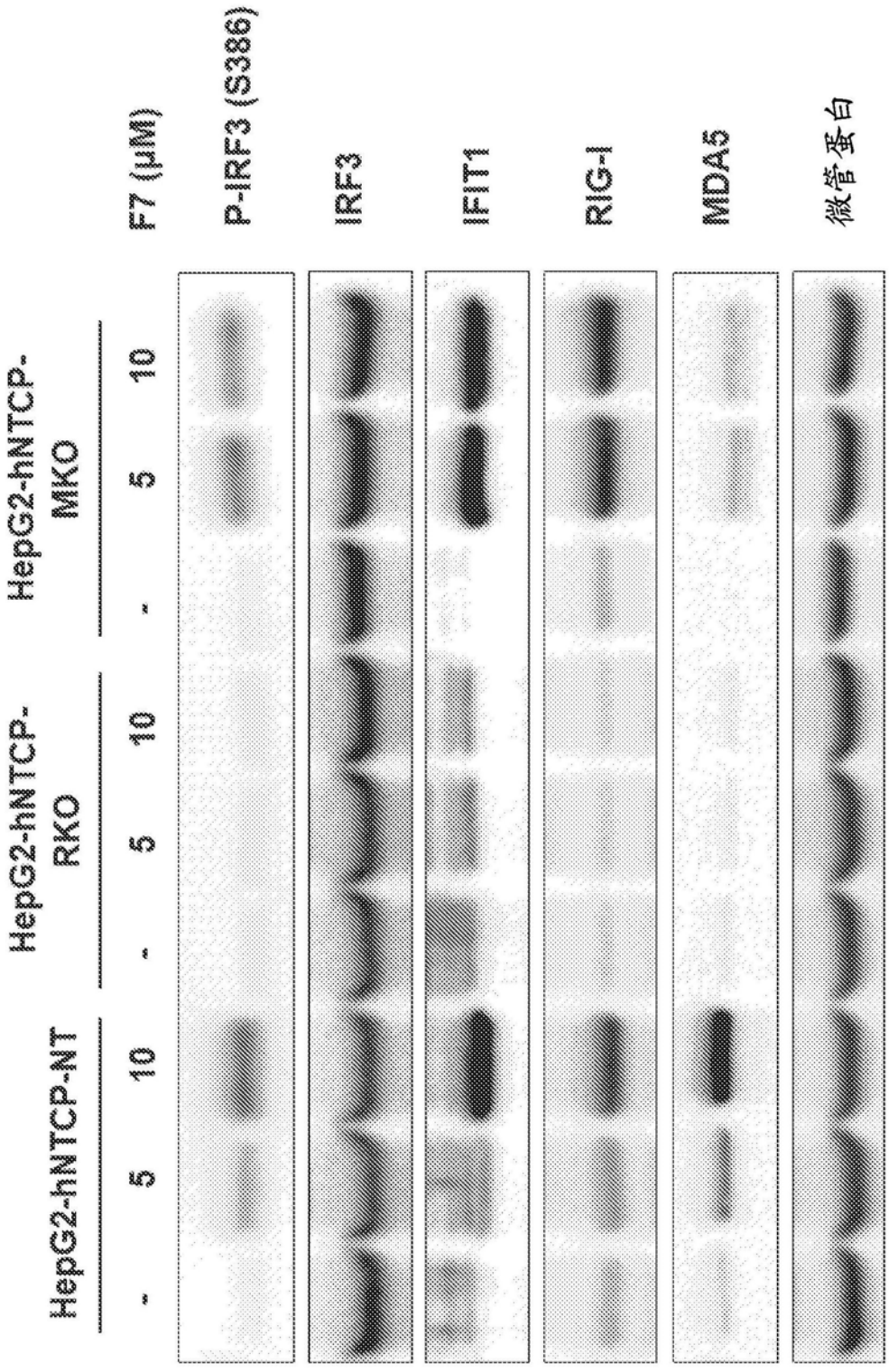

HepG2-hNTCP-NT
HepG2-hNTCP-RKO
HepG2-hNTCP-MKO
F7 (μM)
- 5 10 - 5 10 - 5 10
P-IRF3 (S386)
IRF3
IFIT1
RIG-I
MDA5
微管蛋白

图6A

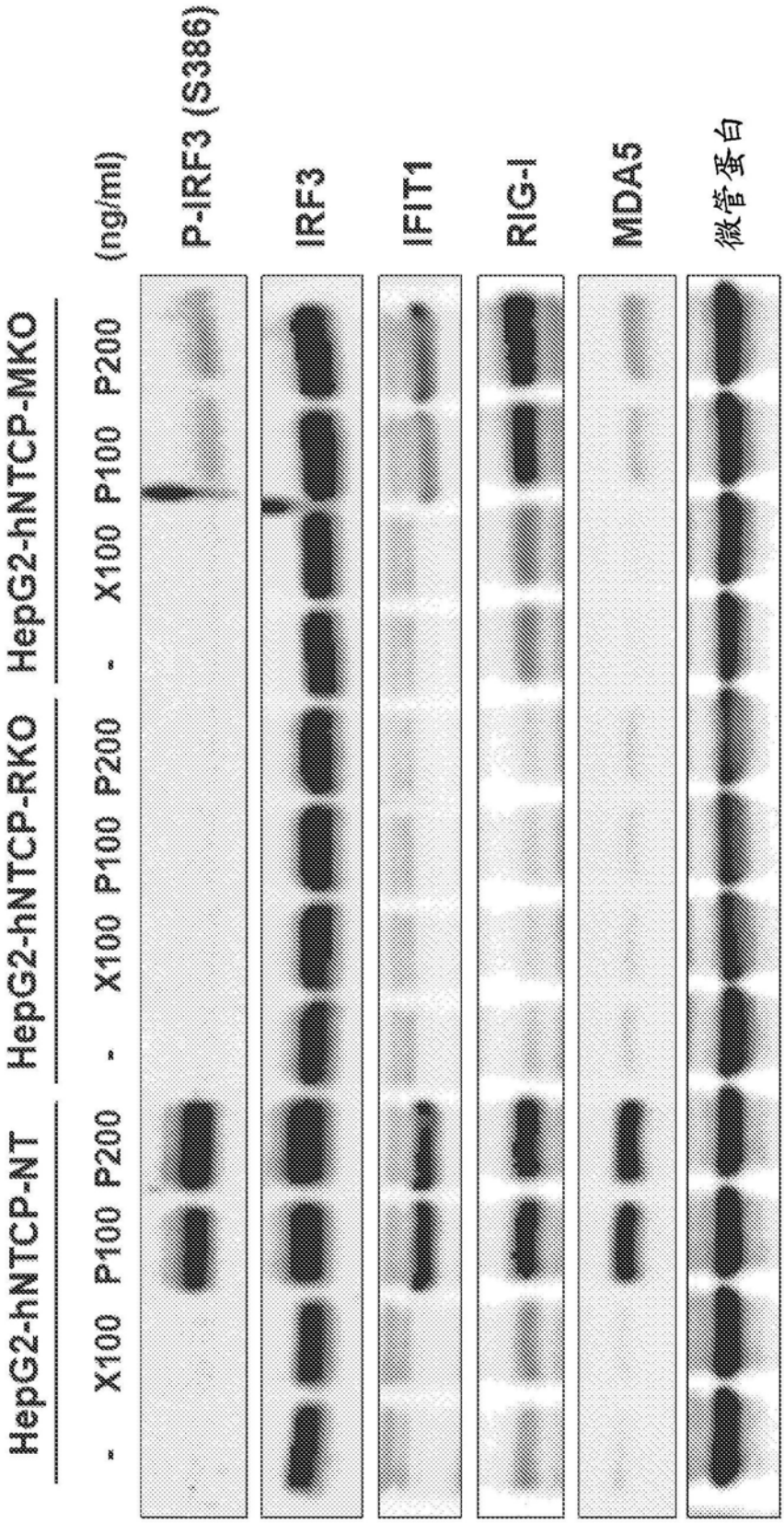

HepG2-hNTCP-NT
HepG2-hNTCP-RKO
HepG2-hNTCP-MKO
- X100 P100 P200 - X100 P100 P200 - X100 P100 P200 (ng/ml)
P-IRF3 (S386)
IRF3
IFIT1
RIG-I
MDA5
微管蛋白

图6B

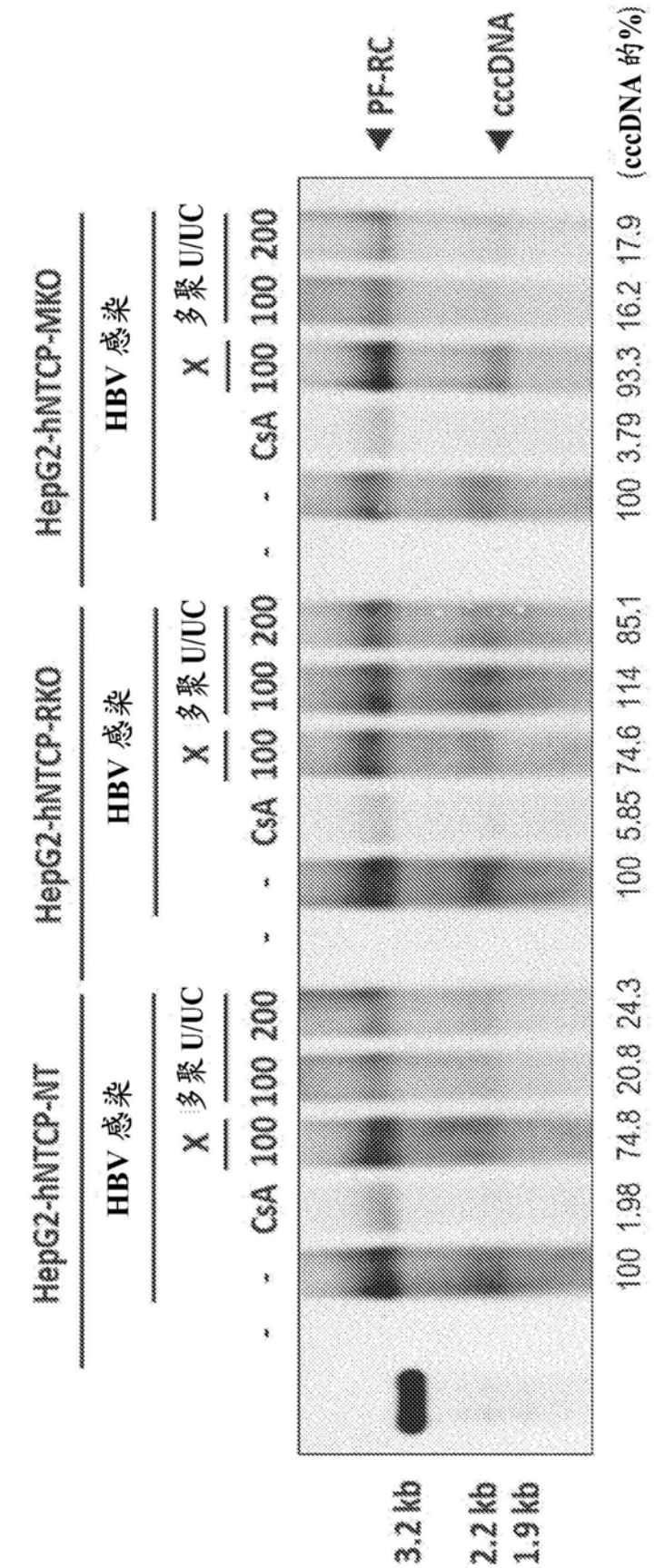

HepG2-hNTCP-NT
HepG2-hNTCP-RKO
HepG2-hNTCP-MKO
HBV 感染
X 多聚 U/UC
- - CsA 100 100 200 - - CsA 100 100 200 - - CsA 100 100 200
100 1.98 74.8 20.8 24.3 100 5.85 74.6 114 85.1 100 3.79 93.3 16.2 17.9 (cccDNA 的%)
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb

图6C

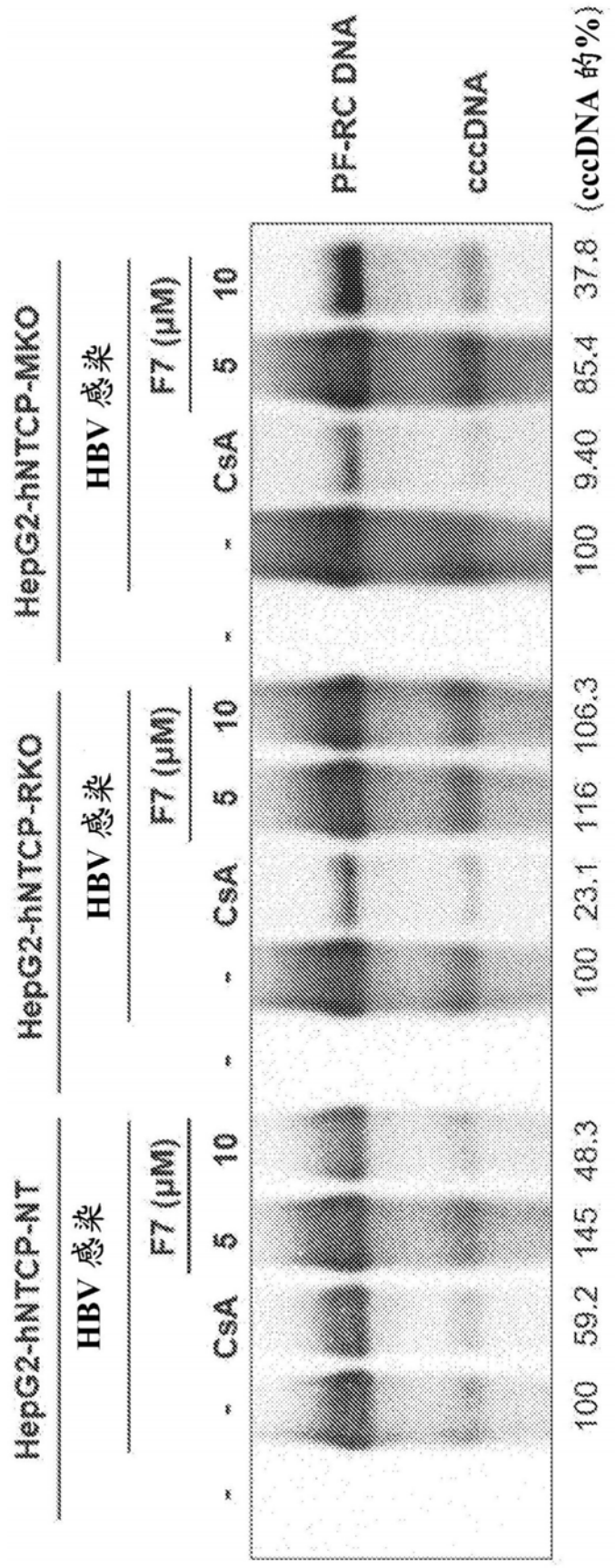

HepG2-hNTCP-NT
HepG2-hNTCP-RKO
HepG2-hNTCP-MKO
HBV 感染
F7 (μM)
- - CsA 5 10
100 59.2 145 48.3
100 23.1 116 106.3
100 9.40 85.4 37.8
PF-RC DNA
cccDNA
(cccDNA 的%)

图6D

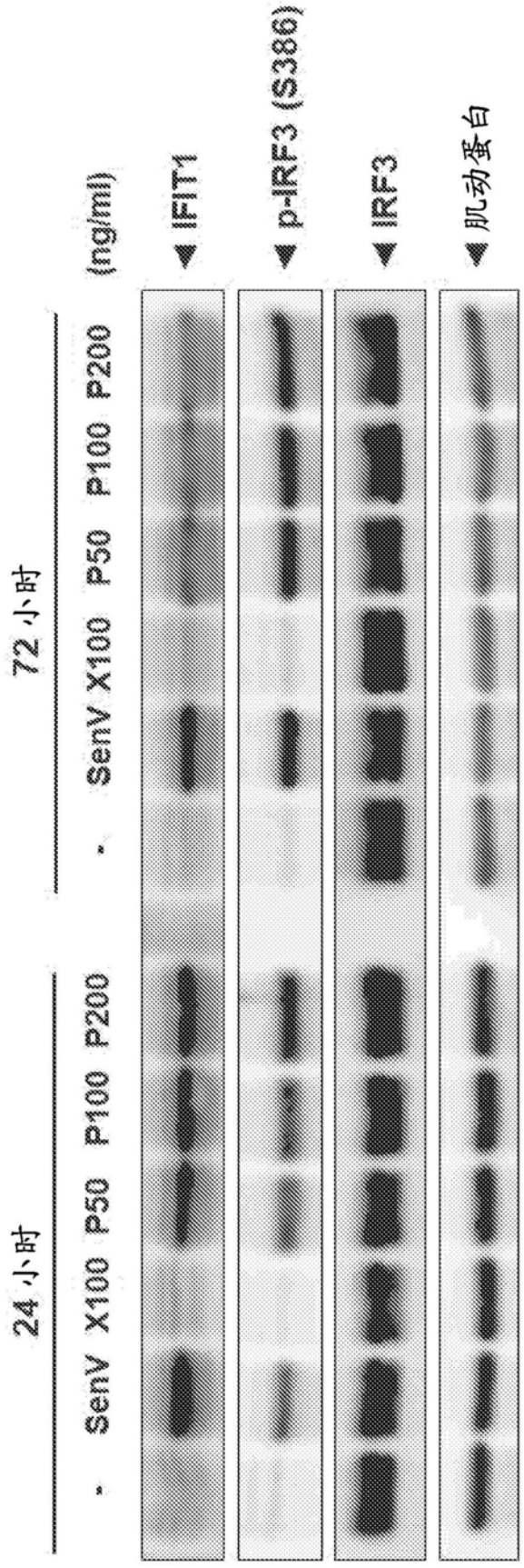

24 小时
72 小时
- SenV X100 P50 P100 P200 - SenV X100 P50 P100 P200 (ng/ml)
IFIT1
p-IRF3 (S386)
IRF3
肌动蛋白

图7A

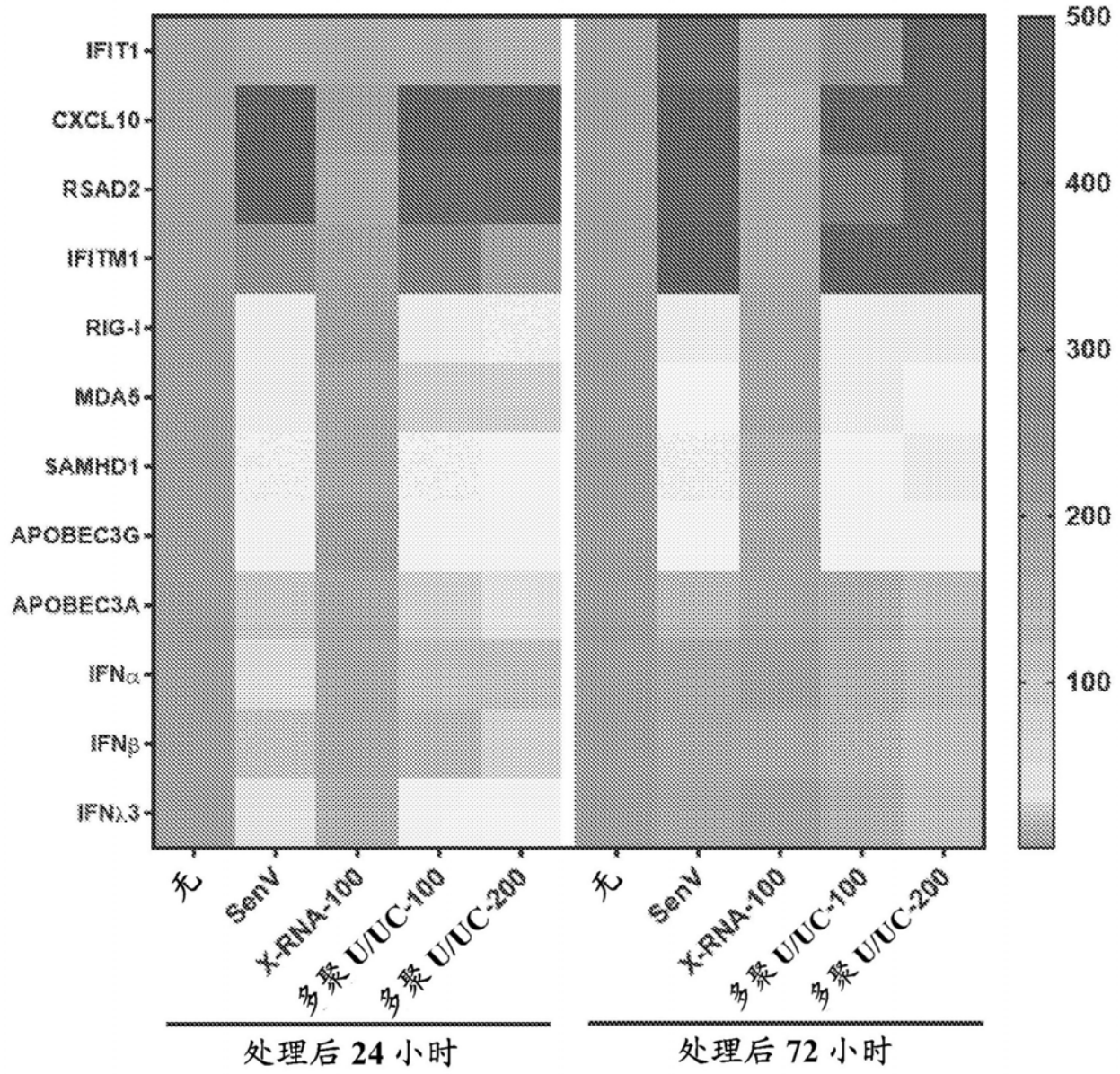

IFIT1
CXCL10
RSAD2
IFITM1
RIG-I
MDA5
SAMHD1
APOBEC3G
APOBEC3A
IFNα
IFNβ
IFNλ3
500
400
300
200
100
无
SenV
X-RNA-100
多聚 U/UC-100
多聚 U/UC-200
无
SenV
X-RNA-100
多聚 U/UC-100
多聚 U/UC-200
处理后 24 小时
处理后 72 小时

图7B

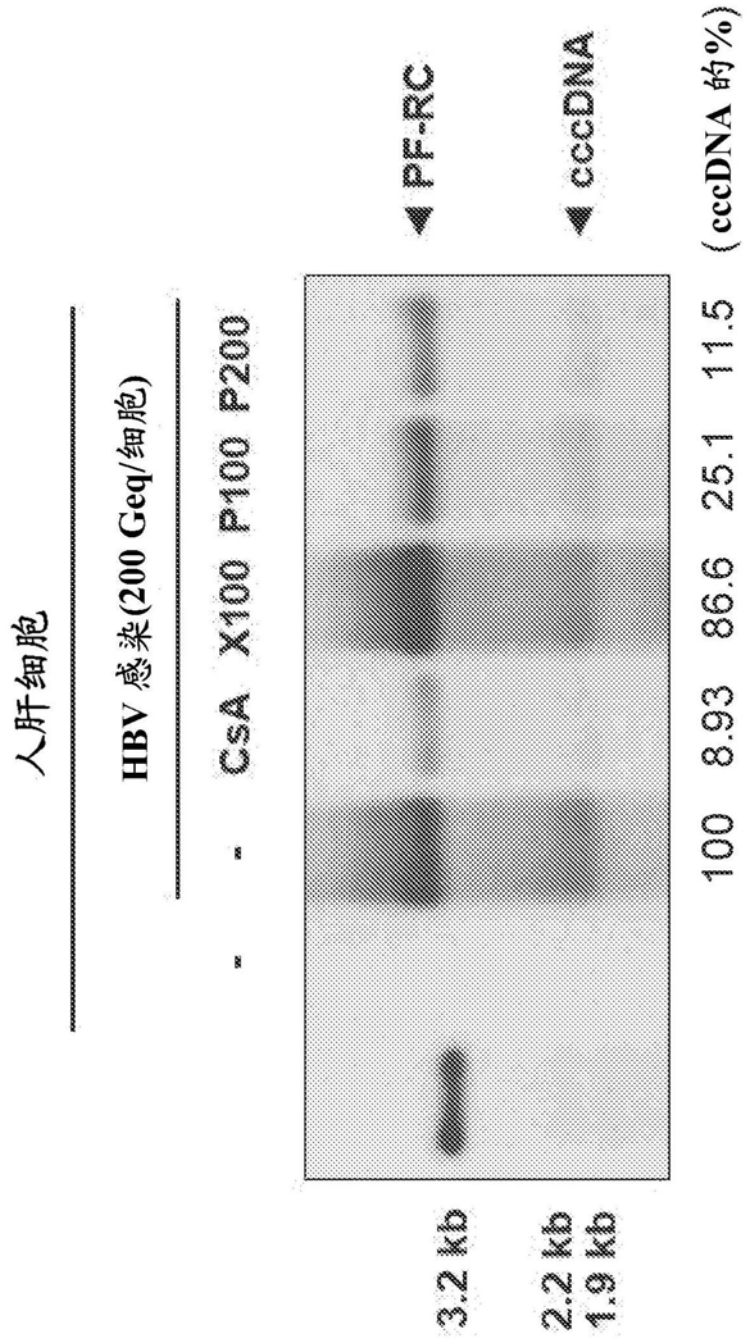

人肝细胞
HBV 感染(200 Geq/细胞)
- - CsA X100 P100 P200
PF-RC
cccDNA
(cccDNA 的%)
100 8.93 86.6 25.1 11.5
3.2 kb
2.2 kb
1.9 kb

图7C

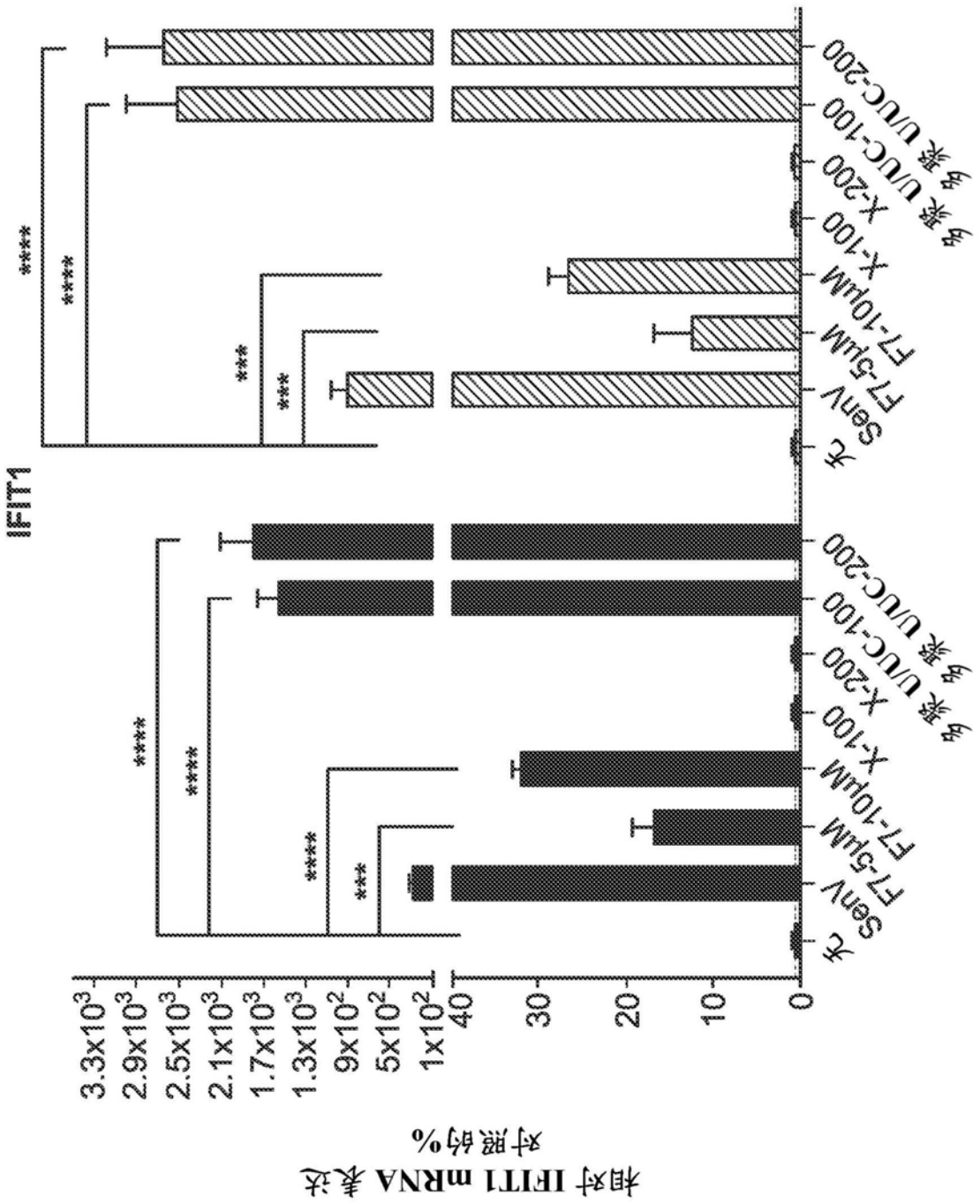

相对 IFIT1 mRNA 表达
对照的%
IFIT1
3.3x10^3
2.9x10^3
2.5x10^3
2.1x10^3
1.7x10^3
1.3x10^3
9x10^2
5x10^2
1x10^2
40
30
20
10
0
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
鸟类 U/UC-100
鸟类 U/UC-200
***
****

图8A

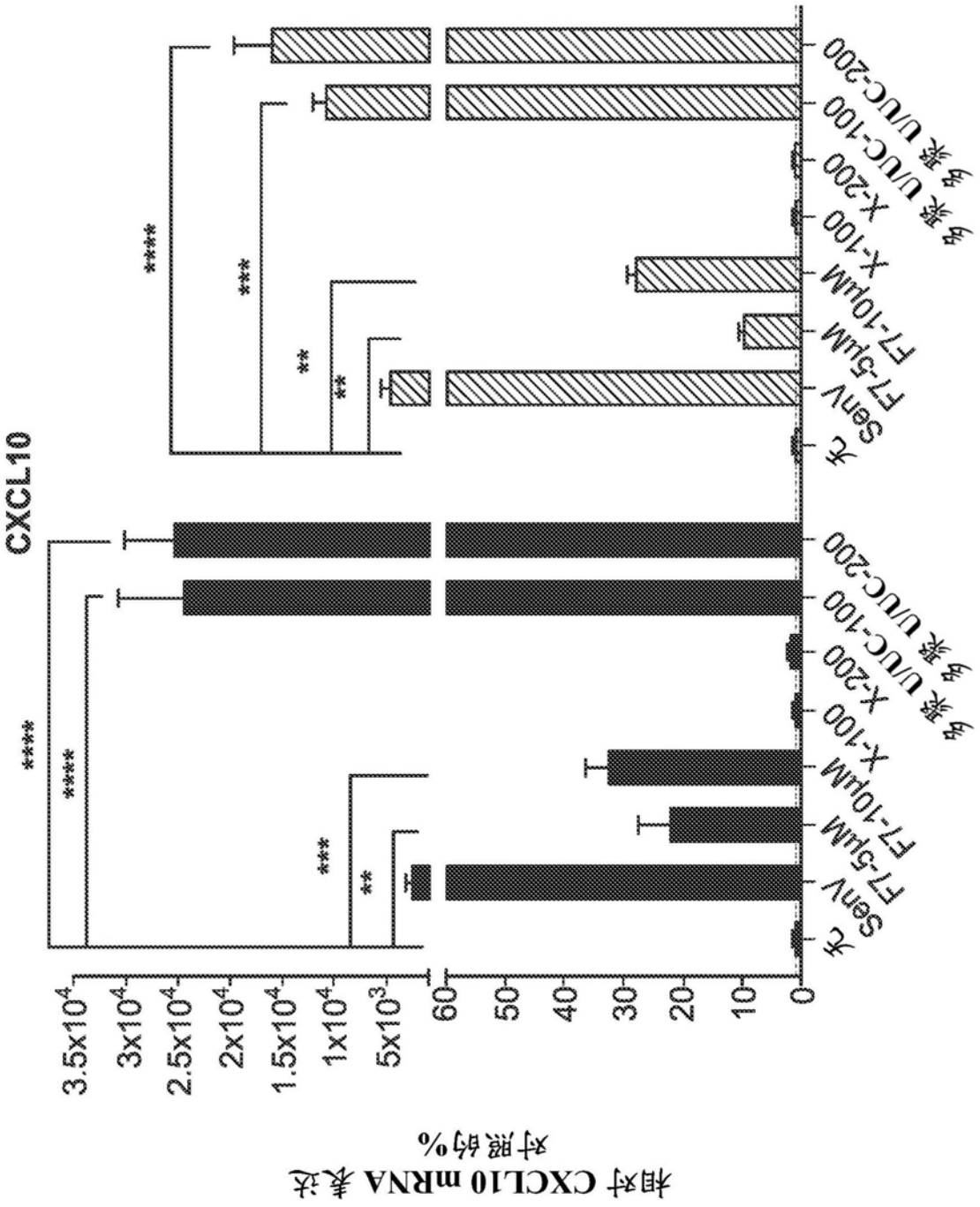

CXCL10
相对 CXCL10 mRNA 表达
对照的%
3.5x10^4
3x10^4
2.5x10^4
2x10^4
1.5x10^4
1x10^4
5x10^3
60
50
40
30
20
10
0
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
鸟类 U/UC-100
鸟类 U/UC-200
****
***
**

图8B

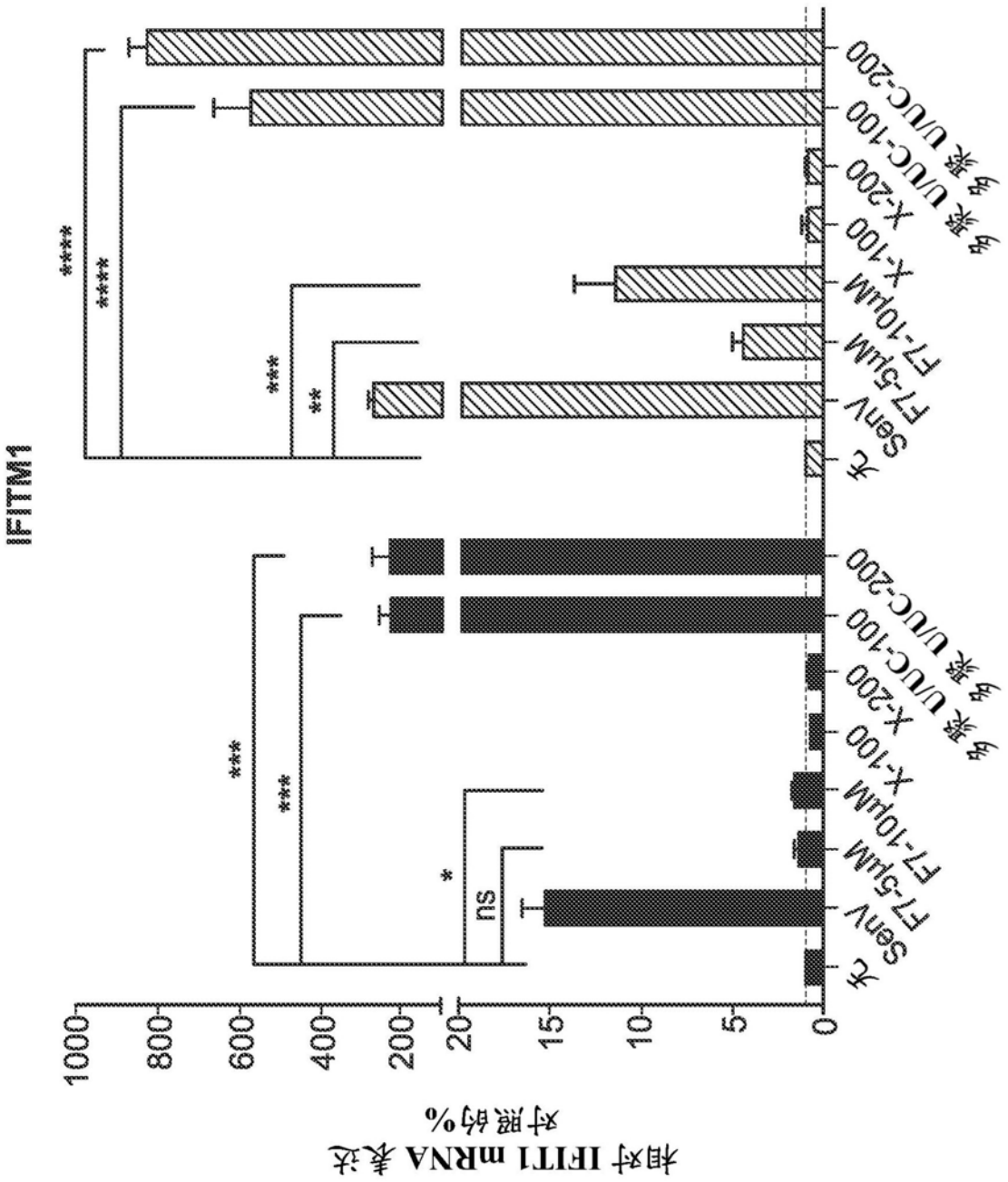

IFITM1
相对 IFITT1 mRNA 表达
对照的%
1000
800
600
400
200
20
15
10
5
0
对
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
鸡 聚 U/UC-100
鸡 聚 U/UC-200
ns
*
***
**
****

图8C

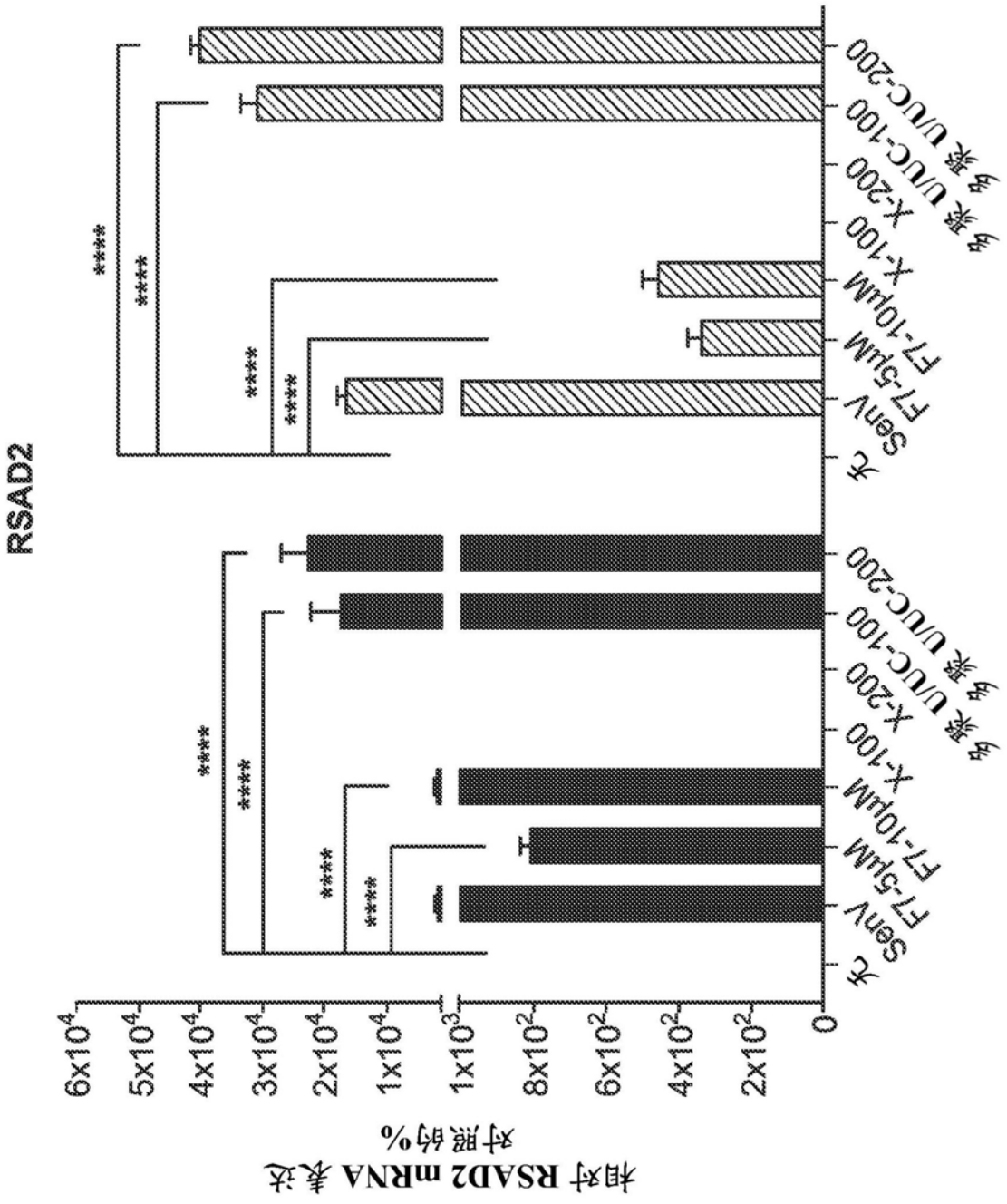

RSAD2
相对 RSAD2 mRNA 表达
对照的%
6x10^4
5x10^4
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
1x10^3
8x10^2
6x10^2
4x10^2
2x10^2
0
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
钠聚 U/UC-100
钠聚 U/UC-200
****

图8D

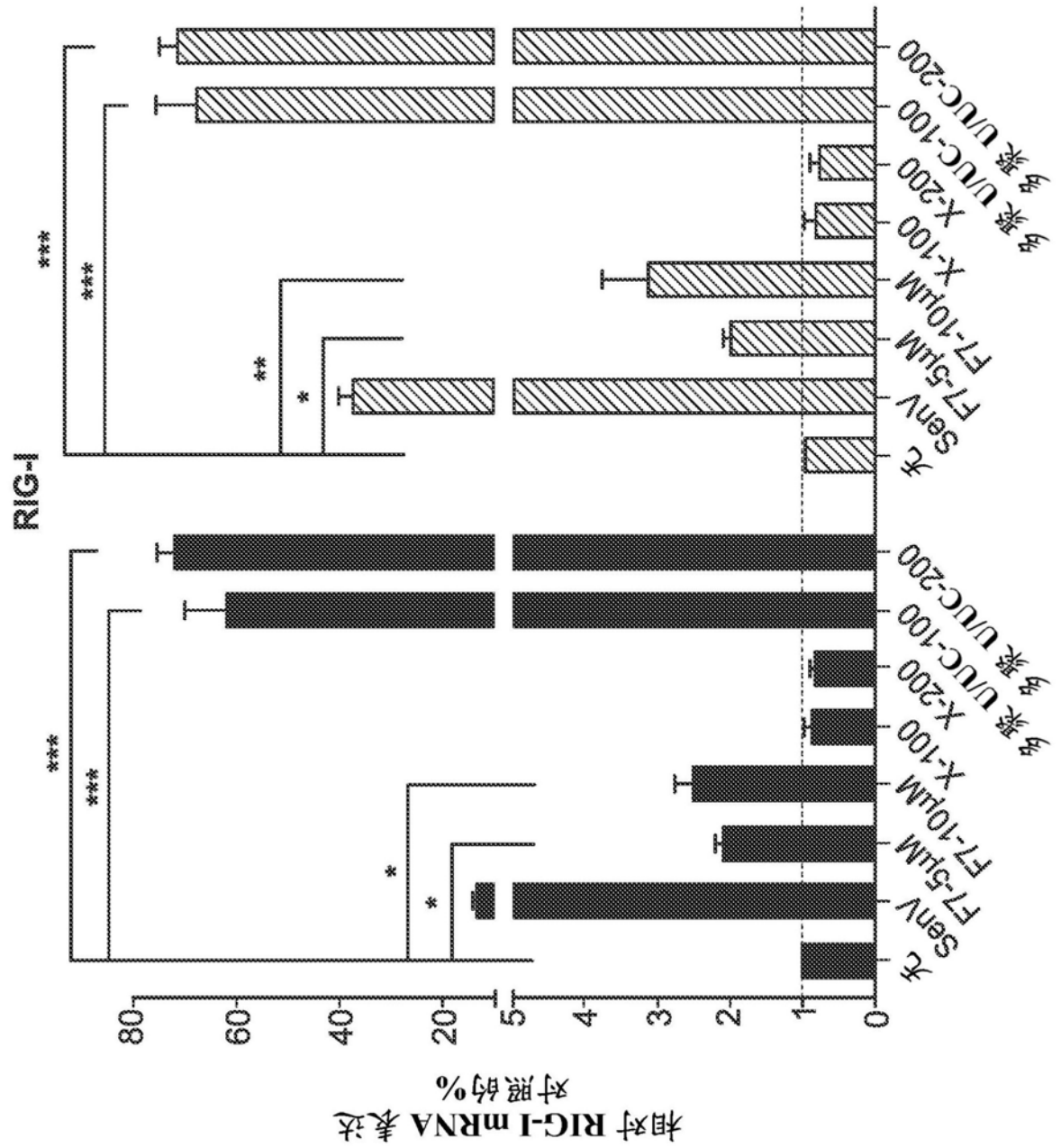

RIG-I
相对 RIG-I mRNA 表达
对照的%
0
1
2
3
4
5
20
40
60
80
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
兔聚 U/UC-100
兔聚 U/UC-200
***
**
*

图8E

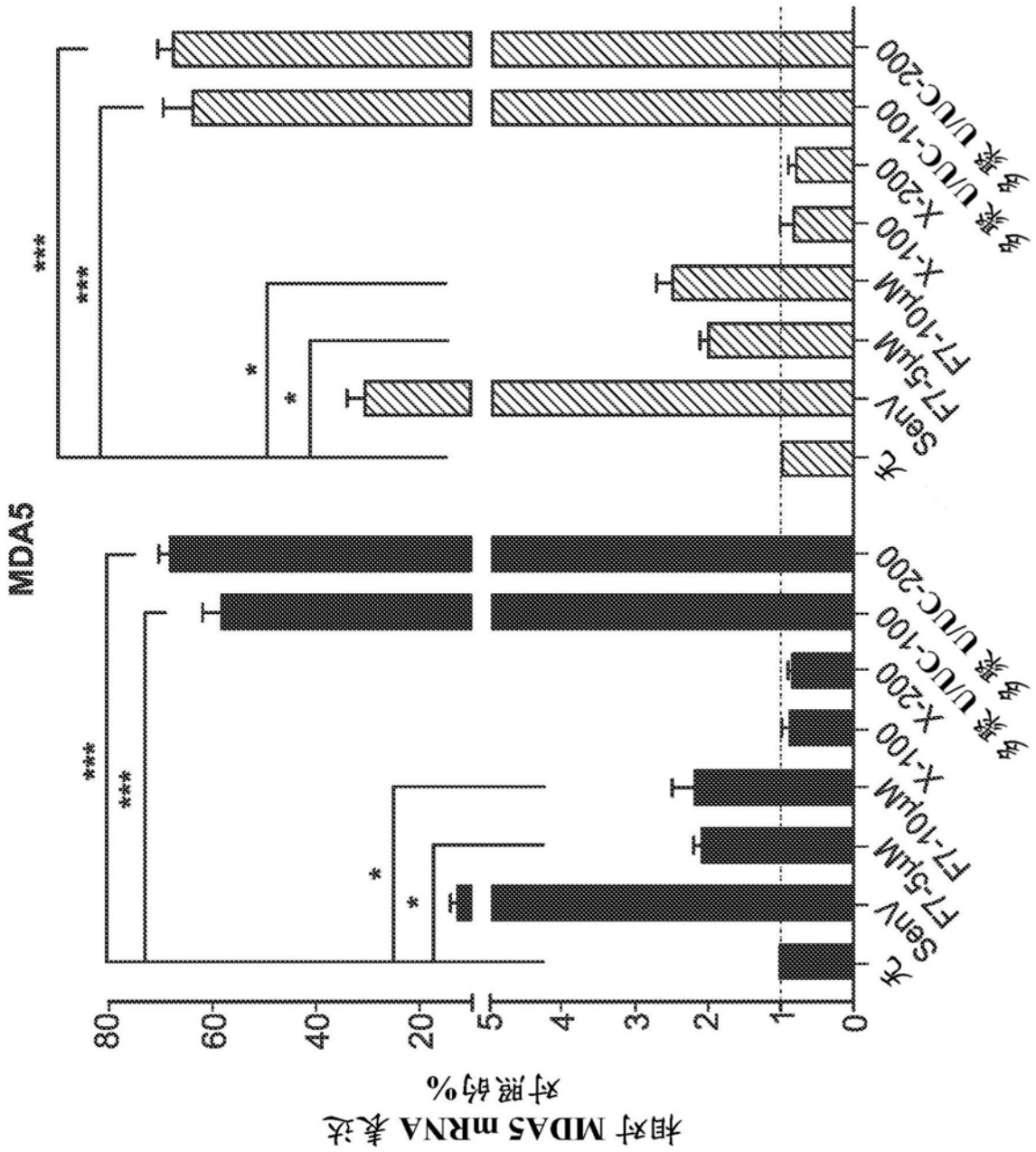

MDA5
相对 MDA5 mRNA 表达
对照的%
0
1
2
3
4
5
20
40
60
80
无
SenV
FT-5μM
FT-10μM
X-100
X-200
鲍 聚 U/UC-100
鲍 聚 U/UC-200
*
***

图8F

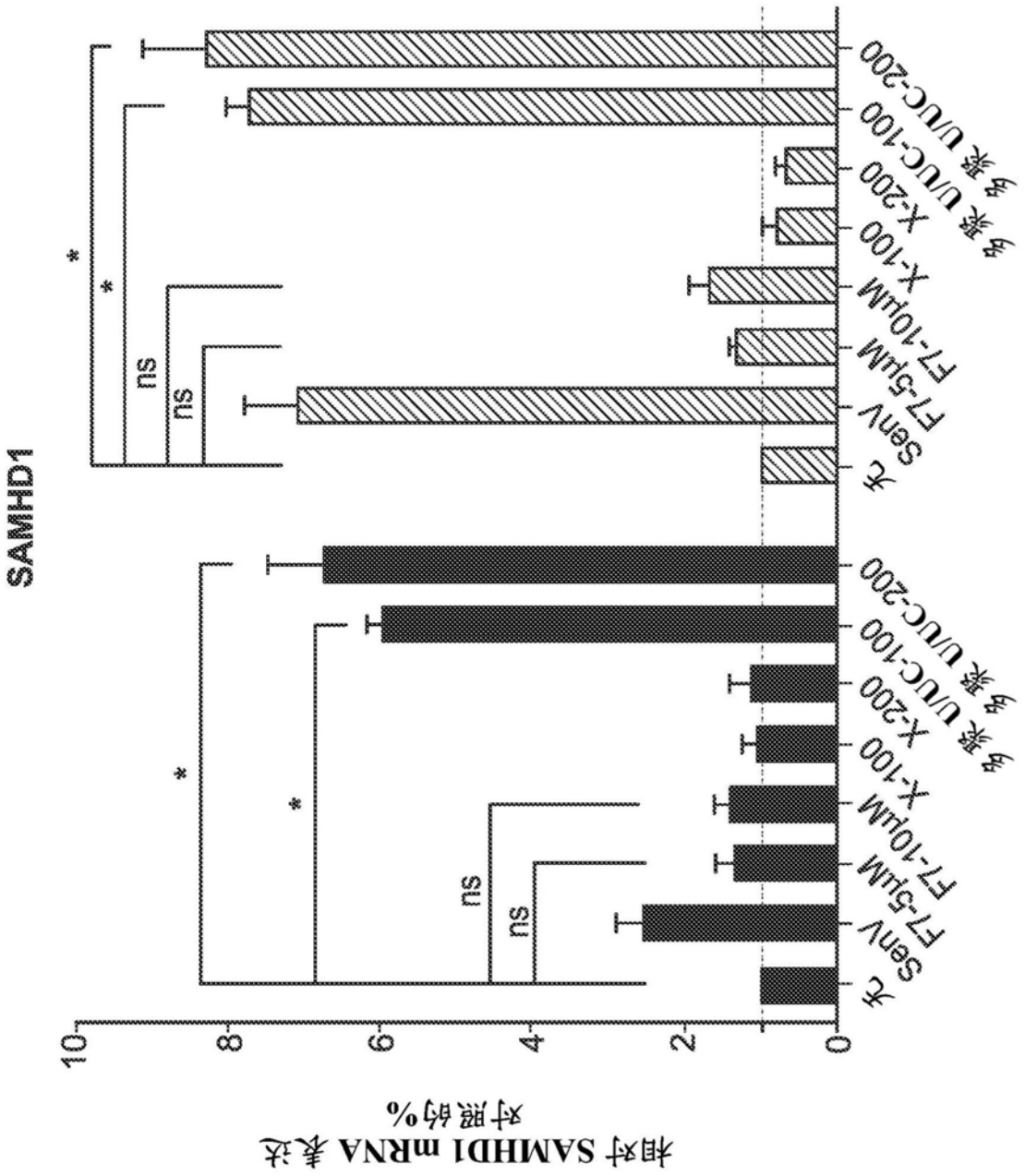

SAMHD1
相对 SAMHD1 mRNA 表达
对照的%
0
2
4
6
8
10
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
鸟类 U/UC-100
鸟类 U/UC-200
ns
ns
*
*
*
*

图8G

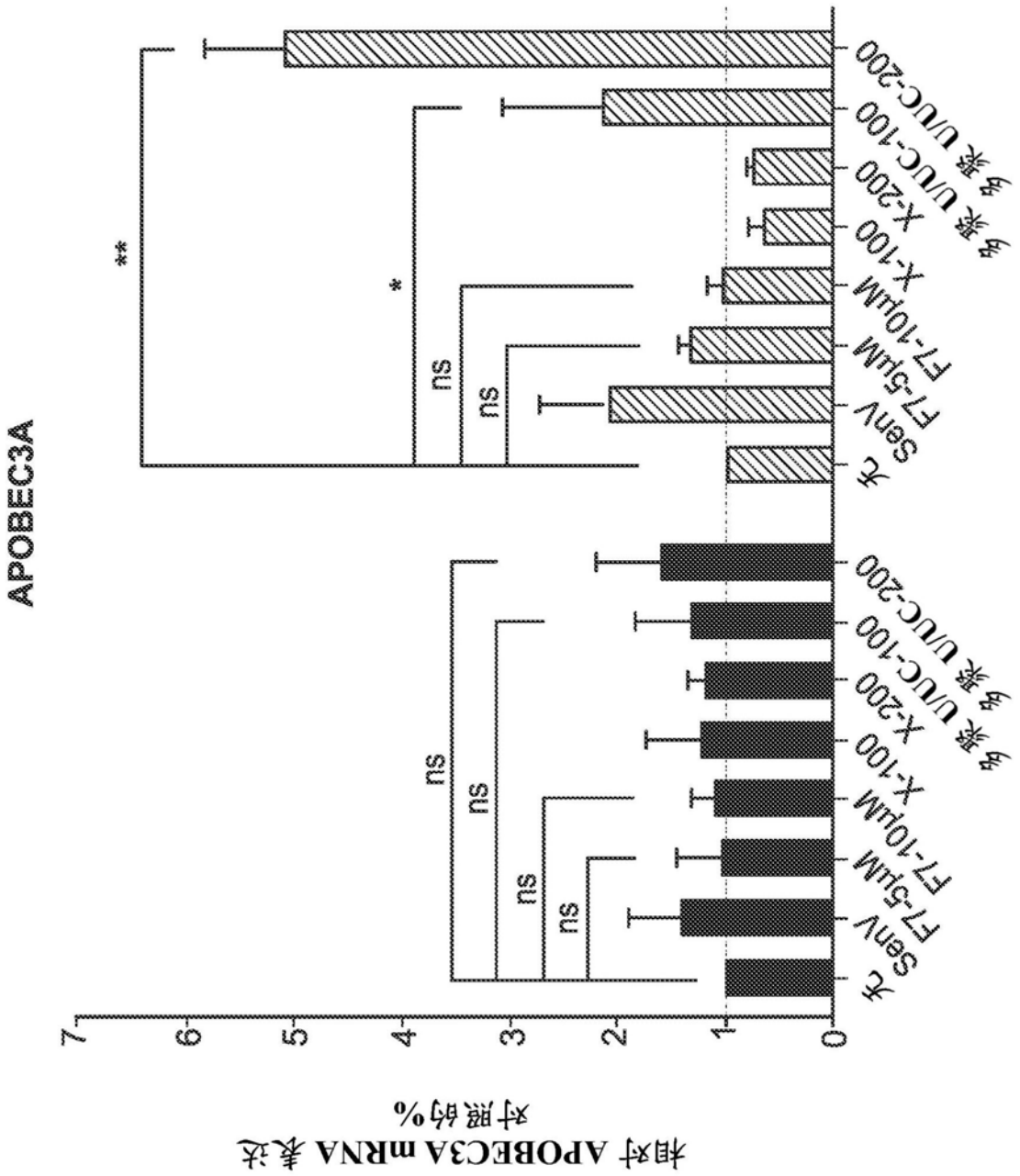

APOBEC3A
相对 APOBEC3A mRNA 表达
对照的%
0
1
2
3
4
5
6
7
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
钠类 U/UC-100
钠类 U/UC-200
ns
*
**

图8H

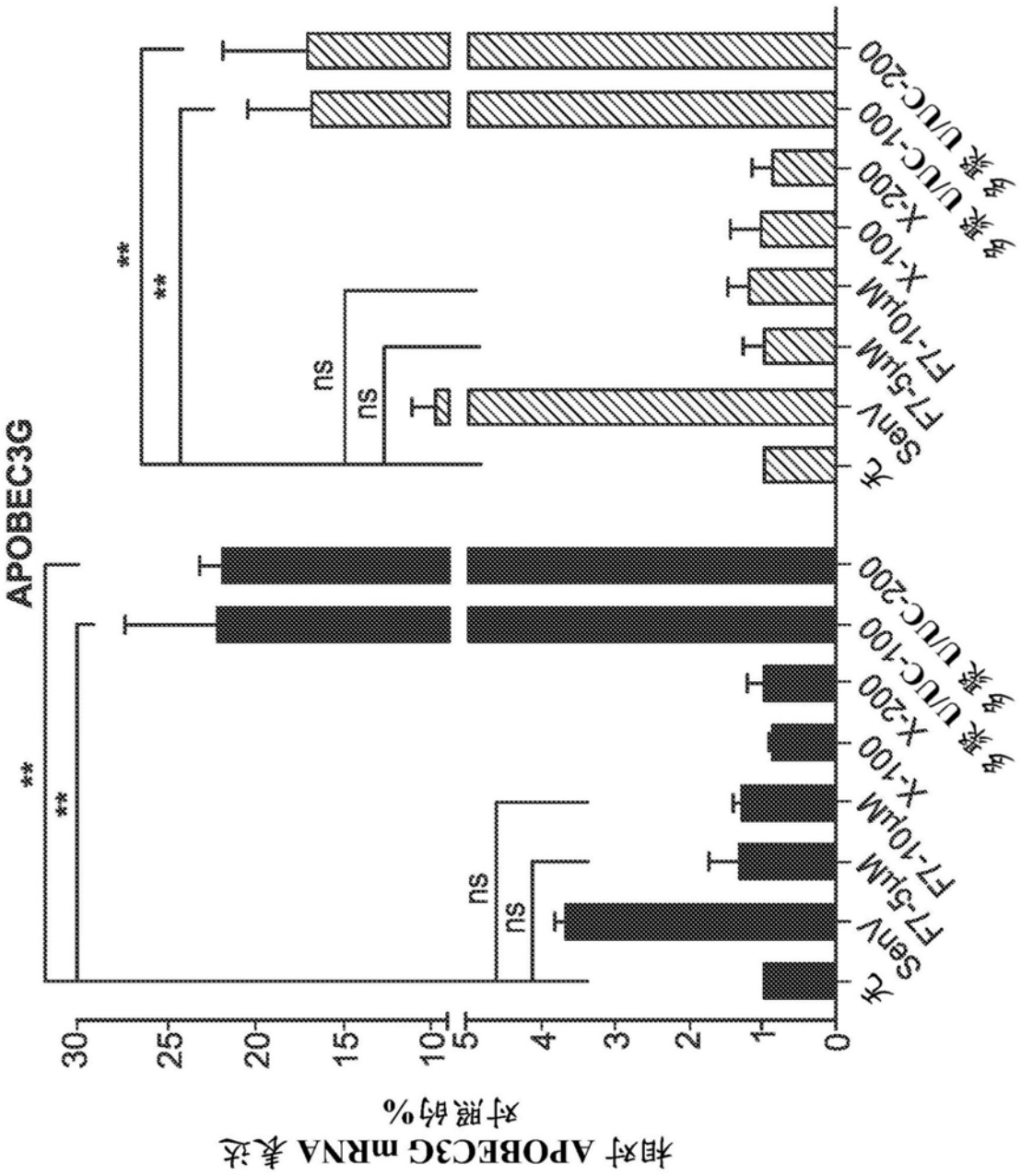

APOBEC3G
相对 APOBEC3G mRNA 表达
对照的%
0
1
2
3
4
5
10
15
20
25
30
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
兔聚 U/UC-100
兔聚 U/UC-200
ns
**

图8I

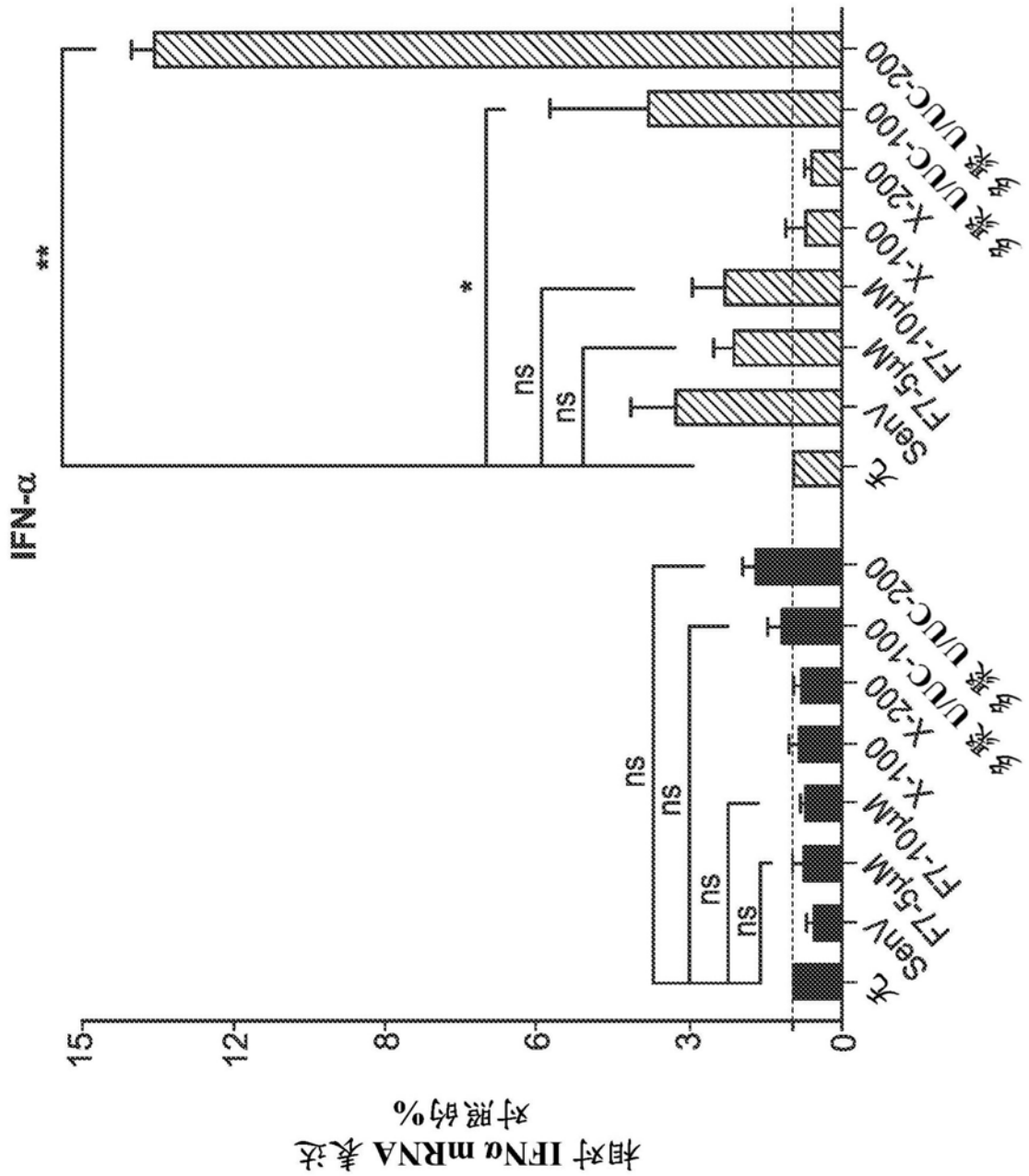

IFN-α
相对 IFNα mRNA 表达
对照的%
15
12
8
6
3
0
未
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
鸟类 U/UC-100
鸟类 U/UC-200
ns
*
**

图8J

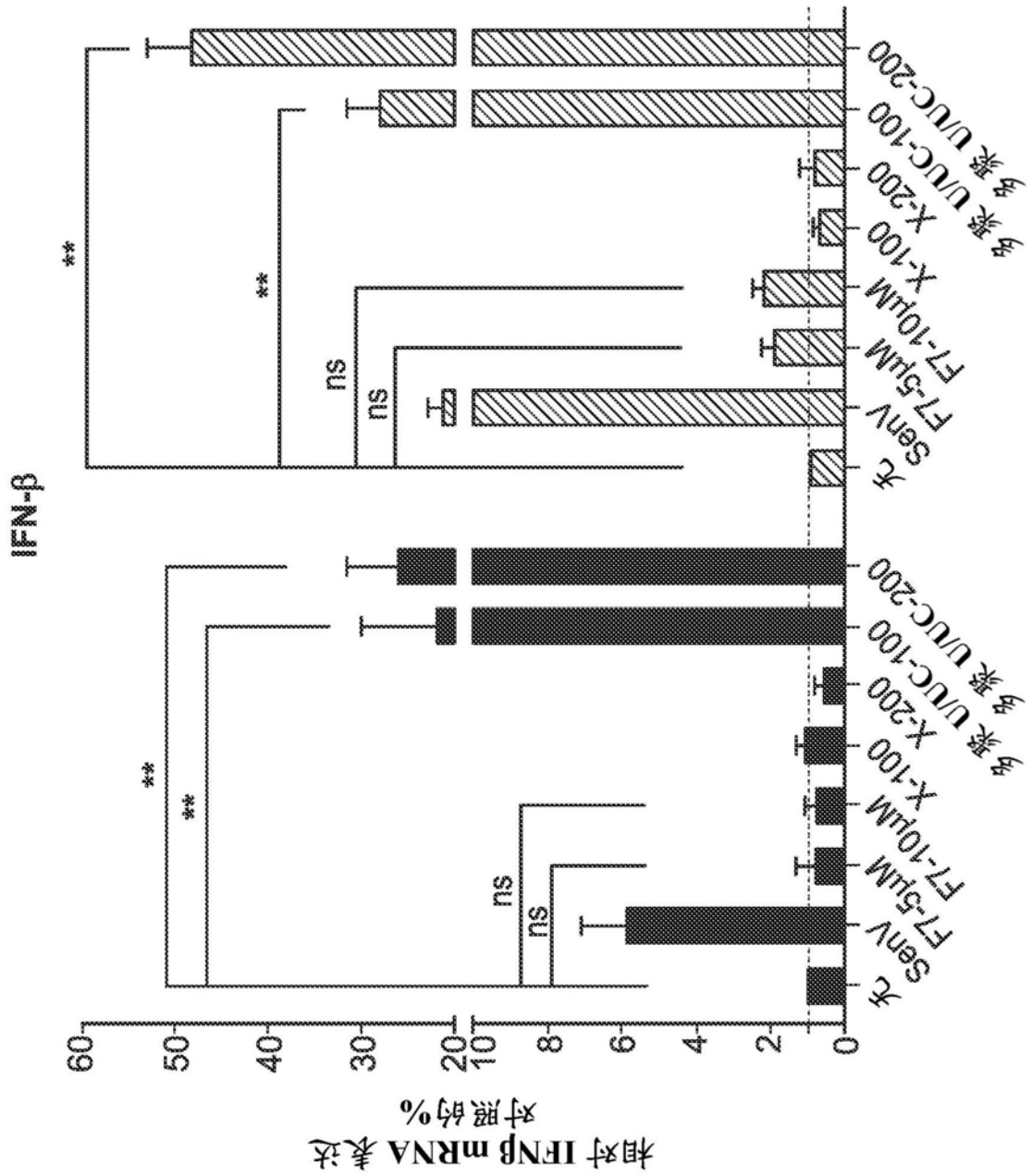

IFN-β
相对 IFNβ mRNA 表达
对照的%
60
50
40
30
20
10
8
6
4
2
0
无
SenV
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
兔 兔 兔 U/UC-100
兔 兔 兔 U/UC-200
ns
**

图8K

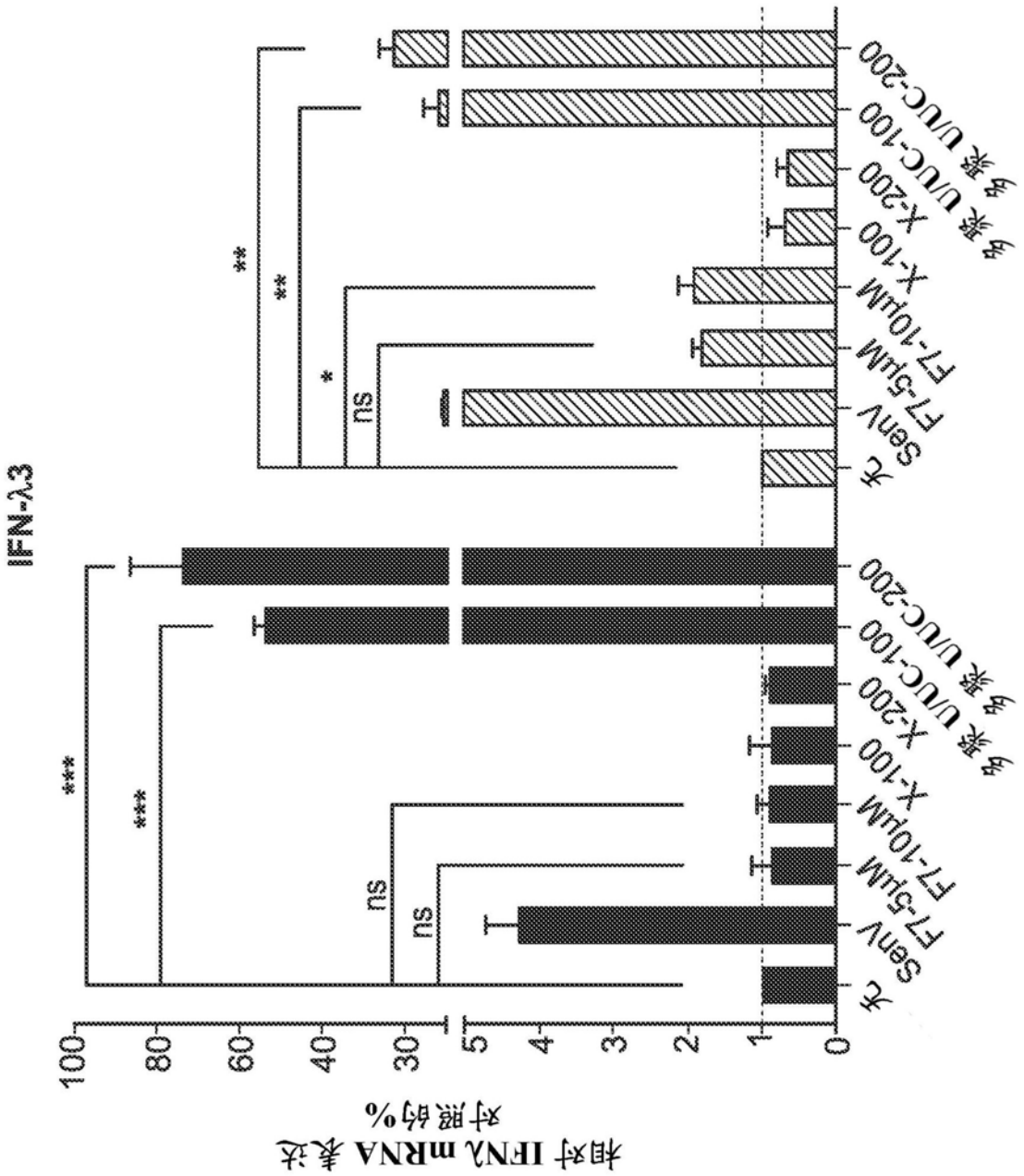

IFN-λ3
相对 IFNλ mRNA 表达
对照的%
0
1
2
3
4
5
30
40
60
80
100
无
Sendy
F7-5μM
F7-10μM
X-100
X-200
兔 聚 U/UC-100
兔 聚 U/UC-200
ns
*
**
***

图8L

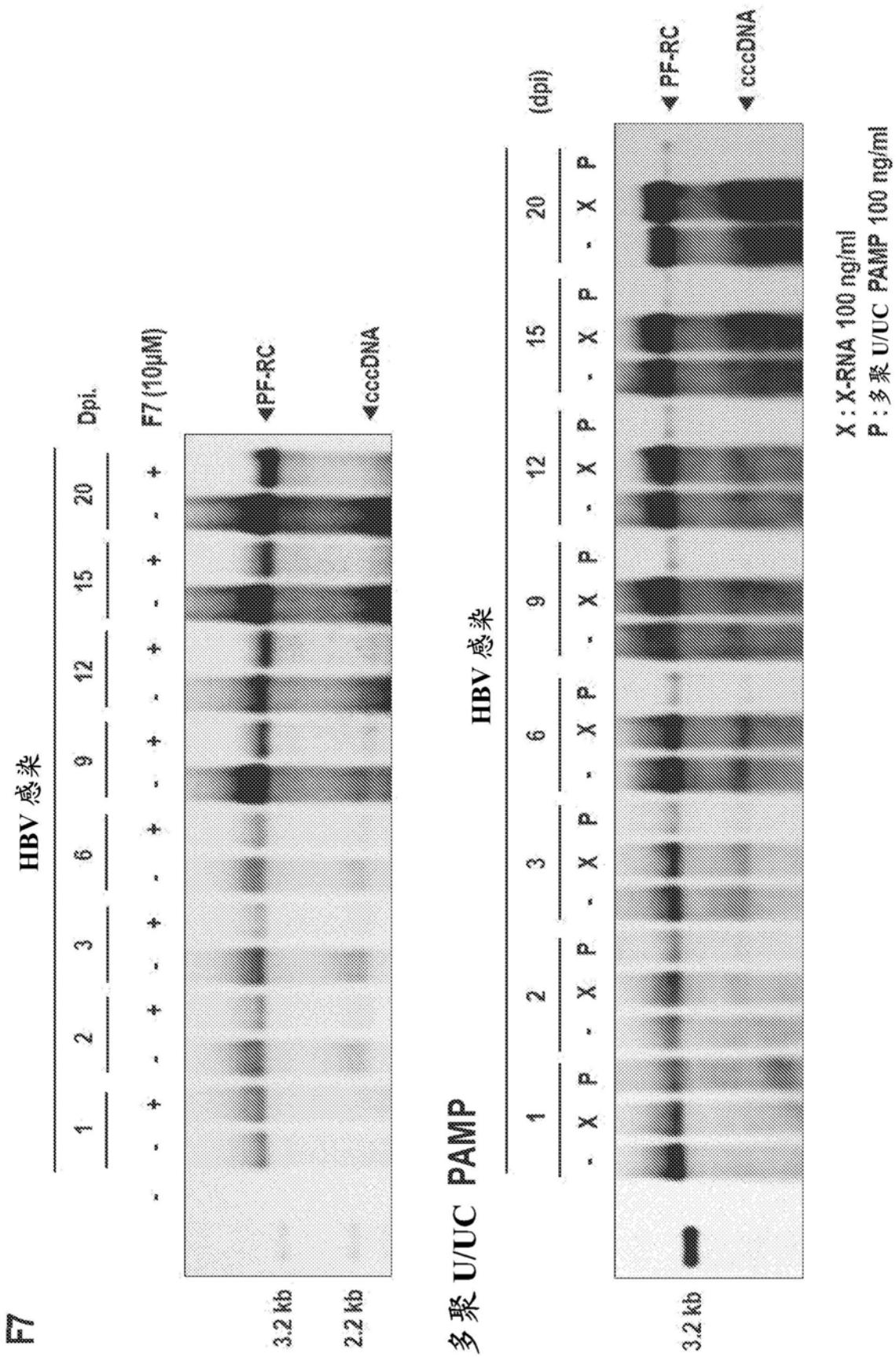

F7
HBV 感染
1 2 3 6 9 12 15 20 Dpi.
- - + - + - + - + - + - + F7 (10μM)
◀PF-RC
◀cccDNA
3.2 kb
2.2 kb
多聚 U/UC PAMP
HBV 感染
1 2 3 6 9 12 15 20 (dpi)
- X P - X P - X P - X P - X P - X P - X P
◀ PF-RC
◀ cccDNA
3.2 kb
X : X-RNA 100 ng/ml
P : 多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml

图9A

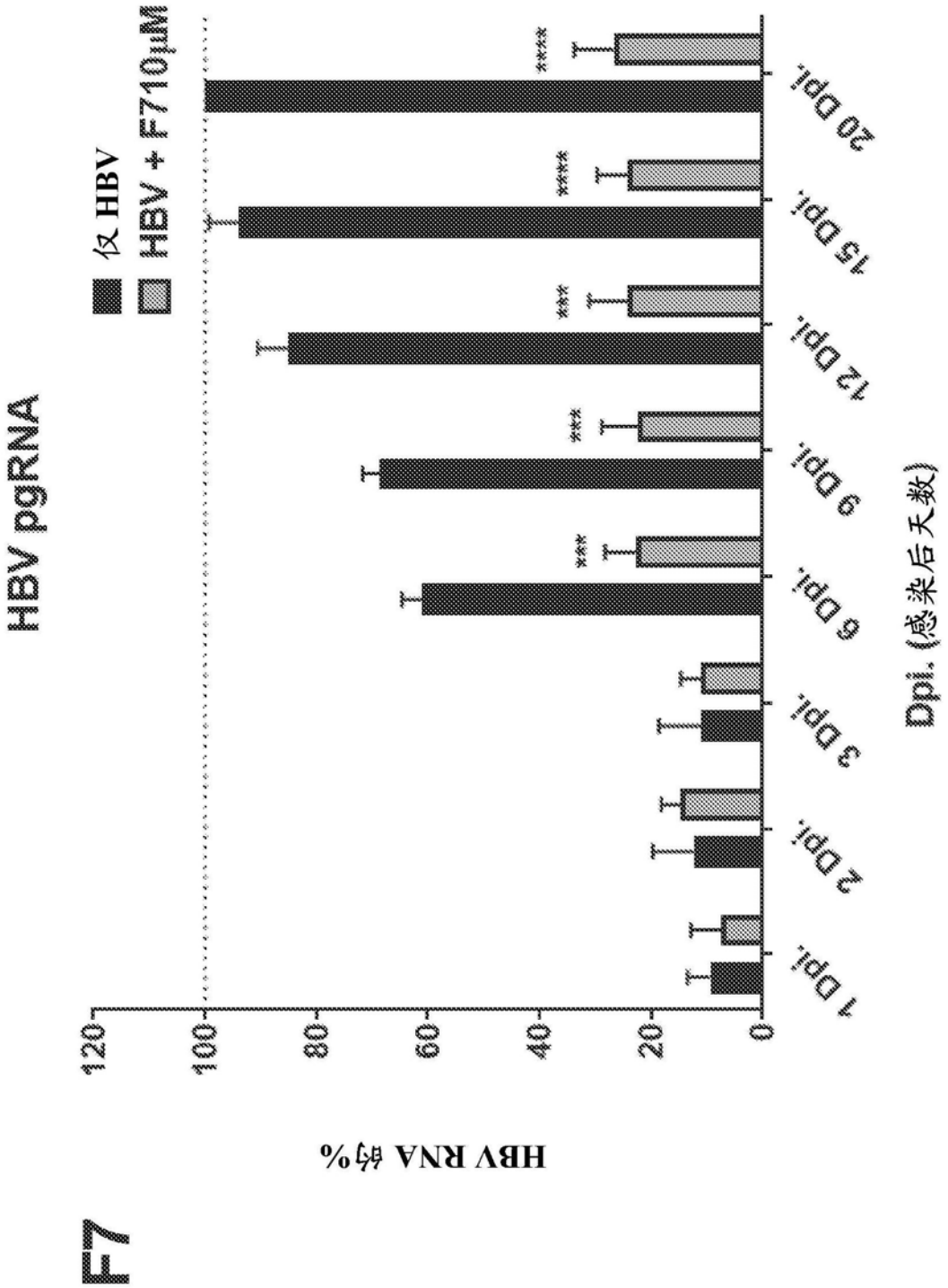

HBV pgRNA
仅 HBV
HBV + F710μM
HBV RNA 的%
120
100
80
60
40
20
0
1 Dpi.
2 Dpi.
3 Dpi.
6 Dpi.
9 Dpi.
12 Dpi.
15 Dpi.
20 Dpi.
Dpi. (感染后天数)
F7

图9B

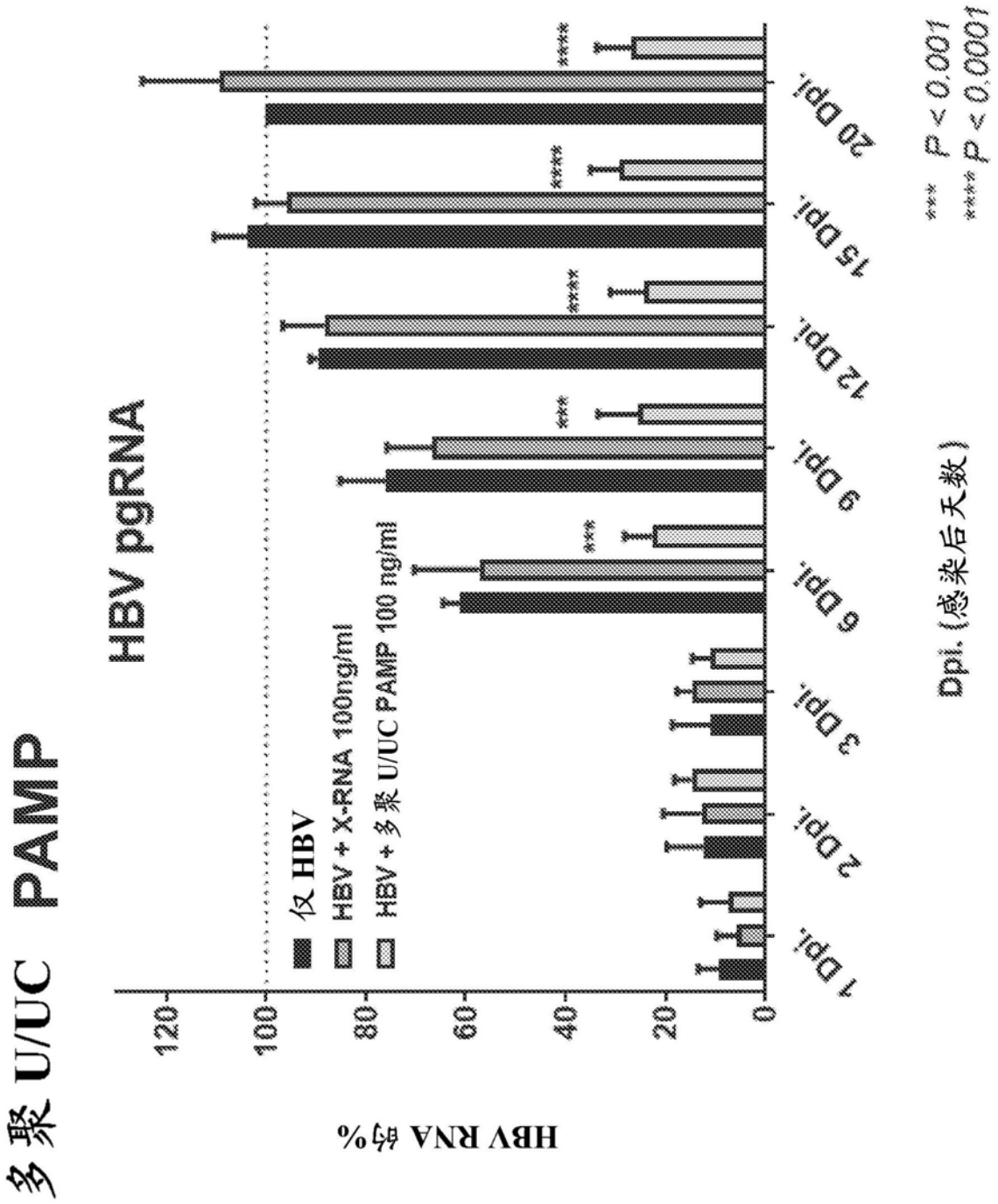

多聚 U/UC PAMP
HBV pgRNA
仅 HBV
HBV + X-RNA 100ng/ml
HBV + 多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
HBV RNA 的%
120
100
80
60
40
20
0
1 Dpi.
2 Dpi.
3 Dpi.
6 Dpi.
9 Dpi.
12 Dpi.
15 Dpi.
20 Dpi.
Dpi.(感染后天数)
*** P < 0,001
**** P < 0,0001

图9B续

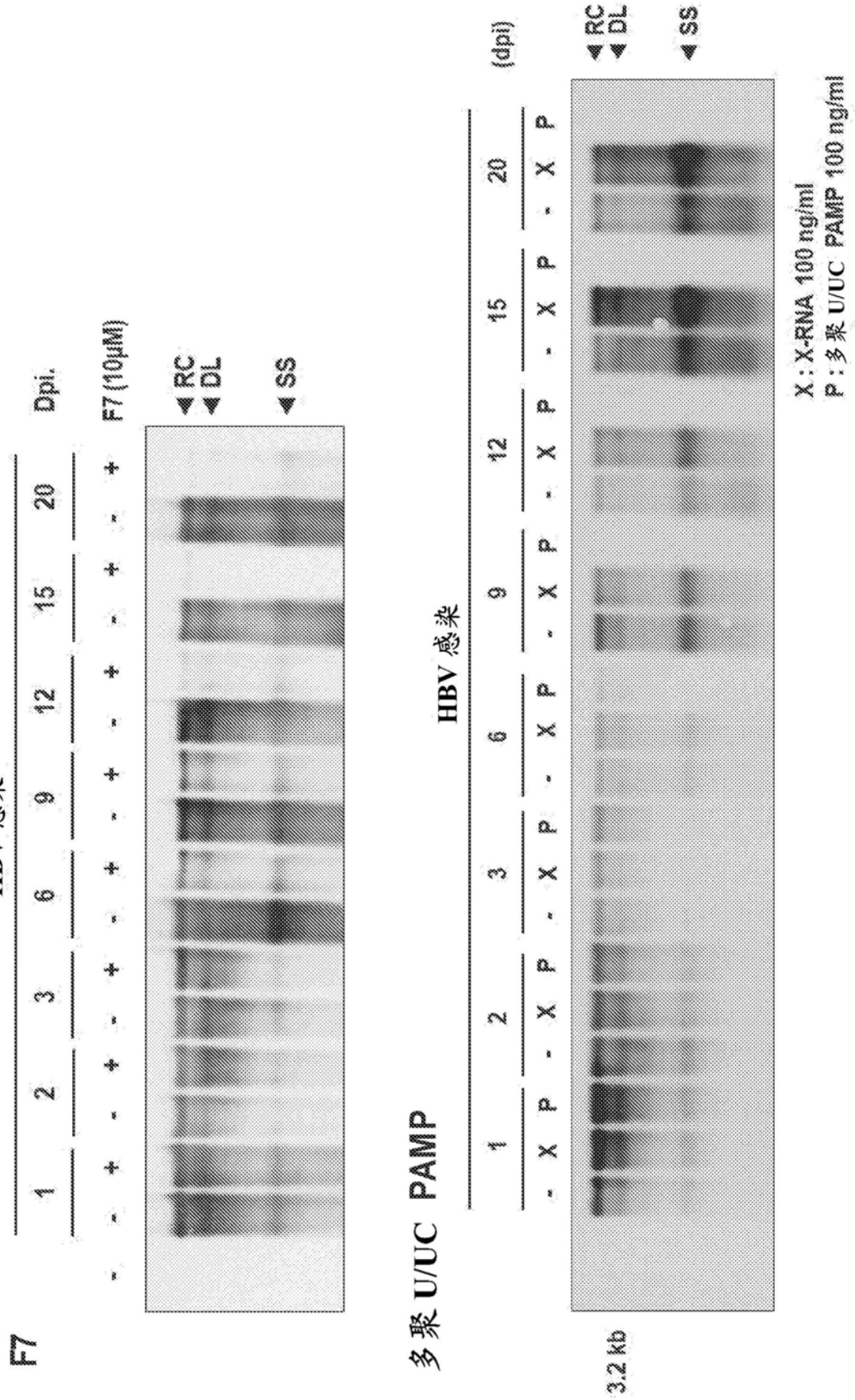

F7
HBV 感染
Dpi.
1 2 3 6 9 12 15 20
F7 (10μM)
- - + - + - + - + - + - + - +
RC
DL
SS
多聚 U/UC PAMP
HBV 感染
(dpi)
1 2 3 6 9 12 15 20
- X P - X P - X P - X P - X P - X P - X P - X P
RC
DL
SS
3.2 kb
X : X-RNA 100 ng/ml
P : 多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml

图9C

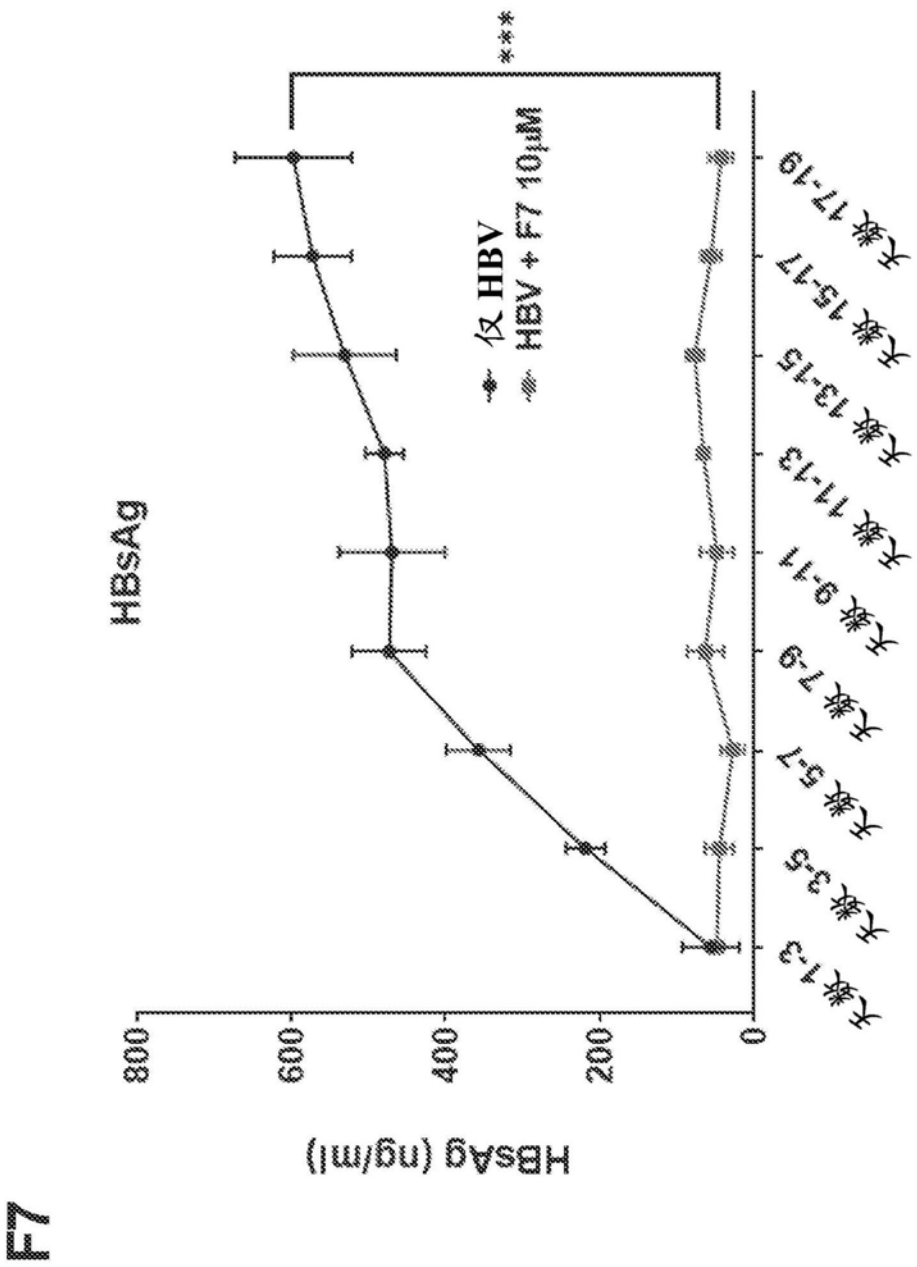

F7
HBsAg (ng/ml)
800
600
400
200
0
HBsAg
仅 HBV
HBV + F7 10μM
***
天数 1-3
天数 3-5
天数 5-7
天数 7-9
天数 9-11
天数 11-13
天数 13-15
天数 15-17
天数 17-19

图9D

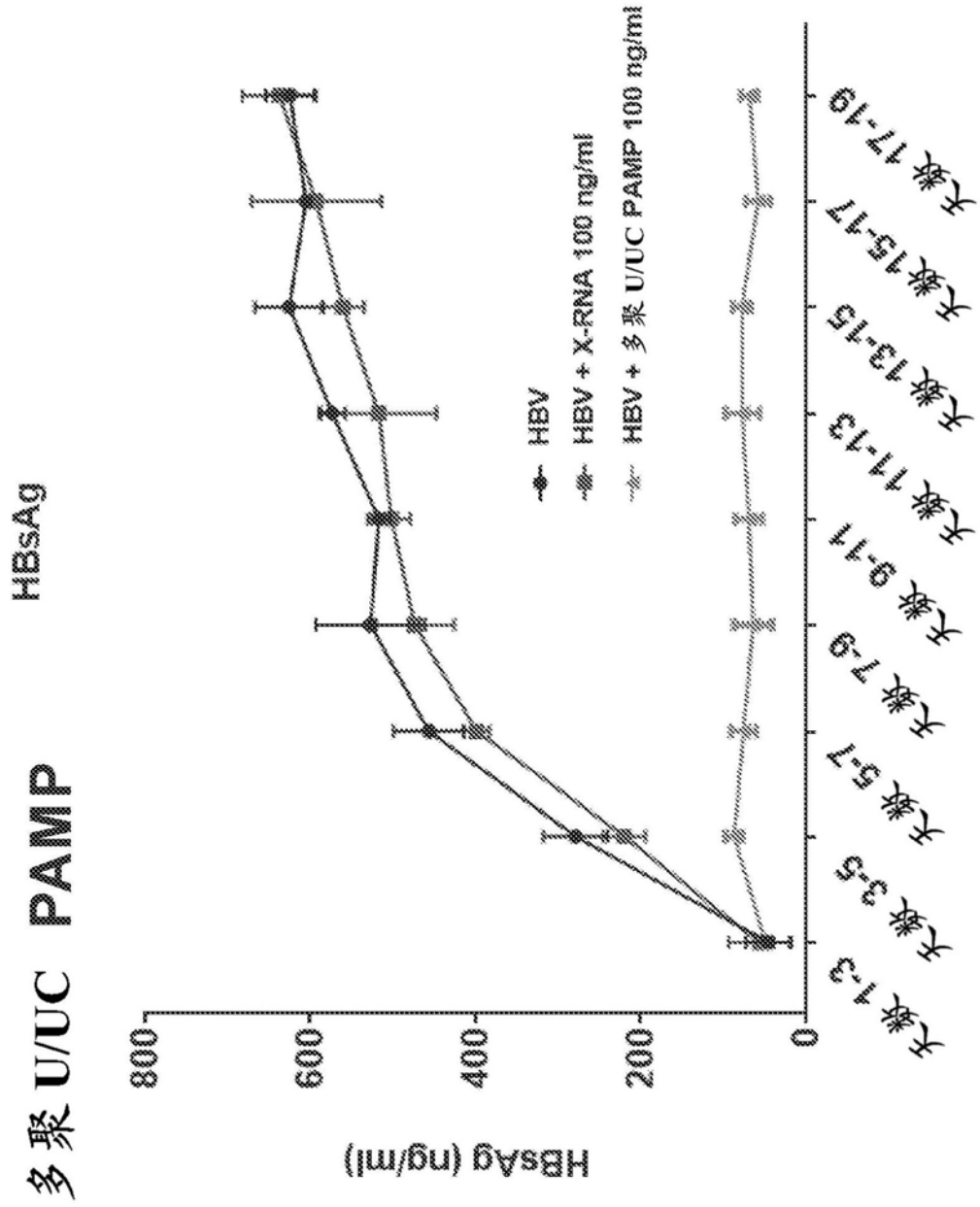

多聚 U/UC PAMP
HBsAg
HBsAg (ng/ml)
800
600
400
200
0
HBV
HBV + X-RNA 100 ng/ml
HBV + 多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
天数 1-3
天数 3-5
天数 5-7
天数 7-9
天数 9-11
天数 11-13
天数 13-15
天数 15-17
天数 17-19

图9D续

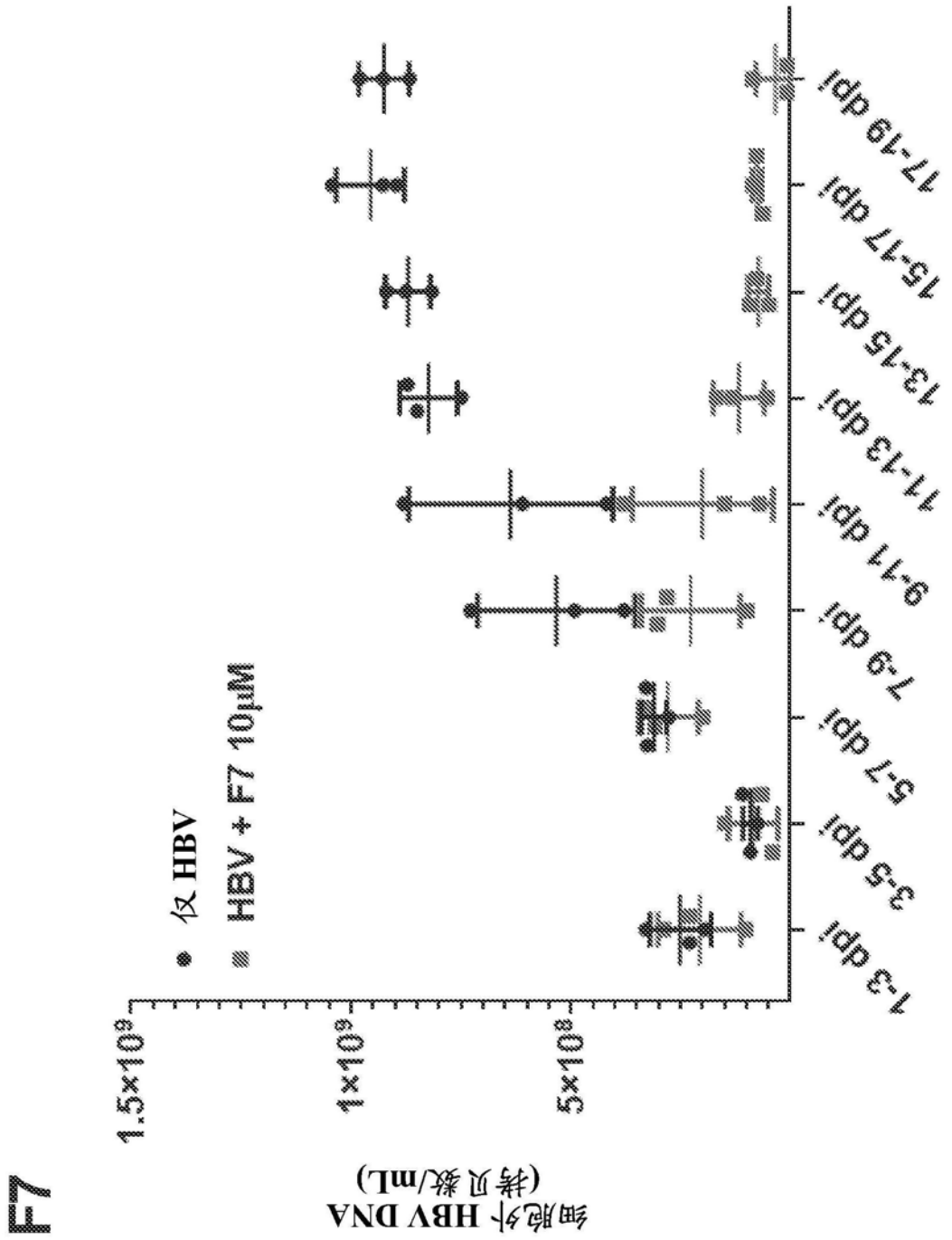

F7
细胞外 HBV DNA
(拷贝数/mL)
1.5×10⁹
1×10⁹
5×10⁸
仅 HBV
HBV + F7 10μM
1-3 dpi
3-5 dpi
5-7 dpi
7-9 dpi
9-11 dpi
11-13 dpi
13-15 dpi
15-17 dpi
17-19 dpi

图9E

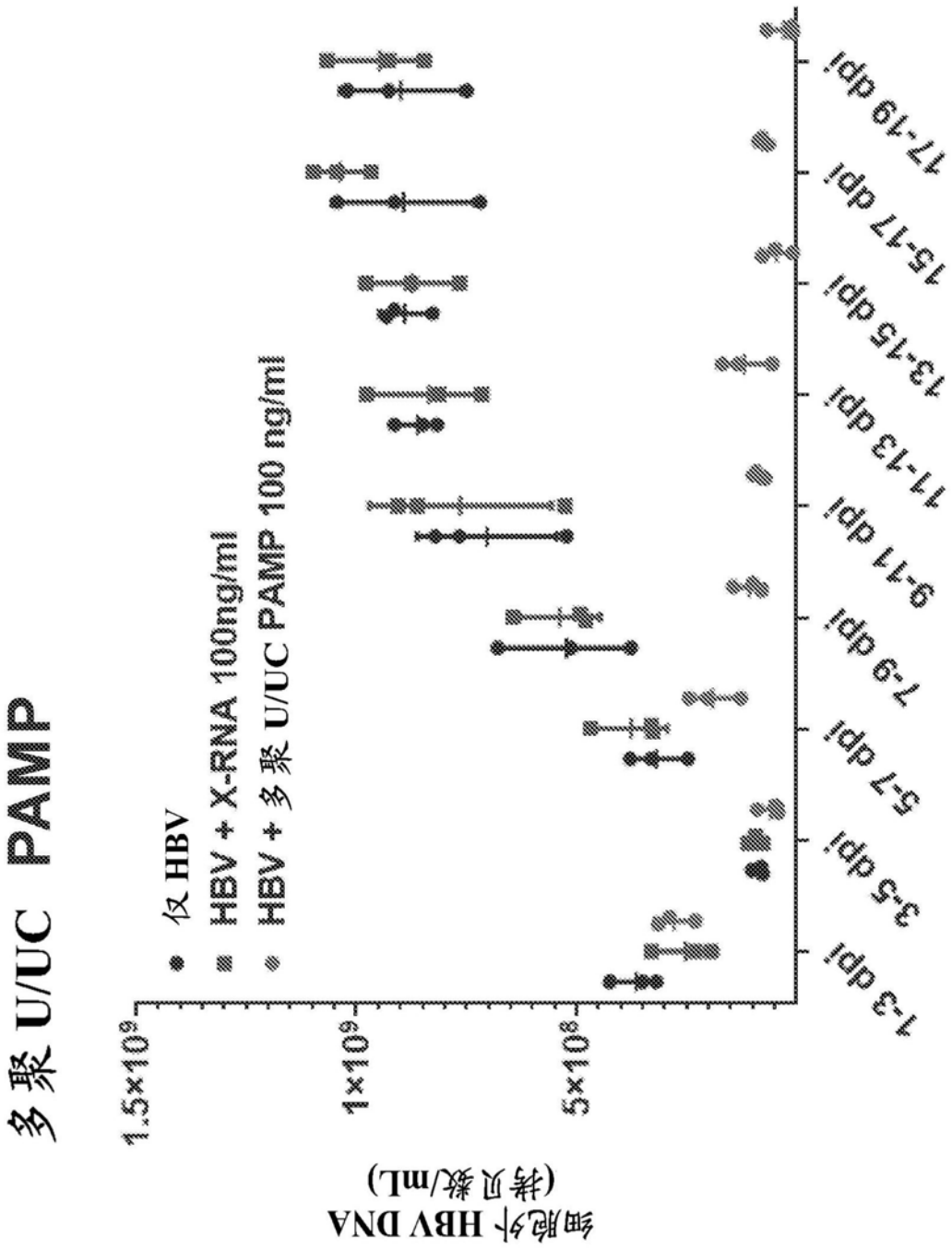

多聚 U/UC PAMP
仅 HBV
HBV + X-RNA 100ng/ml
HBV + 多聚 U/UC PAMP 100 ng/ml
1.5×10⁹
1×10⁹
5×10⁸
细胞外 HBV DNA
(拷贝数/mL)
1-3 dpi
3-5 dpi
5-7 dpi
7-9 dpi
9-11 dpi
11-13 dpi
13-15 dpi
15-17 dpi
17-19 dpi

图9E续

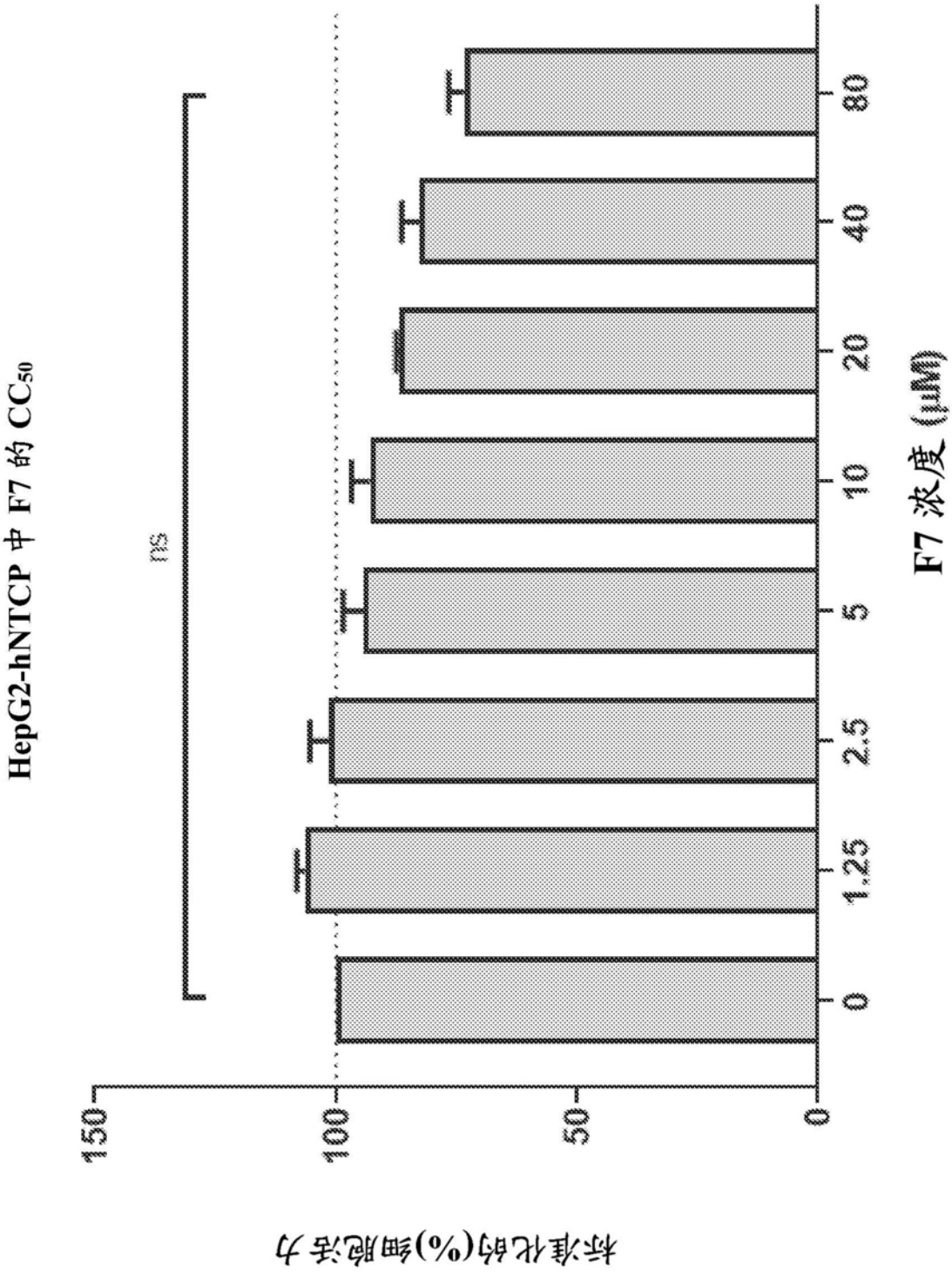

HepG2-hNTCP 中 F7 的 CC_{50}
n.s.
标准化的(%)细胞活力
150
100
50
0
0
1.25
2.5
5
10
20
40
80
F7 浓度 (μM)

图10A

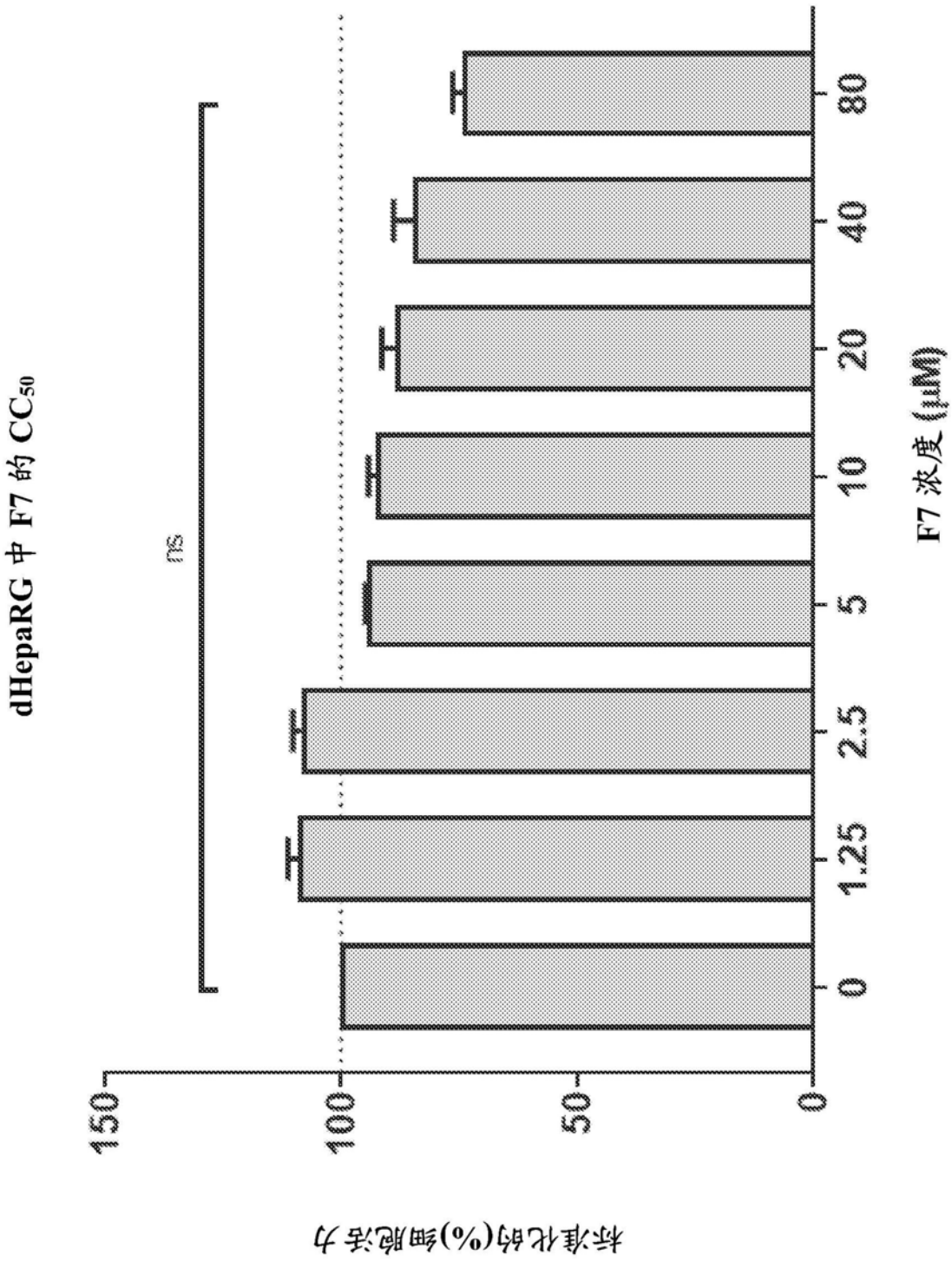

dHepaRG 中 F7 的 CC_{50}
ns
150
100
50
0
0
1.25
2.5
5
10
20
40
80
F7 浓度 (μM)
标准化的(%)细胞活力

图10B

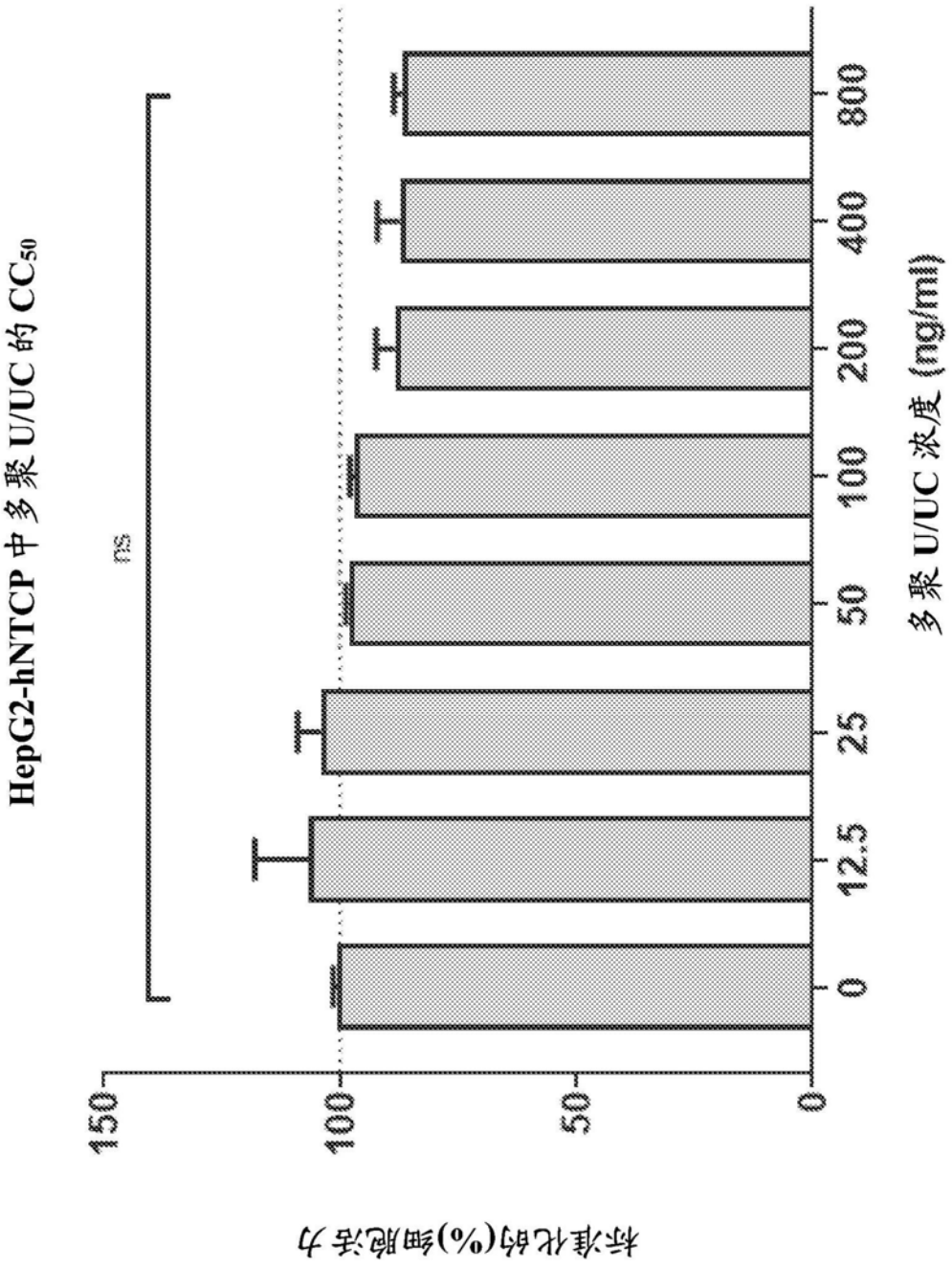

HepG2-hNTCP 中多聚 U/UC 的 CC_{50}
ns
标准化的(%)细胞活力
150
100
50
0
0
12.5
25
50
100
200
400
800
多聚 U/UC 浓度 (ng/ml)

图10C

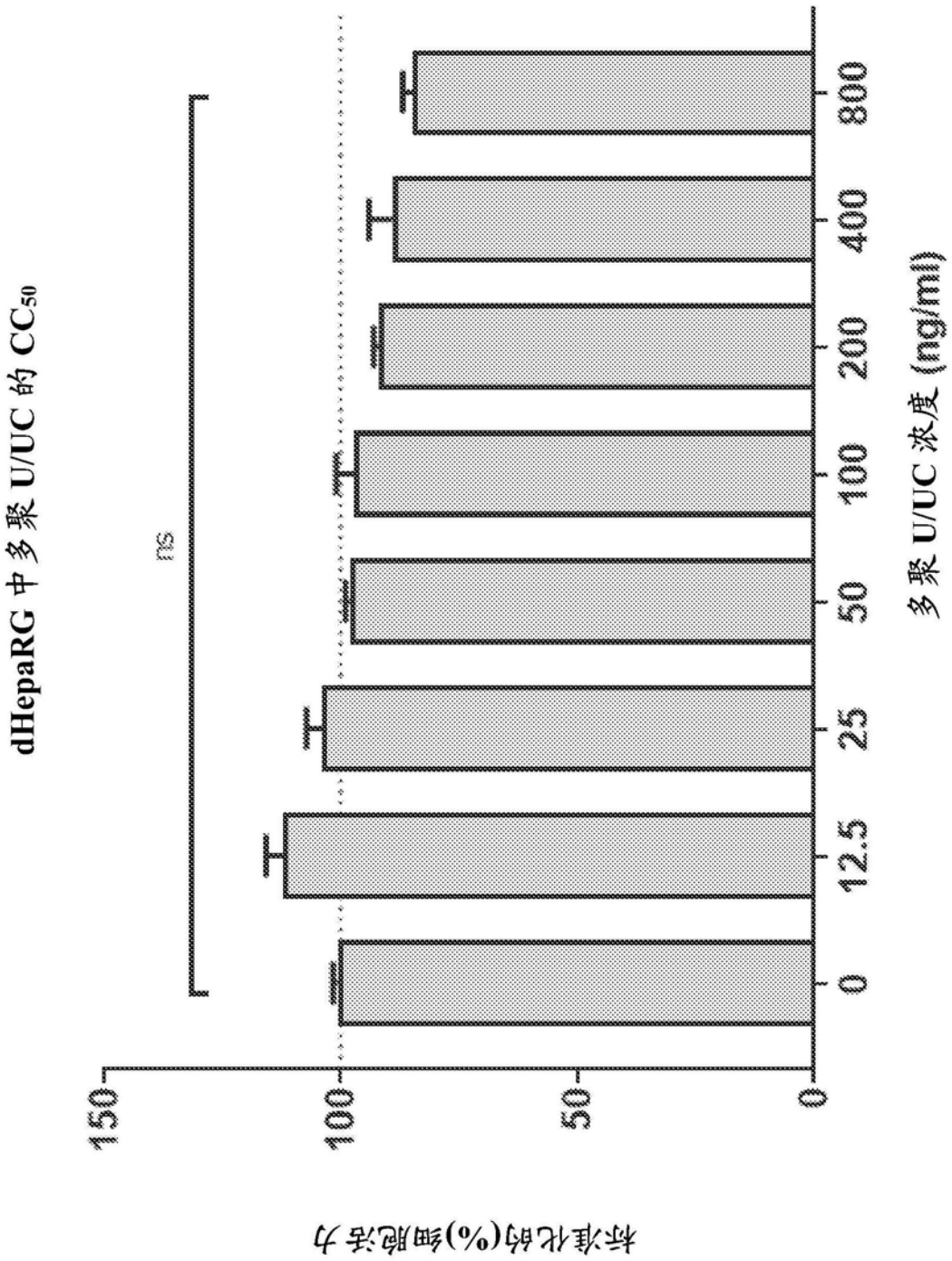

dHepaRG 中多聚 U/UC 的 CC_{50}
ns
标准化的(%)细胞活力
150
100
50
0
0
12.5
25
50
100
200
400
800
多聚 U/UC 浓度 (ng/ml)

图10D

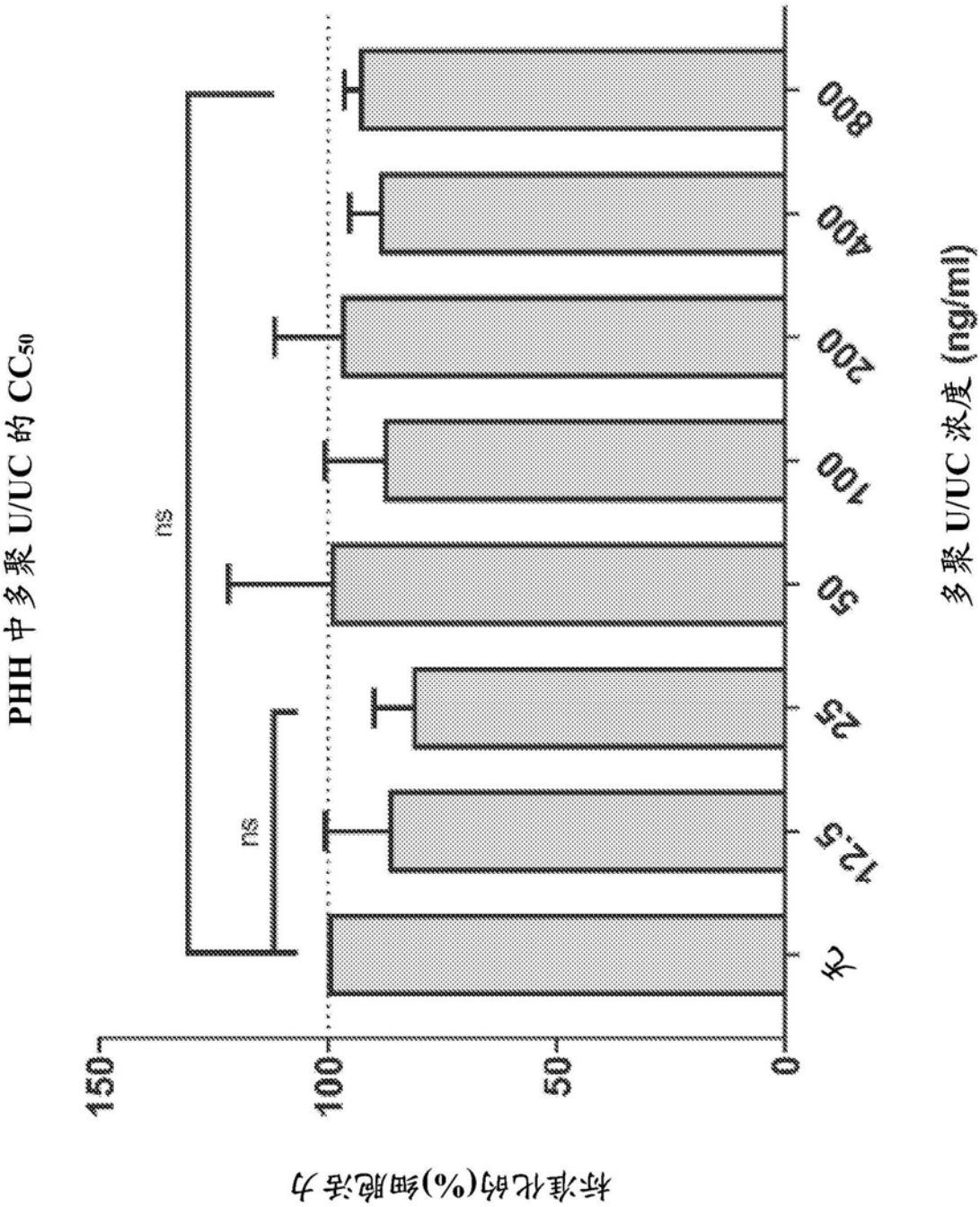

PHH 中多聚 U/UC 的 CC_{50}
多聚 U/UC 浓度 (ng/ml)
标准化的(%)细胞活力
0
50
100
150
对
12.5
25
50
100
200
400
800
ns
su

图10E

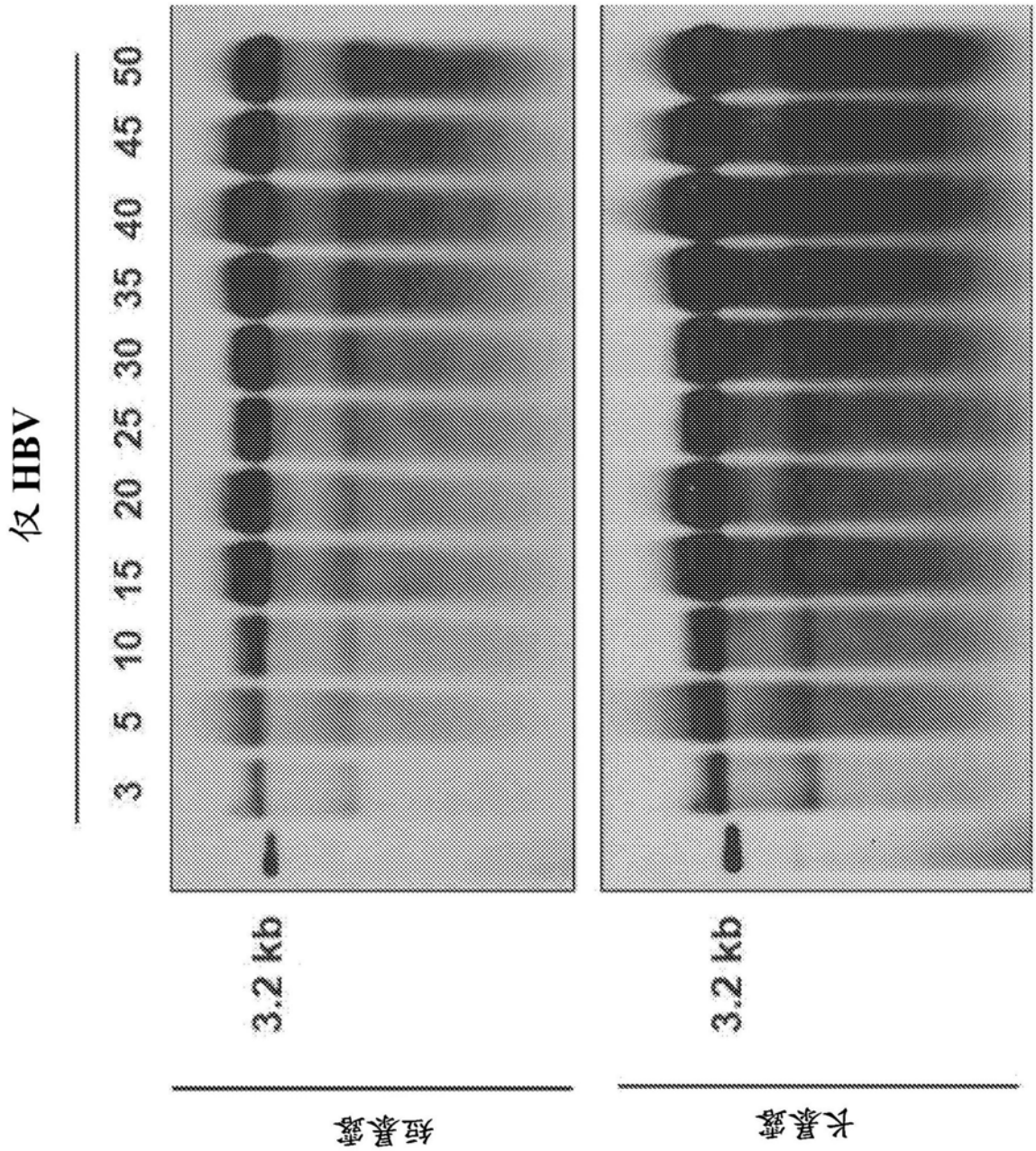


图11

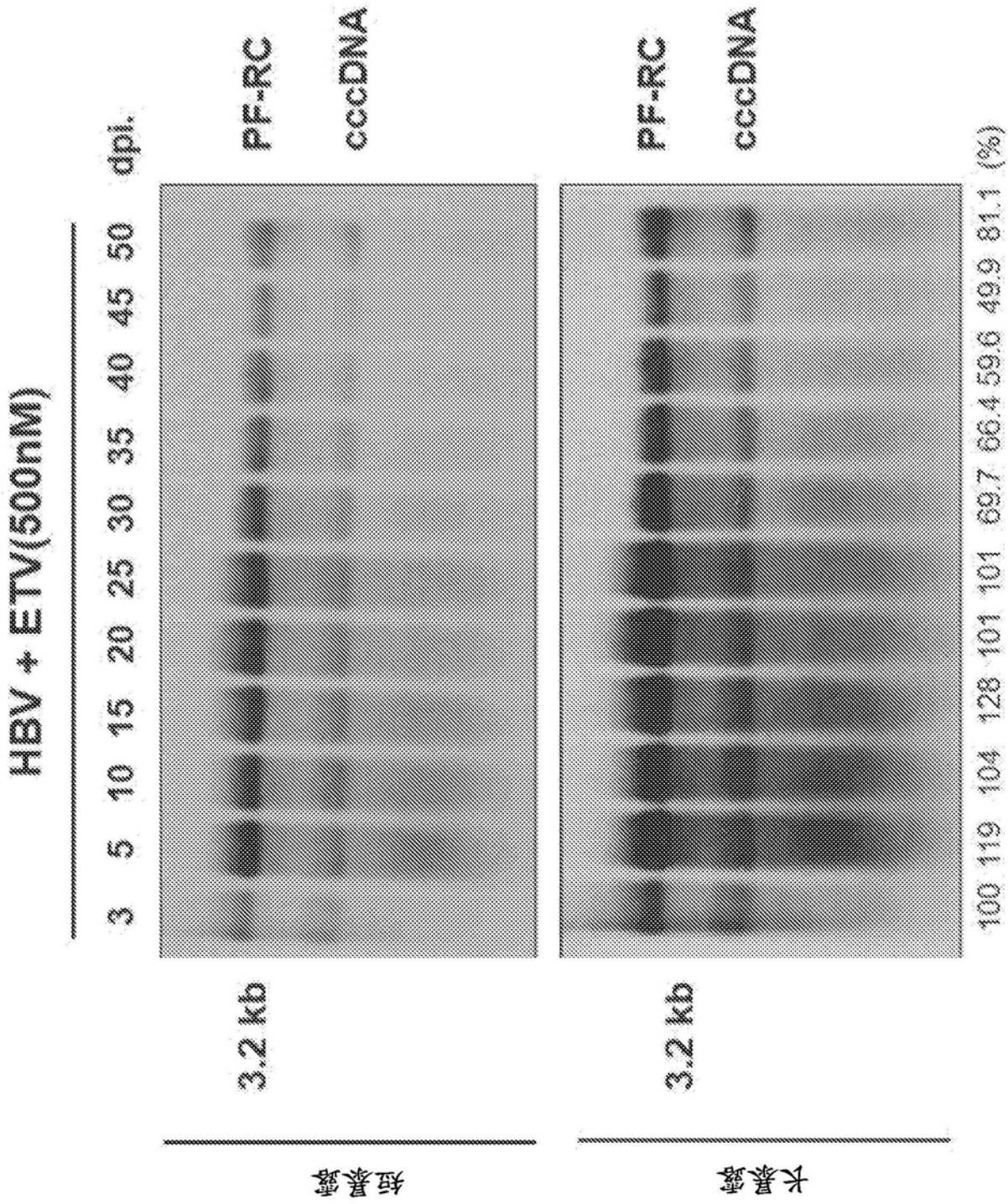

HBV + ETV(500nM)
dpi.
3 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
短暴露
PF-RC
cccDNA
3.2 kb
长暴露
100 119 104 128 101 101 69.7 66.4 59.6 49.9 81.1 (%)

图11续

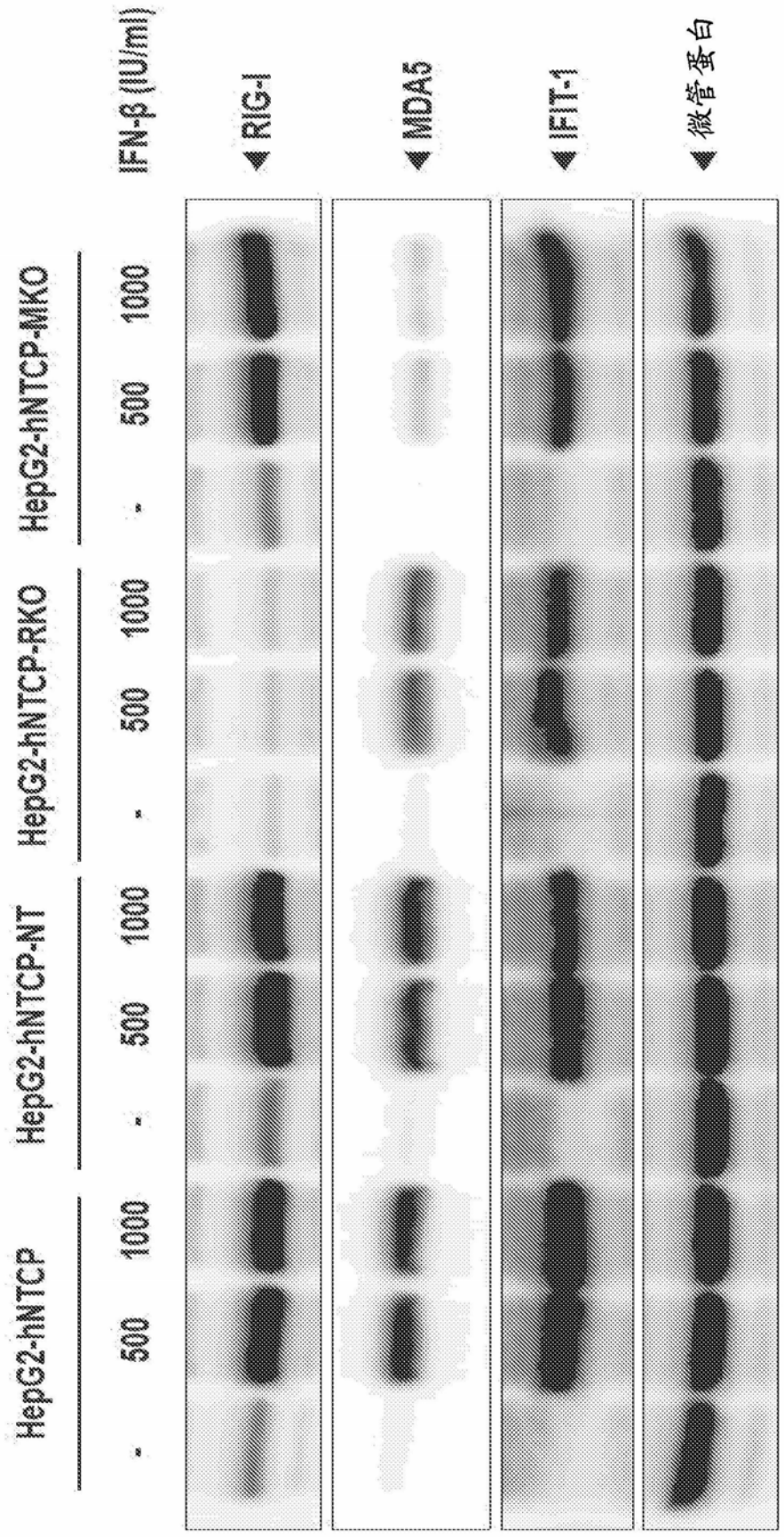

HepG2-hNTCP
HepG2-hNTCP-NT
HepG2-hNTCP-RKO
HepG2-hNTCP-MKO
IFN-β (IU/ml)
- 500 1000 - 500 1000 - 500 1000
RIG-I
MDA5
IFIT-1
微管蛋白

图12